



**HAL**  
open science

## La maturation de l'ovocyte canin in vivo et in vitro

Christine Viaris de Lesegno

► **To cite this version:**

Christine Viaris de Lesegno. La maturation de l'ovocyte canin in vivo et in vitro. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0046 . pastel-00003554

**HAL Id: pastel-00003554**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00003554>**

Submitted on 3 Jun 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur**

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Reproduction

*présentée et soutenue publiquement  
par*

**Christine Viaris de Leseugno**

**le 13 décembre 2007**

**LA MATURATION DE L'OVOCYTE CANIN**

**IN VIVO ET IN VITRO**

*Directeur de thèse : Sylvie CHASTANT-MAILLARD*

*Codirecteur de thèse : Karine REYNAUD*

Travail réalisé : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort  
UMR 1198 Biologie de la Reproduction et Développement, F-94704 Maisons-Alfort

Devant le jury :

Mme Trudee FAIR, PhD, **UNIVERSITY COLLEGE OF DUBLIN, IRLANDE**.....**Rapporteur**  
M. Pascal MERMILLOD, Directeur de Recherche, **INRA, Tours**.....**Rapporteur**  
Mme Pascale DEBEY, Professeur, **INRA, Jouy en Josas** ..... **Examineur**  
M. Marc-Antoine DRIANCOURT, Responsable R.et D., **INTERVET**.....**Examineur**  
M. Jacques GUILLOT, Professeur, **ENVA, Maisons-Alfort**.....**Examineur**

## *Remerciements*

De nombreuses personnes m'ont aidé tout au long de ces trois années de thèse et ont ainsi participé à la réalisation de ce manuscrit, et je souhaite vivement les en remercier.

En tout premier lieu, un très grand merci à Sylvie Chastant-Maillard, qui m'a accueilli dans son laboratoire et a dirigé mes travaux. Merci pour ta confiance, ta disponibilité, ta porte toujours ouverte, pour ton soutien scientifique et moral tout au long de ma thèse.

Je voudrai remercier aussi les membres de mon jury : Trudee Fair et Pascal Mermillod, pour avoir accepté de corriger ce manuscrit ainsi que les examinateurs de mon jury, Pascale Debey, Marc-Antoine Driancourt et Jacques Guillot.

De nombreuses personnes ont contribué régulièrement à faire avancer ce travail, que ce soit à l'occasion des réunions du comité de thèse, de relectures et corrections d'articles ou de discussions, et je les remercie de l'intérêt qu'elles ont porté à mon sujet et des conseils qu'ils m'ont prodigués : merci à Pascale Debey, Nathalie Beaujean, Pascal Mermillod, Xavier Vignon, Bernard Jalabert ; sans oublier Marc Chodkiewicz, pour le temps passé à corriger mon anglais, avec tant de patience et de gentillesse.

Il ne faudrait pas oublier toutes celles qui m'ont supporté (dans tous les sens du terme) au quotidien. Merci à Karine Reynaud pour avoir codirigé ma thèse. Et bien sûr merci aux filles du laboratoire Développement et Biotechnologies de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) : Martine Chebrou, Sandra Thoumire et Christelle Masson. Et bien entendu les stagiaires et étudiants : Cécile, Noël, Nina, Guillaume.

Ma thèse m'aura permis de me former à différentes techniques, et j'ai eu la chance de bénéficier de l'expertise et des « bons tuyaux » de Christine Longin et Sophie Chat pour la microscopie électronique à transmission et Pierre Adenot pour la microscopie confocale (MIMA2, plateforme de microscopie et d'imagerie de l'INRA de Jouy en Josas), Thierry Meylheuc pour la microscopie électronique à balayage (plateau technique de microscopie électronique à balayage de Massy, INRA).

Et comme l'utilisation d'un modèle canin nécessite des connaissances cliniques, un grand merci à toute l'équipe du Centre d'Etude de la Reproduction des Carnivores, et plus particulièrement à son responsable, le Dr Alain Fontbonne et à Noël Marseloo, qui m'ont formé aux suivis de reproduction canine et notamment à l'échographie ovarienne. Les membres du CERCA et du service de Reproduction de l'ENVA qui se sont succédés pendant mes trois années de thèse ont participé très activement au suivi de nos chiennes, et je tiens à remercier pour cela : Manu, Benoit, Xavier, Emilie, Catherine, Emeline, Elodie, Nicole, Zouzou, Guillaume, Giovanna, Julien, Aurélien, et tous les autres... Merci à l'équipe des chauffeurs pour la logistique (pour 3 années d'A86 vers Jouy en Josas) et à l'équipe de l'animalerie de l'ENVA pour les bons soins apportés aux chiennes de notre étude.

A ma cellule alforienne de soutien moral pour tout ce que vous m'avez apporté : Isabelle Hansen, Christine Vornière, sans oublier Alison, Daphné, Salomé et Arthur!

A Dominique Fresneau, qui m'a le premier donné ma chance dans le monde de la recherche et qui m'a conforté dans ce choix.

A tous mes amis (spéciale dédicace à Nanou, Cécile et Benoit).

A mes parents pour leur soutien sans faille, leur confiance et leur réconfort (et le dogsitting).

A mon grand frère Bruno, pour m'avoir ouvert la route, pour ses conseils tant scientifiques que personnels, ses cours de bricolage et les soirées pizzas-post-INRA.

A ma grande sœur Sophie, pour ses conseils judicieux, pour avoir toujours été là, pour ses encouragements et son soutien quotidien.

A ma nièce Louise, la plus mignonne des petites souris.

*A la mémoire de Noël Marseloo*

## Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>I. La maturation ovocytaire chez la chienne.....</b>	<b>10</b>
A. Biologie de l'ovocyte canin in vivo.....	10
1. La croissance et la maturation folliculaire terminales.....	10
2. La maturation de l'ovocyte.....	15
pendant la phase de croissance folliculaire terminale.....	15
3. La maturation oviductale de l'ovocyte (période post-ovulatoire).....	16
4. La fécondation.....	17
5. Le développement embryonnaire.....	19
B. La maturation ovocytaire canine in vitro.....	23
et les biotechnologies de la reproduction.....	23
1. La collecte des ovocytes.....	24
2. Maturation ovocytaire in vitro.....	27
3. La fécondation in vitro.....	31
4. Développement embryonnaire in vitro et transfert.....	31
5. Le clonage.....	32
C. Spécificités expérimentales de l'étude de la maturation ovocytaire chez la chienne.....	34
1. Rareté du matériel biologique.....	35
2. Définition de références de temps.....	36
3. Difficultés d'observation de l'ovocyte canin.....	39
D. But de la thèse.....	41
<b>II. Approche ultrastructurale de la maturation ovocytaire canine in vivo.....</b>	<b>43</b>
A. Introduction.....	43
B. Matériel et méthodes.....	44
1. Animaux.....	44
2. Dosages hormonaux.....	45
3. Récolte des ovocytes.....	45
4. Microscopie Optique et Microscopie Electronique à Transmission.....	46
5. Analyse statistique des données.....	47
C. Résultats.....	47
1. Récolte des complexes ovocyte-cumulus et mesures.....	47

2. L'ovocyte avant le pic de LH .....	48
3. L'ovocyte entre le pic de LH et l'ovulation .....	50
4. L'ovocyte au cours des trois premiers jours après l'ovulation.....	53
5. Quatrième et cinquième jours après l'ovulation.....	55
D. Discussion.....	58
<b>III. Approche transcriptionnelle de la maturation ovocytaire canine in vivo... 65</b>	
A. Matériel et Méthodes .....	66
1. Animaux .....	66
2. Dosages hormonaux .....	66
3. Récolte des ovocytes .....	67
4. Incorporation du BrUTP.....	68
5. Immunocytochimie.....	68
6. Quantification du signal fluorescent.....	69
7. Analyse statistique des données .....	69
B. Résultats.....	70
1. Détermination du temps optimal d'incorporation et de la concentration optimale en BrUTP70	
2. Quantification de la transcription nucléaire.....	71
C. Discussion.....	77
<b>IV. Approche ultrastructurale de la maturation ovocytaire canine in vitro..... 82</b>	
A. Matériel et méthodes.....	83
1. Récolte des ovocytes .....	83
2. Mise en culture .....	83
3. Préparation des échantillons et observation en microscopie électronique à transmission ..	84
4. Analyse statistique des données .....	84
B. Résultats.....	84
1. Classification des stades et mesures .....	84
2. Mesures.....	86
3. Ultrastructure des ovocytes non maturés.....	86
4. Ultrastructure des ovocytes après maturation in vitro .....	90
C. Discussion.....	98
1. Qualité des ovocytes avant maturation in vitro .....	99
2. Devenir des ovocytes pendant la maturation in vitro .....	102
3. Evaluation de la maturation des ovocytes en métaphase II.....	103

4. Evaluation de la maturation des oocytes n'ayant pas atteint le stade métaphase II en fin de culture 103

<b>V. Bilan général et perspectives.....</b>	<b>108</b>
<b>VI. Références bibliographiques .....</b>	<b>113</b>
<b>Annexe : Liste de publications.....</b>	<b>123</b>
<b>Publications dans des revues internationales à comité de lecture .....</b>	<b>123</b>
<b>Publications en cours .....</b>	<b>123</b>
<b>Publications dans des revues françaises à comité de lecture .....</b>	<b>123</b>
<b>Communications .....</b>	<b>124</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>125</b>
<b>Summary.....</b>	<b>125</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Follicule ayant subi une lutéinisation préovulatoire.....	11
Figure 2 : Follicules préovulatoires de chienne.....	11
Figure 3 : Chronologie d de la maturation ovocytaire canine.....	13
Figure 4 : Coupe histologique d'un follicule polyovocytaire de chienne.....	14
Figure 5 : Ovocytes canins collectés in vivo.....	17
Figure 6 : Ovocyte canin au stade vésicule germinale mûré et fécondé in vitro.....	19
Figure 7 : Chronologie du développement embryonnaire canin.....	20
Figure 8 : Cohorte d'embryons canins collectés in vivo 5 jours post ovulation.....	21
Figure 9 : Cohorte de blastocystes canins.....	22
Figure 10 : Image échographique d'ovaire de chienne.....	38
Figure 11 : Complexe cumulo-ovocytaire canin (anœstrus).....	39
Figure 12 : Schéma expérimental.....	45
Figure 13 : Complexe cumulo-ovocytaire canin au stade pré LH.....	49
Figure 14 : Complexe cumulo-ovocytaire canine entre le pic de LH et l'ovulation.....	52
Figure 15 : Complexe cumulo ovocytaire canin au cours de trois premiers jours post ovulation.....	54
Figure 16 : Complexe cumulo ovocytaire issu de chiennes à plus de 72h post ovulation.....	56
Figure 17 : Représentation schématique de l'évolution ultrastructurale d'un COC canin au cours de la maturation in vivo.....	59
Figure 18 : Chronologie des principaux événements de la maturation nucléaire de l'ovocyte.....	64
Figure 19: Variation de l'intensité du signal de transcription dans le nucléoplasme en fonction de la concentration en BrUTP.....	70
Figure 20 : Images en microscopie confocale d'ovocytes issus de chiennes en anœstrus.....	71
Figure 21 : Transcriptions nucléolaire et nucléoplasmique moyennes en fonction du stade du cycle.....	72
Figure 22 : Effets d'inhibiteurs sur l'activité transcriptionnelle dans le nucléole et dans le nucléoplasme sur des ovocytes issus de chiennes en anoestrus.....	73
Figure 23 : Transcription dans le noyau de quatre ovocytes avant le pic de LH.....	75
Figure 24 : Transcription nucléaire en période pré-ovulatoire.....	76
Figure 25 : Transcription nucléaire 27 et 39 heures post ovulation.....	77
Figure 26 : Répartition des ovocytes par stade avant et après culture.....	85
Figure 27 : Ovocyte à noyau central avant culture (VGc).....	87
Figure 28 : Ovocyte à noyau périphérique avant culture (VGp).....	89
Figure 29 : Ovocyte à noyau central après culture (VG <sub>1</sub> ).....	91
Figure 30 : Ovocyte à noyau périphérique et nucléole non entouré après culture (VG <sub>2</sub> ).....	92
Figure 31 : Ovocyte à noyau périphérique et nucléole entouré après culture (VG <sub>3</sub> ).....	94
Figure 32 : Ovocyte au stade métaphase I.....	96
Figure 33 : Ovocyte en métaphase II.....	98
Figure 34 : Comparaison théorique de l'avancement de la maturation ovocytaire des ovocytes avant culture aux VG mûrés in vivo avant le pic de LH et après l'ovulation.....	100
Figure 35 : Comparaison de l'état de maturation des ovocytes au stade vésicule germinale issus de la maturation in vitro et in vivo.....	102
Figure 36 : Représentation schématique de l'organisation et principales caractéristiques des trois types de vésicules germinales après culture.....	105

## *Liste des abréviations*

COC : Complexe Ovocyte-Cumulus  
DPI : Diagnostic pré implantatoire  
DFC : Dense Fibrillar Center (centre fibrillaire dense)  
E<sub>2</sub> : Œstrogènes  
eCG : Equine Chorionic Gonadotropin (anciennement PMSG)  
FC : Fibrillar Center (centre fibrillaire)  
FSH : Follicle Stimulating Hormone (hormone folliculo stimulante)  
FIV : Fécondation In Vitro  
GC : Granular compound (composante granulaire)  
GIFT : Gamete Intra Fallopian Transfer  
GRAFT : Gamete Recovery And Follicular Transfer  
GVBD : Germinal Vesicle Break Down (rupture de la vésicule germinale)  
hCG : Human Chorionic Gonadotropin  
ICSI : IntraCytoplasmic Sperm Injection  
LH : Luteinizing Hormone  
MI : Métaphase I  
MII : Métaphase II  
MIV : Maturation In Vitro  
NSN : Non Surrounded Nucleolus (nucléole non entouré)  
OPU : Ovum Pick Up  
PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (eCG)  
P<sub>4</sub> : Progestérone  
RER : Réticulum endoplasmique granuleux  
SER : Réticulum endoplasmique lisse  
SOF : Synthetic Oviductal Fluid  
SN : Surrounded nucleolus (nucléole entouré)  
TCM : Milieu de Culture Tissulaire  
VG : Vésicule germinale

## *INTRODUCTION*

Dans le cadre de biotechnologies de la reproduction, la manipulation des ovocytes et des embryons est déjà utilisée dans un très grand nombre d'espèces domestiques. Ainsi, les techniques de transfert embryonnaire, de production d'embryons *in vitro*, d'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection), de clonage et de transgénèse sont disponibles chez les ruminants, les porcins et chez le chat. Les biotechnologies de la reproduction canine présentent un retard important en comparaison des autres espèces mammifères, puisqu'aucune des techniques que nous venons de citer n'est couramment disponible pour cette espèce. L'insémination artificielle est ainsi la technique de reproduction assistée la plus avancée actuellement disponible chez la chienne.

Les causes du retard des biotechnologies de la reproduction canine sont multiples. Tout d'abord, le chien est une espèce présentant une biologie de la reproduction très particulière. De plus, la difficulté d'étude de ce modèle ralentit l'avancée des connaissances dans le domaine. Les connaissances fondamentales de base, acquises chez les ruminants depuis plusieurs dizaines d'années, font donc actuellement défaut pour la fonction de reproduction de la chienne. L'amélioration des biotechnologies de la reproduction passe donc par la réalisation d'études fondamentales afin de mieux décrire et comprendre les phénomènes.

Ce manuscrit de thèse présente dans un premier temps un bilan synthétique des connaissances disponibles sur la biologie de l'ovocyte et de l'embryon canin et des résultats obtenus jusqu'à présent en matière de biotechnologies de la reproduction. Les résultats des travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse seront ensuite détaillés. Ces travaux visaient à décrire la maturation de l'ovocyte *in vivo* d'un point de vue ultrastructural. L'étude ultrastructurale *in vivo* a été complétée par une étude de la transcription. Enfin, les ovocytes maturés *in vitro* ont été comparés à la référence ultrastructurale obtenue *in vivo*.

# **I. La maturation ovocytaire chez la chienne**

## **A. Biologie de l'ovocyte canin in vivo**

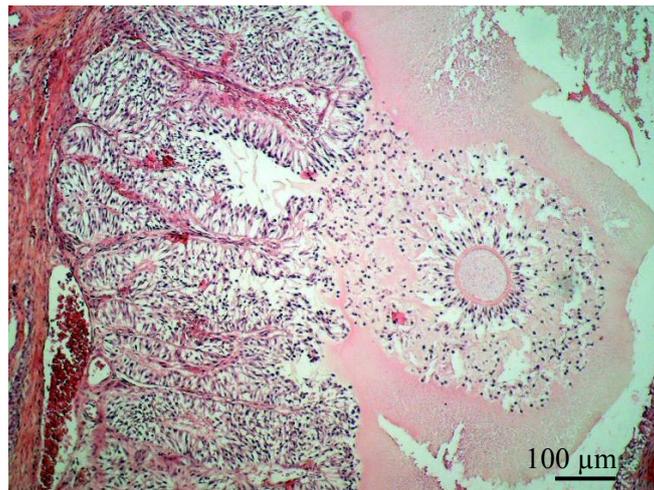
Le chien (*Canis familiaris*) est une espèce monoœstrale, polyovulante et non-saisonnée. Son cycle de reproduction se divise en quatre phases : le proœstrus, l'œstrus, le métœstrus et l'anœstrus (Johnston et al., 2001). Ces phases sont définies historiquement par l'association de signes extérieurs de chaleurs et du comportement de la chienne. Le proœstrus (3 à 20 jours de durée) est la période au cours de laquelle des écoulements vaginaux sont présents mais où la femelle refuse l'accouplement. Pendant l'œstrus (une dizaine de jours), la femelle accepte l'accouplement ; c'est également au cours de cette période que se produit l'ovulation. Ces deux premières phases correspondent aux chaleurs proprement dites. Le métœstrus, ou diœstrus (2 mois), commence dès que la femelle refuse à nouveau l'accouplement. C'est la période de gestation ou de pseudogestation (s'il n'y a pas eu fécondation), pendant laquelle les corps jaunes sécrètent de la progestérone. Enfin, l'anœstrus (de durée variable selon les races, 4 mois en moyenne, mais pouvant aller de 3 à 10 mois) correspond à la période de repos sexuel. Néanmoins, d'un point de vue biologique, il est plus intéressant de se référer à la croissance folliculaire et aux événements endocriniens, même s'il est difficile de faire correspondre ces deux modes de description du cycle de la chienne.

La chronologie des événements principaux de la maturation ovocytaire in vivo ont été synthétisés dans la figure 1.

### **1. La croissance et la maturation folliculaire terminales**

Pendant l'anœstrus, une croissance folliculaire existe, mais sans différenciation folliculaire terminale. Le diamètre maximal des follicules antraux observés pendant l'anœstrus est de 0,6 à 1 mm (Andersen et Simpson, 1973). Le proœstrus s'accompagne d'une augmentation progressive de la concentration plasmatique en œstrogènes qui diminue aux alentours du pic de LH (grande variabilité intra-chienne et entre les études ; de Gier et al., 2006). Le pic de LH dure de 1 à 5 jours, avec une moyenne  $36 \pm 5$  heures ; il est donc long, en comparaison de celui de la vache par exemple (10-12 heures ; Lemon et al., 1975) et atteint une valeur plasmatique moyenne maximale de 19 ng/ml au moment du pic (de Gier et al., 2006). Au moment de ce pic de LH, les follicules présents ont un diamètre de 2 à 6 mm avec

une moyenne de 3,5 mm (Reynaud et al., données non publiées) et le taux de progestérone circulant est déjà élevé, autour de 2 ng/ml (Marseloo et al., 2004). En effet, le follicule subit chez la chienne un phénomène très spécifique, appelé lutéinisation préovulatoire. Histologiquement, cette lutéinisation se traduit par une modification de la couche de granulosa qui prend un aspect plissé, lui donnant un aspect en feuilles (Figure 1). La chienne se trouve alors dans la phase préovulatoire et en moyenne 48 heures après le pic de LH a lieu l'ovulation. Le délai compris entre le pic de LH et l'ovulation est assez constant puisqu'il varie de 36 à 50 heures (Phemister et al., 1973 ; Concannon et al., 1989 ; England and Yeager, 1993 ; Marseloo et al., 2004 ; de Gier et al., 2006). L'ovulation intervient pour des diamètres folliculaires de 3 à 8 mm (Figure 2). Ces mesures ont été déterminées d'abord par laparotomie et ovariectomie (Wildt et al., 1977) puis plus récemment par échographie (Wallace et al., 1992 ; England et Yaeger, 1993 ; Hayer et al., 1993 ; Hase et al., 2000 ; Fontbonne et al., 2004).



*Figure 1 : Follicule ayant subi une lutéinisation préovulatoire.*



*Figure 2 : Follicules préovulatoires de chienne.*

Une étude récemment menée dans notre laboratoire a quantifié les récepteurs à FSH (Follicle Stimulating Hormone) et à LH au cours de la folliculogénèse, et a déterminé que les récepteurs à FSH sont présents dans la granulosa du stade préantral au stade préovulatoire et que les récepteurs à LH sont présents en faible quantité dans la granulosa des follicules antraux de plus de 500  $\mu\text{m}$  et en plus forte quantité à partir de 1500  $\mu\text{m}$  de diamètre (Jaffré, 2006). La folliculogénèse canine se distingue donc par une acquisition précoce des récepteurs à LH.

L'existence de vagues folliculaires au cours de l'œstrus n'a pas été étudiée chez la chienne, alors que leur existence a été prouvée pendant l'œstrus d'autres espèces telles que la jument ou la brebis (Evans, 2003). Dès l'apparition des premiers signes cliniques de chaleurs (début de proœstrus), plusieurs follicules de 1 à 1,5 mm de diamètre sont déjà présents dans l'ovaire et entament leur croissance terminale. Ils atteignent 1,5 à 5 mm de diamètre avant la survenue du pic de LH, alors que la concentration en progestérone circulante reste basale (inférieure à 1 ng/ml ; Andersen et Simpson, 1973 ; Hase et al., 2000).

Le taux d'ovulation moyen (au sens du nombre de follicules ovulant) dans l'espèce canine peut être évalué par la taille de la portée ou l'échographie. La taille de la portée donne cependant une sous-estimation car elle tient compte des pertes embryonnaires et fœtales éventuelles. L'échographie ovarienne peut quant à elle entraîner une sous- ou une surestimation du nombre de follicules préovulatoires, particulièrement lorsqu'ils sont nombreux et deviennent difficiles à compter (Wallace et al., 1992). Certains auteurs évaluent le taux d'ovulation plus précisément, en comptant le nombre de corps jaunes sur les deux ovaires, après ovariectomie, obtenant des taux d'ovulation moyens de  $5,7 \pm 0,3$  (n=22 chiennes ; Tsutsui et Shimizu, 1975), de  $6,0 \pm 0,1$  (n= 192 chiennes ; Shimizu et al., 1990) et de  $7,9 \pm 0,6$  (n=46 chiennes ; Reynaud et al., 2005). Les variations du taux d'ovulation peuvent en partie au moins s'expliquer par la race canine considérée. Par exemple, dans une étude réalisée sur 44 femelles ayant subi des ovariectomies peu de temps après l'ovulation, les chiennes de races de petite taille (<10 kg, n=13) ont présenté un taux d'ovulation significativement inférieur à celui des chiennes des autres races. Le nombre moyen de corps jaunes était de  $5,5 \pm 0,7$  chez les races de petite taille contre  $7,8 \pm 0,7$  chez les races de taille moyenne (10-20 kg, n=20) et  $10,1 \pm 1,4$  chez les races de grande taille (Reynaud et al., 2006).

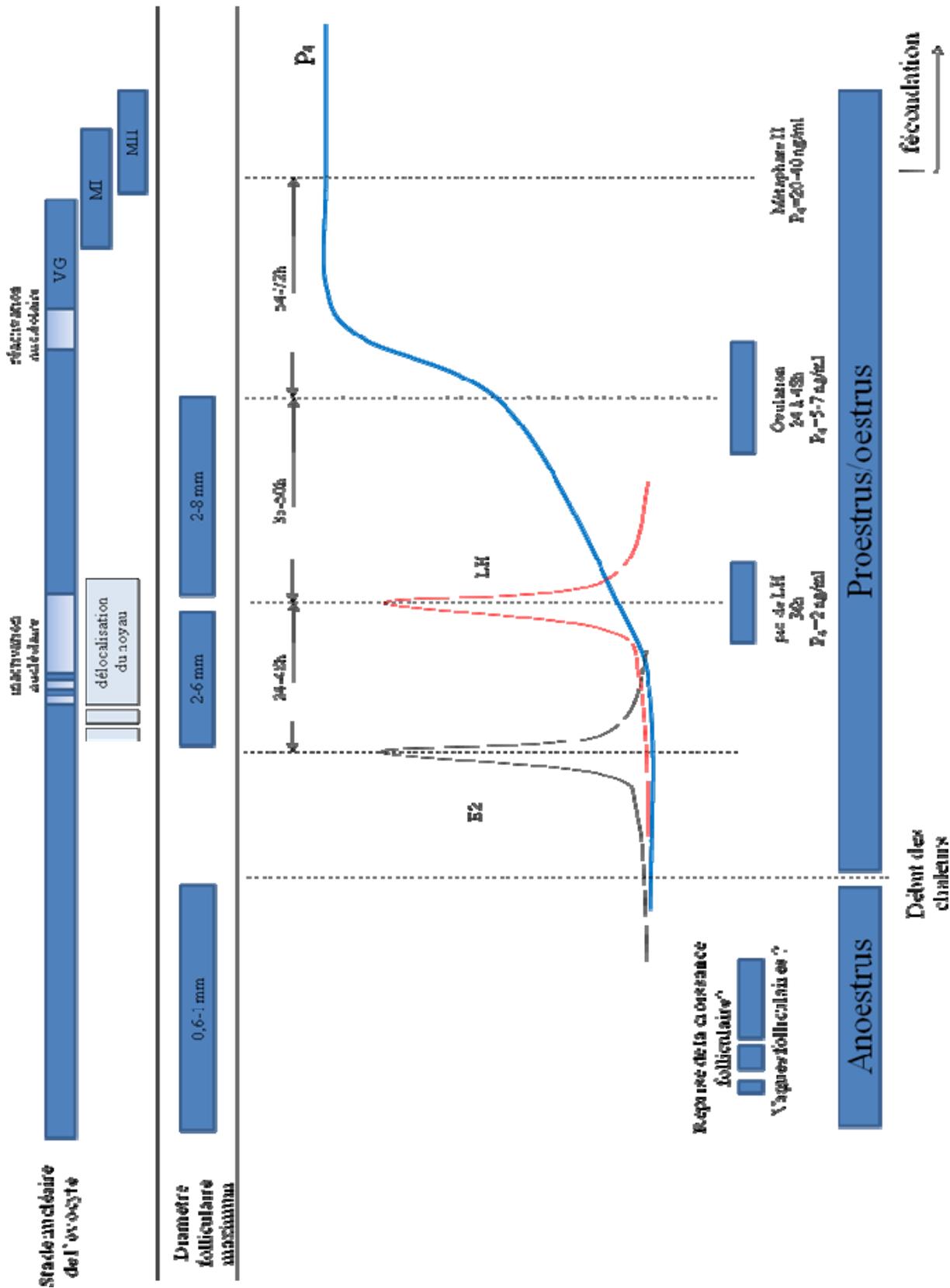


Figure 3 : Chronologie des principaux évènements liés à la maturation ovocytaire canine. P<sub>4</sub> : progestérone, E<sub>2</sub> : œstrogènes.

D'autre part, l'ovulation n'intervient pas simultanément pour tous les follicules ovulatoires présents et il existe une grande variabilité interindividuelle de la durée totale de l'ovulation. Notre équipe a observé un délai maximum de 24 heures entre l'ovulation du premier et du dernier follicule (Marseloo et al., 2004), alors que Boyd et al.,(1993) ont reporté que ce délai pouvait atteindre 36 heures.

Outre la lutéinisation préovulatoire, une autre particularité de la folliculogenèse canine est la fréquence très élevée des follicules polyovocytaires (Figure 4 ; Andersen et Simpson, 1973 ; Telfer et Gosden, 1987 ; McDougall et al., 1997). Cependant il n'a pas été démontré jusqu'à présent si de tels follicules peuvent évoluer jusqu'à l'ovulation et s'ils pourraient alors libérer un ou plusieurs ovocytes viables. Les follicules contenant plusieurs ovocytes sont fréquemment observés dans les petits follicules en croissance (5 à 14 % des follicules contiennent 2 à 14 ovocytes ; Telfer et Gosden, 1987) mais seulement rarement dans les gros follicules préantraux (< 1% ; Telfer et Gosden, 1987). Les follicules poly-ovocytaires sont encore plus rares pendant la phase de croissance terminale (5,5% des follicules de plus de 2 mm contiennent 2 à 13 ovocytes avant le pic de LH et 4% des follicules préovulatoires contiennent 2 à 5 ovocytes ; Reynaud et al., données non publiées). Certains auteurs ont reporté la récolte par rinçage des oviductes d'un nombre d'ovocytes ou d'embryons supérieur au nombre de corps jaunes comptés (Bysted et al., 2001 ; Reynaud et al., 2005). Il est donc impossible actuellement d'exclure avec certitude la possibilité de l'ovulation occasionnelle de follicules polyovocytaires.



Figure 4 : Coupe histologique d'un follicule polyovocytair de chienne.

Enfin, la caractéristique principale de l'ovulation canine est de libérer un ovocyte immature, au stade prophase I (vésicule germinative, VG). Contrairement aux autres femelles mammifères, la reprise de la méiose n'a donc pas lieu suite au pic de LH dans le follicule, mais dans les jours qui suivent l'ovulation, dans les oviductes.

## 2. La maturation de l'ovocyte pendant la phase de croissance folliculaire terminale

Dans la majorité des espèces mammifères, le pic préovulatoire de LH est le signal d'induction de la reprise de méiose (passage de la prophase I à la métaphase II) et de la mucification du cumulus (décompaction du cumulus causée par une accumulation d'acide hyaluronique). Chez la chienne, ce processus est différent. Le pic de LH est en effet suivi de la mucification du cumulus au bout de quelques heures, et de l'ovulation après un délai de 36 à 50 heures, mais la reprise de méiose n'a lieu qu'après plusieurs jours (voir plus loin). La mucification ne concerne que les couches de cellules les plus périphériques du cumulus, les deux ou trois couches les plus internes ne semblent pas concernées et forment un ensemble compact autour de l'ovocyte (Phemister et al., 1973 ; Reynaud et al., 2005).

La mucification du cumulus dépend non seulement de la survenue du pic de LH mais aussi du stade de croissance du follicule au moment du pic. En effet, elle ne concerne pas tous les follicules antraux présents sur l'ovaire au cours de la phase préovulatoire mais seulement ceux ayant dépassé un diamètre de 4 mm. Dans une expérience menée dans notre laboratoire, les ovocytes de 479 follicules (1,5 à 8 mm) provenant de 45 chiennes de race beagle ont été observés entre les périodes pré LH et pré-ovulatoire. Aucun des cumulus de complexes cumulo-ovocytaires provenant de follicules avant le pic de LH ne présentait de mucification. Après le pic de LH, les cumulus issus de follicules de moins de 3 mm ne présentaient jamais de mucification et ceux de follicules de plus de 5 mm étaient tous mucifiés. Dans les follicules 3 à 4 mm et de 4 à 5 mm, les cumulus non mucifiés deviennent plus rares (50% et 10 % des cumulus respectivement ; Reynaud et al., données non publiées).

Au moment de l'ovulation, le diamètre cytoplasmique de l'ovocyte varie de 100 à 120  $\mu\text{m}$  (moyennes comprises entre 100 et 120  $\mu\text{m}$  selon l'étude ; Evans et Cole, 1931 ; Andersen et Simpson, 1973).

### 3. La maturation oviductale de l'ovocyte (période post-ovulatoire)

Pendant la période post-ovulatoire immédiate, la bourse ovarique contient 2 à 3 ml de liquide (Tsutsui et Ejima, 1988 ; Metcalfe, 1999). Les ovocytes sont expulsés de leur follicule vers la bourse ovarique et démarrent alors leur maturation extra-folliculaire. Cette période de la maturation ovocytaire canine présente deux aspects très particuliers. Tout d'abord, l'ovocyte est ovulé au stade immature de vésicule germinale et il complète sa méiose pendant son transport dans l'oviducte. Cette spécificité a été décrite chez un autre canidé, le renard (Farstad et al., 1993) mais on ignore si elle est commune à tous les canidés. L'autre particularité de l'ovocyte canin est sa longue viabilité dans l'oviducte : alors que les ovocytes des autres mammifères ne survivent que quelques heures après l'ovulation (8 à 12 heures chez la truie et 10 à 12 heures chez la vache) s'ils ne sont pas fécondés, l'ovocyte canin peut survivre plusieurs jours dans les mêmes conditions (Betteridge, 1995).

Au bout de quelques heures après l'ovulation, les ovocytes sont retrouvés dans l'oviducte (Phemister et al., 1973). Plusieurs couches denses de cellules du cumulus sont toujours présentes autour de la zone pellucide, et elles lui resteront solidaires jusqu'au début du développement embryonnaire (voir plus loin). Ce phénomène serait dû aux nombreuses projections transzonales émises par les cellules du cumulus à travers la zone pellucide, qui resteraient en contact avec l'ovocyte pendant une période particulièrement longue. Chez les autres mammifères, la rupture de la communication ovocyte-cumulus est induite par le pic de LH et entraîne la reprise de la méiose par levée d'un signal inhibiteur. La prolongation de cette communication chez la chienne pourrait participer au maintien du blocage méiotique selon Luvoni et al. (2001).

Quelques études se sont penchées sur la reprise de la maturation ovocytaire pendant les premières heures suivant l'ovulation (en microscopie optique sans coloration nucléaire dès 17 heures post ovulation, Tsutsui, 1975b ; en microscopie confocale avec immunocytochimie dès 24 heures post ovulation, Reynaud et al., 2005 ; Figure 5). Le diamètre moyen (zone pellucide exclue) à l'ovulation est d'environ 120  $\mu\text{m}$ . Le noyau de l'ovocyte est en position périphérique (chien, Phemister et al., 1973 ; renard, Hyttel et al., 1990) et entouré par une fine couche exempte de gouttelettes lipidiques mais riche en mitochondries (Van der Stricht, 1923). De 24 à 48 heures après l'ovulation, les ovocytes sont localisés dans les parties proximale et médiale de l'oviducte (Phemister et al., 1973 ; Tsutsui, 1975b). De 17 à 44 heures, les ovocytes sont tous au stade de la vésicule germinative (51 ovocytes de 12 chiennes ; Reynaud et al., 2005). Les ovocytes commencent ensuite à reprendre leur méiose, les premières métaphases I étant décrites dès 48 heures post ovulation et les premières

métaphases II de 48 à 54 heures post ovulation (Tsutsui, 1975a ; Reynaud et al., 2005). In vivo, le stade GVBD (rupture de la vésicule germinale) n'a jamais été observé.

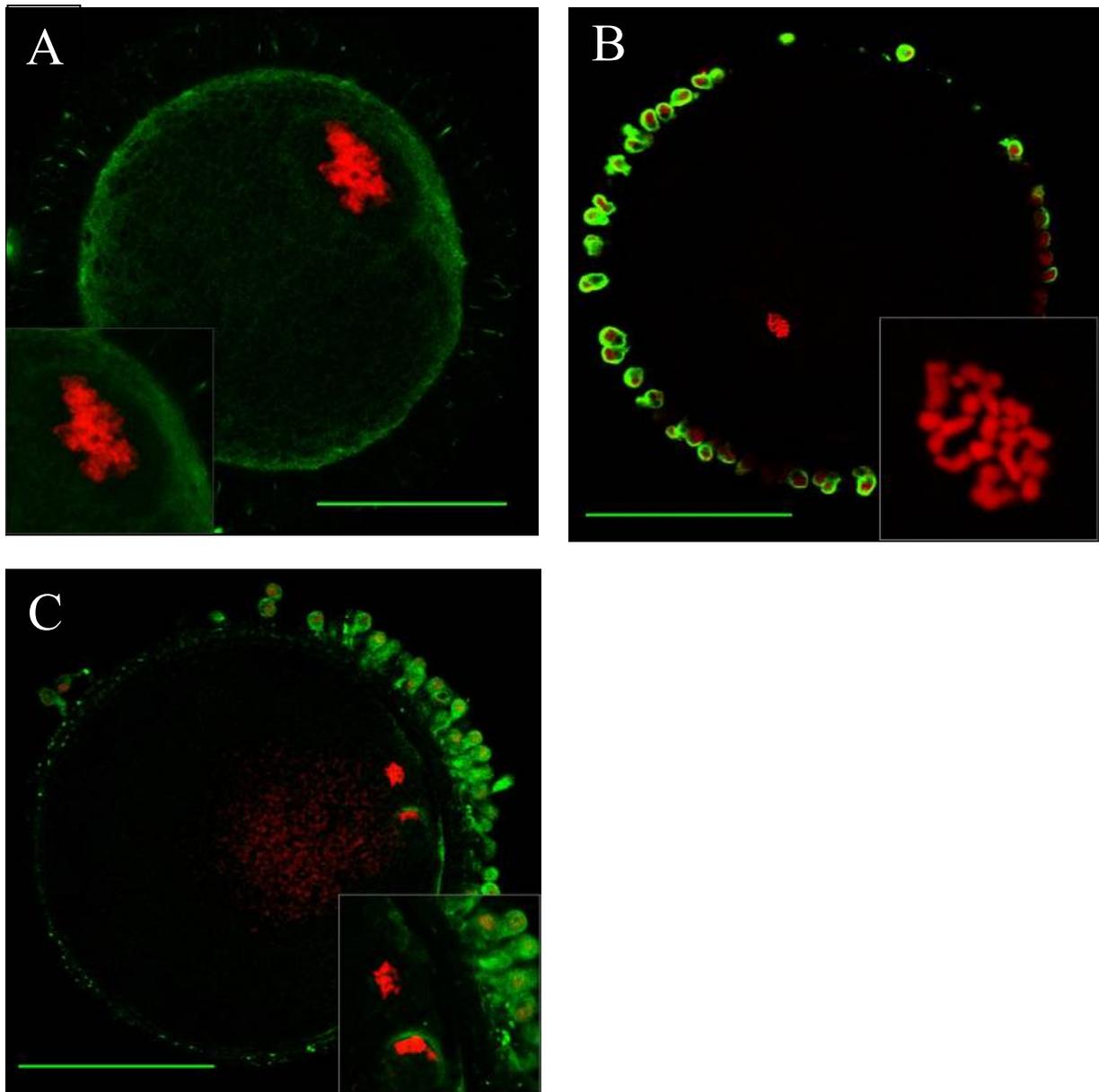


Figure 5 : Ovocytes canins collectés in vivo. Observation en microscopie confocale après immunocytochimie (en vert :  $\alpha$ -tubuline ; en rouge : ADN. A : vésicule germinale. B : Métaphase I. C : Métaphase II. Barre d'échelle = 100  $\mu$ m.

#### 4. La fécondation

Des spermatozoïdes sont présents au niveau de l'oviducte dès quelques minutes après l'accouplement. Cependant, même lorsqu'ils sont présents en grande quantité dans les cornes utérines, très peu de spermatozoïdes sont dénombrés dans l'oviducte ou dans la bourse ovarique (100 fois moins au maximum ; Doak et al., 1967). Globalement, les durées

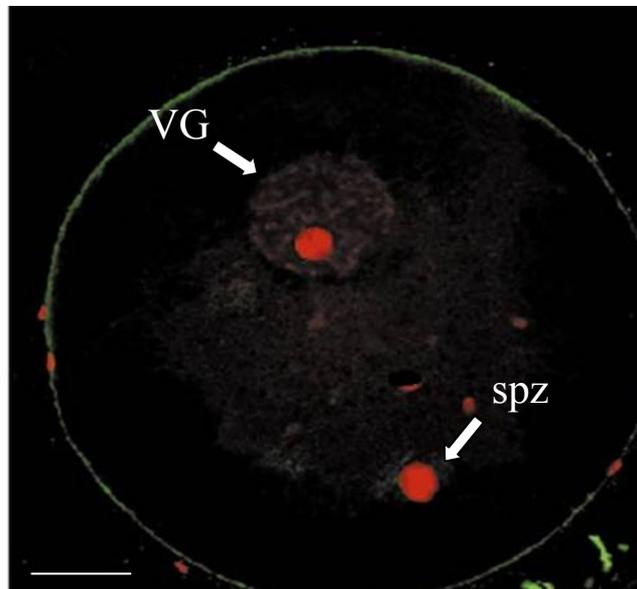
maximales de survie pour du sperme frais sont comprises entre 3,5 et 6 jours, mais quelques spermatozoïdes peuvent survivre jusqu'à 11 jours (Griffiths et Amoroso, 1939 ; Doak et al., 1967).

La durée de survie exacte de l'ovocyte dans l'oviducte est plus compliquée à évaluer. Il a été montré que l'ovocyte restait fécondable jusqu'à 108 heures (4,5 jours) après l'ovulation, et occasionnellement jusqu'à 120 heures (5 jours ; Tsutsui et Shimizu, 1975). Cependant, lorsque l'oviducte est rincé entre 4 et 10 jours après l'ovulation, la présence d'ovocytes non fécondés et dégénérés est classiquement observée parmi des embryons normaux (Tsutsui, 1975a ; Bysted et al., 2001). Ces ovocytes peuvent représenter jusqu'à 14% de l'effectif récolté (de 5 à 10 jours après l'ovulation ; Bysted et al., 2001 ; Tsutsui et al., 2004), ce nombre pouvant parfois dépasser 50% de la cohorte d'une même chienne (Bysted et al., 2001). Certains de ces ovocytes non fécondés pouvaient être à des stades encore immatures (vésicule germinative, métaphase I) et donc étaient probablement anormaux ou de mauvaise qualité. Étonnamment, d'autres ovocytes n'étaient pas bloqués dans leur processus de reprise de méiose et avaient atteint le stade métaphase II (92 à 127 heures post ovulation ; Reynaud et al., 2005). La cause de cette absence de fécondation (qualité ovocytaire médiocre, durcissement précoce de la zone pellucide ou maturation ralentie) reste à déterminer.

Étant donné que les ovocytes canins reprennent leur méiose dans l'oviducte après l'ovulation, la pénétration du spermatozoïde pourrait donc avoir lieu alors que les ovocytes se trouvent encore à des stades immatures. Cette idée a été émise pour la première fois dans une étude *in vivo* (Van der Stricht, 1923) où une tête de spermatozoïde a été observée dans le cytoplasme d'un ovocyte au stade vésicule germinale et dans celui d'un ovocyte au stade métaphase I, à proximité du fuseau méiotique. Certaines études menées *in vitro* ont aussi montré que des spermatozoïdes pouvaient pénétrer dans le cytoplasme d'ovocytes canins immatures (Figure 6 ; Mahi et Yanagimachi, 1976 ; Yamada et al., 1992 ; Hay et al., 1994 ; Shimazu et Naito, 1996 ; Otoi et al., 2000 ; Saint-Dizier et al., 2001) et ce avec une forte fréquence (de 6 à 59%). Les ovocytes présentent alors un grand nombre de têtes de spermatozoïdes dans leur cytoplasme (2 à 12 avec une moyenne de 3,5 dans les VG et de 3,0 dans les métaphase II ; Saint-Dizier et al., 2001). Il s'est avéré par la suite que la pénétration d'ovocytes immatures, fréquemment observée *in vitro*, est un artéfact, probablement induit par des conditions de culture sub-optimales ou par l'utilisation d'ovocytes n'ayant pas achevé leur maturation cytoplasmique (provenant de follicules trop petits). Cependant, comme la pénétration à des stades immatures a aussi été décrite sur des ovocytes provenant de follicules préovulatoires (Shimazu et Naito, 1996), la trop grande précocité de la maturation de

l'ovocyte ne peut expliquer que partiellement ce phénomène, d'autant plus que la polyspermie n'y est jamais associée *in vivo* (Van der Stricht, 1923 ; Reynaud et al., 2005). *In vivo*, ce phénomène de fécondation d'ovocytes immatures est extrêmement rare : sur 112 ovocytes immatures provenant de 30 chiennes entre 17 et 127 heures post ovulation, seulement trois ovocytes provenant de la même chienne présentaient une tête de spermatozoïde dans leur cytoplasme ; Reynaud et al., 2005). Cette étude confirme que la pénétration d'un ovocyte immature par un spermatozoïde doit être considérée comme un phénomène exceptionnel, ainsi que cela avait été suggéré lors de sa première description (Van der Stricht, 1923).

La fécondation a donc lieu *in vivo* sur des ovocytes au stade métaphase II, présents entre les parties médiale et distale de l'oviducte, entre 48 et 83 heures post ovulation (Tsutsui, 1975a ; Reynaud et al., 2005).



*Figure 6 : Ovocyte canin au stade vésicule germinale (VG) mûr et fécondé in vitro. spz : tête de spermatozoïde décondensée (barre d'échelle = 20  $\mu$ m).*

## 5. Le développement embryonnaire

La chronologie du développement embryonnaire est résumée dans la Figure 7.

Plusieurs auteurs ont décrit le développement embryonnaire précoce canin, sur des cohortes allant de 8 à 50 chiennes. Cependant, l'établissement d'une chronologie de développement précise demande une détermination précise du moment de l'ovulation. Dans la littérature, différentes méthodes ont été utilisées, conduisant à une grande variété de point de départ (voir plus loin).

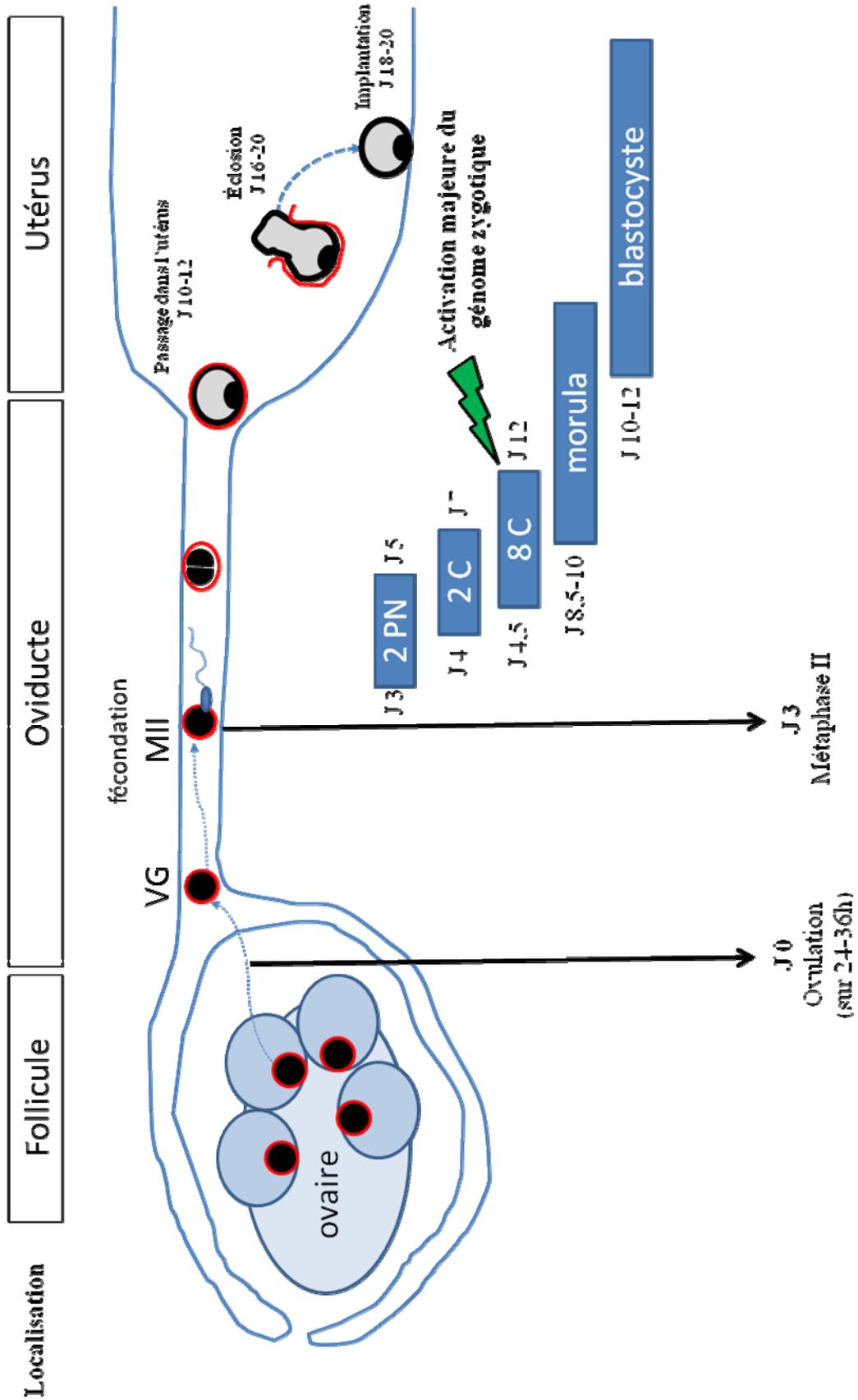
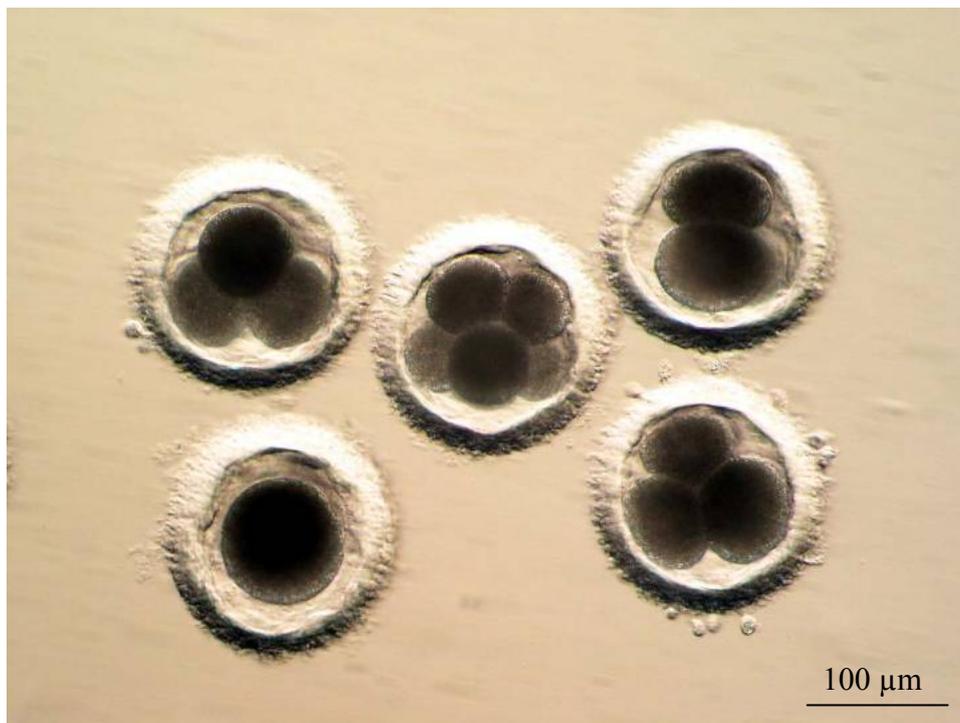


Figure 7 : Chronologie du développement embryonnaire dans l'espèce canine. VG : vésicule germinale ; MII : métaphase II ; 2 PN : 2 pronoyaux ; 2C : 2-cellules ; 8C : 8-cellules.

La collecte d'embryons a été réalisée par ovariectomie de 17 heures (Reynaud et al., 2005) à 20 jours (Holst et Phemister, 1971) après l'ovulation. Les embryons sont retrouvés dans les cornes utérines autour de 9 à 10 jours post ovulation. Les cellules du cumulus, qui étaient encore solidaires de l'ovocyte au stade 2-pronoyaux, se détachent progressivement entre le stade 2-pronoyaux et le stade 8-cellules et ont totalement disparu aux alentours de 5 à 7 jours post ovulation. Au stade 8-cellules, certains embryons présentent encore une couche de cellules du cumulus (Bysted, 2001) alors que d'autres en sont totalement dépourvus (Tsutsui, 1975a). La synchronisation du développement embryonnaire, décrite par certains auteurs (Tsutsui, 1989 ; Renton et al., 1991), dépend de la chienne et n'est pas systématiquement observée (Bysted et al., 2001 ; Reynaud et al., 2005). Ainsi peut on observer dans une même cohorte des stades allant de 2- à 8-cellules (Figure 8 ; Reynaud et al., 2005).



*Figure 8 : Cohorte d'embryons canins collectés in vivo 5 jours post ovulation.*

Après la fécondation, les embryons au stade 2-pronoyaux ont été observés entre 72 et 124 heures (3 à 5 jours) après l'ovulation, dans les parties médiale et distale de l'oviducte. Les stades 2-cellules sont observés entre 96 et 168 heures (4 à 7 jours). Le diamètre de l'embryon est alors compris entre 110 et 170 μm (Tsutsui, 1975a ; England et al., 2001). Le zygote subit à partir de ce moment un cycle de division toutes les 24 heures environ, et ce jusqu'au dixième jour après l'ovulation (Bysted et al., 2001).

Les embryons 8-cellules, stade auquel a lieu l'activation majeure du génome embryonnaire chez le chien (Bysted et Greve, 2000), sont observés entre 112 et 288 heures (4,5 à 12 jours) après l'ovulation. Aux stades 8- et 16-cellules, le diamètre de l'embryon varie de 188 à 200  $\mu\text{m}$  (zone pellucide incluse ; Holst et Phemister, 1971 ; Tsutsui, 1975a), et les embryons se trouvent dans la partie distale de l'oviducte.

Plus tardivement (204 à 240 heures, soit 8,5 à 10 jours, après l'ovulation), des morulas font leur apparition. Le passage dans l'utérus a lieu au stade morula ou blastocyste précoce (10 à 12 jours après l'ovulation ; Tsutsui, 1975a). La durée du séjour oviductal est donc particulièrement longue chez la chienne, puisque cette phase ne dure que 2 jours chez la truie et 4 à 5 jours chez la vache (Betteridge, 1995). Le blastocyste tardif n'est trouvé qu'au niveau des cornes utérines (Renton et al., 1991).



*Figure 9 : Cohorte de blastocystes canins expansés collectés 11 jours post ovulation.*

La taille de l'embryon augmente rapidement en passant du stade blastocyste précoce (215 à 350  $\mu\text{m}$ ) au stade blastocyste expansé (500 à 750  $\mu\text{m}$ , 12 jours post ovulation), puis au stade blastocyste tardif (1000  $\mu\text{m}$  ; Holst et Phemister, 1971 ; Renton et al., 1991 ; Tsutsui, 1989). Entre les stades blastocystes précoces et tardifs, la zone pellucide subit un amincissement (Renton et al., 1991). Les embryons flottent alors encore librement dans la lumière utérine et continuent leur croissance jusqu'à atteindre 2300  $\mu\text{m}$  (Holst et Phemister, 1971). La phase de vie libre des embryons est particulièrement longue chez la chienne, puisque l'implantation n'a lieu que vers 18 à 20 jours post ovulation pour une durée de 63

jours. En comparaison, l'implantation de l'embryon bovin a lieu également vers 18 à 19 jours mais la durée de la gestation est de 280 jours.

Avant qu'ils ne s'implantent, une migration transutérine des embryons peut avoir lieu entre 12 et 17 jours après l'ovulation. Ce phénomène est aussi décrit dans d'autres espèces multipares, comme la truie ou la chatte, et est observée dans un peu moins d'une chienne sur deux. Ce phénomène aurait probablement pour intérêt de répartir les fœtus entre les deux cornes utérines lorsque le nombre d'ovulations (et donc d'embryons) est très déséquilibré entre les deux ovaires (Tsutsui, 1975b ; Shimizu et al., 1990).

Aux alentours de 16 à 20 jours après l'ovulation (Gier, 1950 ; Holst et Phemister, 1971 ; Concannon et al., 2001), le blastocyste atteint 2500 µm de diamètre et déchire sa zone pellucide. Le mécanisme de cette déchirure (origine mécanique ou enzymatique) n'a pas encore été étudié chez la chienne.

Si le passage dans l'utérus et l'implantation sont effectivement plus tardifs pour l'embryon canin que dans les autres espèces, le développement embryonnaire par lui-même n'est pas particulièrement lent chez la chienne : cette idée communément admise provient du délai de 48 à 72 heures qui s'écoule entre l'ovulation et la fécondation. Dès lors que le déroulement du développement embryonnaire est décompté à partir de la fécondation, sa cinétique s'avère comparable à celle de l'embryon des autres mammifères. Les particularités de la biologie du développement canin tiennent donc plus à l'ovocyte qu'à l'embryon.

## **B. La maturation ovocytaire canine in vitro** **et les biotechnologies de la reproduction**

Au-delà de l'insémination artificielle, les bases des biotechnologies de la reproduction sont la récolte d'ovocytes, leur maturation puis leur fécondation in vitro afin d'obtenir des embryons. S'ajoutent à ces techniques la récolte d'embryons et le clonage. Même si aucune n'est au point dans l'espèce canine, toutes ont été tentées, certaines très fréquemment (comme la maturation in vitro) et d'autres seulement exceptionnellement, telles que le clonage. La transgénèse par microinjection de transgène dans l'embryon n'a jamais été tentée chez le chien ; par contre des cellules embryonnaires souches ont été obtenues dans l'espèce canine (Hatoya et al., 2006), mais elles n'ont pas encore été utilisées pour tenter la formation de chimères ou la transgénèse.

## 1. La collecte des ovocytes

L'ovaire renferme au cours du cycle sexuel des ovocytes à des stades de maturation très variés, allant des stades très précoces de la réserve ovarienne du cortex, jusqu'aux ovocytes des follicules préovulatoires, encore immatures puisqu'ils n'ont pas repris leur méiose. Comme nous l'avons détaillé plus haut, les stades les plus avancés de la maturation ovocytaire in vivo sont retrouvés dans l'oviducte, après l'ovulation. Tous ces stades ovocytaires, ayant déjà subi une maturation in vivo plus ou moins poussée, peuvent être utilisés en biotechnologie de la reproduction, et nécessitent des moyens de récolte adaptés. Ces méthodes sont plus ou moins lourdes à mettre en place, altèrent plus ou moins la fertilité future de la chienne et présentent un rendement très variable.

### a) La réserve ovarienne du cortex

Cette source d'ovocytes très immatures n'a été utilisée qu'exceptionnellement chez la chienne. Des fragments de cortex ovariens sont prélevés puis transplantés (avec ou sans cryoconservation) chez des souris SCID ou Nude (lignées immunodéprimées ne rejetant pas les greffons), afin d'y reconstituer une folliculogenèse in vivo. Deux essais préliminaires ont suivi le devenir de fragments ovariens canins cryoconservés, après greffe sous la capsule rénale ou dans la bourse ovarique de souris SCID (Metcalfé et al., 2001 ; Ishijima et al., 2006). Aucun développement de follicule au stade antral n'a été observé, mais le suivi des greffes n'a été effectué que pendant des durées allant de 30 à 56 jours. Or, seuls les follicules primordiaux et primaires survivent à la congélation/décongélation et la durée de la folliculogenèse complète, inconnue chez la chienne qui présente un cycle long, est néanmoins de l'ordre de 5 à 6 mois chez la femme et la vache (Gougeon, 1996 ; Driancourt et al., 2001). Ces deux expériences montrent une survie du greffon, voire une production endocrinienne. A terme, si le stade de follicule antral ou préovulatoire peut être obtenu, ces follicules pourront être ponctionnés chez la souris elle-même. Les ovocytes collectés seront alors mis en maturation in vitro.

Une alternative à cette xénogreffe chez la souris serait la folliculogenèse in vitro : cette technique permet à partir de fragments d'ovaires, d'obtenir la croissance des follicules primordiaux jusqu'au stade préovulatoire et l'ovulation d'un ovocyte fécondable chez la souris en 22 jours (Miyano, 2005). Elle n'est actuellement au point dans aucune autre espèce. Enfin, pour les cas de stérilisation précoce (en cas de traitement anticancéreux ou pour les chiennes guides d'aveugle ou d'aide aux handicapés et les chiens de travail), les fragments ovariens cryoconservés pourraient aussi être transplantés chez la chienne donneuse elle-

même, par auto-greffe orthopique (position anatomique normale, autorisant une reproduction par saillie ou insémination) ou hétérotopique (sous la peau, par exemple, nécessitant ensuite une ponction folliculaire suivie de production d'embryons in vitro).

b) Les petits follicules antraux

Plusieurs protocoles ont été décrits pour récolter les ovocytes de petits follicules antraux. Ces follicules étant trop petits pour être visualisés à l'œil nu, la méthode de ponction à l'aiguille donnant de bons résultats chez la souris n'est pas utilisable chez la chienne. La méthode la plus utilisée, et assortie du meilleur rendement, consiste à extraire les ovocytes du follicule en dilacérant les ovaires à la lame de rasoir puis à agiter l'ovaire dans un milieu liquide (Fujii et al., 2000). La population d'ovocytes ainsi obtenue est très hétérogène et il faut réaliser une sélection sévère pour éliminer tous les ovocytes dégénérés ou de mauvaise qualité. Toutes les études effectuées sur la maturation in vitro canine soulignent l'importance des trois critères majeurs de sélection des ovocytes : 1) le cytoplasme de l'ovocyte doit être de forme sphérique, de couleur sombre et homogène ; 2) le diamètre cytoplasmique doit être au minimum de 100  $\mu\text{m}$  et 3) le cumulus doit être formé d'au moins deux couches complètes de cellules (Reynaud et al., 2004 ; Luvoni et al., 2005). Une étude a démontré que le diamètre de l'ovocyte avait un rôle plus important que le stade ovarien (Otoi, 2001). En effet, pour un même diamètre ovocytaire (<100  $\mu\text{m}$ , de 100 à 110  $\mu\text{m}$  et  $\geq 120 \mu\text{m}$ ), les taux de métaphase II obtenus après maturation in vitro sont indépendants du stade ovarien (anœstrus, præstrus/œstrus ou metœstrus). Cette étude suggère que les différences entre les taux de maturation in vitro observés pour les différents stades ovariens s'expliqueraient par la différence de fréquence des tailles ovocytaires : le diamètre ovocytaire moyen est de 104  $\mu\text{m}$  en anœstrus contre 119  $\mu\text{m}$  pendant la phase de croissance folliculaire. La sélection sur les trois ci-dessus conduit à élimination de 60% des ovocytes récoltés en moyenne (Fujii et al., 2000).

La méthode de dilacération de l'ovaire permet d'obtenir après sélection morphologique, environ 75 ovocytes par chienne en anœstrus (Fujii et al., 2000). C'est la technique la plus couramment utilisée pour les études fondamentales menées sur l'ovocyte canin et sa maturation in vitro. A l'inverse, dans le cadre de la pratique clinique, cette technique ne présenterait un réel intérêt qu'immédiatement après la mort d'une chienne ou éventuellement, avant un traitement stérilisant (chimio- ou radiothérapie).

### c) Les gros follicules antraux en croissance terminale

Les follicules préovulatoires de 2 à 8 mm de diamètre sont bien visibles à la surface de l'ovaire pendant le proœstrus et l'œstrus, et peuvent donc être ponctionnés après ovariectomie de la chienne (Yamada et al., 1992 ; Reynaud et al., 2005). Néanmoins, l'ovariectomie ne peut être retenue comme technique de collecte d'ovocytes chez des chiennes saines et devant conserver leur potentiel reproducteur. Chez les bovins, la collecte intrafolliculaire d'ovocytes est réalisée par ponction sous contrôle échographique ou, moins couramment, par voie endoscopique (Ovum Pick-Up, OPU, Pieterse et al., 1988). Les vaches peuvent être ainsi prélevées une à deux fois par semaine pendant plusieurs mois, sans conséquence sur leur fertilité ultérieure (Gibbons et al., 1994). Cette technique n'a encore jamais été décrite chez la chienne, qui présente plusieurs obstacles anatomiques et physiologiques en compliquant la réalisation : la taille des follicules est faible (au maximum 7 mm de diamètre contre 20 mm chez la vache ou 45 mm chez la jument) et la période pendant laquelle des follicules peuvent être ponctionnés est courte (environ une semaine sur les six mois d'un cycle).

La collecte d'ovocytes pourrait également être envisagée chez la chienne sous cœlioscopie. Néanmoins, la bourse ovarique ne permet pas l'extériorisation de l'ovaire et devrait donc être incisée, geste susceptible de provoquer la formation d'adhérences et donc de gêner la répétition de cet acte. Que l'option soit échographique ou cœlioscopique, elle nécessite l'anesthésie générale de la chienne (ce qui n'est pas nécessaire chez les vaches ni les juments). De plus, l'inefficacité des protocoles de superovulation ne permet pas d'augmenter le nombre de follicules ponctionnables par cycle.

Quelque soit la méthode utilisée, la récolte d'ovocytes par ponction de follicules en croissance terminale (proœstrus et œstrus) ne permet d'obtenir que peu d'ovocytes (une douzaine maximum), et après un travail lourd de suivi échographique et hormonal de la chienne pour bien caractériser le stade de récolte.

### d) L'oviducte en période post-ovulatoire

Dès quelques heures après l'ovulation, les ovocytes passent dans l'oviducte pour y terminer leur maturation. Après ovariectomie, l'oviducte peut être facilement individualisé et sa lumière peut ensuite être rincée à l'aide d'un cathéter introduit à l'une ou l'autre des extrémités (Reynaud et al., 2005). Cette technique permet de récolter des ovocytes ayant déjà atteint le stade métaphase II mais présente les mêmes inconvénients que la ponction de follicules préovulatoires, à savoir un suivi lourd de la chienne pour préciser le moment de la récolte pour un nombre d'ovocyte limité (un douzaine par chienne au maximum). De plus,

elle nécessite de stériliser la chienne puisque la manipulation de l'oviducte en place dans la chienne est délicate. Une étude récente a évalué la récolte intra oviductale d'ovocytes par laparotomie, 72 heures après l'ovulation (Hossein et al., 2007). Le taux d'ovocytes récoltés était d'environ 90% (par rapport au nombre de corps jaunes comptés lors de la laparotomie après incision de la bourse ovarique) et 63 à 75% de ces ovocytes étaient considérés de bonne qualité (critères morphologiques). Si la récolte intra oviductale par laparotomie est faisable, aucune donnée n'est connue sur sa répétabilité sur la même chienne ni sur l'incidence sur le potentiel reproducteur ultérieur de la chienne.

## 2. Maturation ovocytaire in vitro

La reprise et l'achèvement de la méiose (passage du stade prophase I au stade métaphase II) sont facilement obtenus in vitro chez les mammifères autres que la chienne (et la femme) : chez les bovins par exemple, 90 % des ovocytes mis en culture sont passés au stade haploïde après 24 heures passées dans un milieu supplémenté (œstradiol, FSH, LH). Chez la chienne, après 72 à 96 heures de culture, et quel que soit le cocktail hormonal utilisé, seulement 5 à 10 % des ovocytes prélevés sur des ovaires en anœstrus atteignent le stade métaphase II. La plupart des ovocytes mis en culture (60 %) n'ont même pas repris leur méiose (Luvoni et al., 2005 ; Saint-Dizier et al., 2001). Même en utilisant des ovocytes issus de follicules préovulatoires (donc ayant déjà subi un début de maturation in vivo), le taux de métaphase II est seulement de 32 % (Yamada et al., 1992).

Cette inefficacité de la maturation in vitro chez la chienne est probablement à mettre en rapport avec le retard spécifique observé entre le pic de LH et la reprise de la méiose in vivo. La reprise de la méiose canine met probablement en jeu des facteurs oviductaux. En outre, environ 25 % des ovocytes canins dégénèrent pendant la culture (alors que ce taux est très faible dans les autres espèces) : l'analyse des facteurs sécrétés par l'oviducte, au cours des 72 premières heures après l'ovulation, serait donc indispensable pour identifier les facteurs nécessaires à la fois à la survie et à la reprise de la méiose des ovocytes. La mise en culture d'ovocytes, prélevés sur des ovaires en anœstrus, dans des oviductes maintenus en culture ex vivo a permis d'augmenter les taux de métaphase jusqu'à 32% (Luvoni et al., 2003), ce qui indique bien l'importance de ces facteurs oviductaux.

De nombreuses études ont été réalisées sur la maturation ovocytaire canine, afin d'essayer d'adapter les conditions de culture à la physiologie de la reproduction canine si particulière. De nombreuses données sont disponibles sur les effets de la composition du milieu et des conditions physiques de culture (passées en revue dans Reynaud et al., 2004 et

Luvoni et al., 2005). Ces études ne sont pas toujours évidentes à comparer puisqu'elles utilisent des moyens d'évaluation de la culture ayant des efficacités très différentes, et aucune n'a permis une amélioration appréciable de la maturation ovocytaire canine.

a) La composition du milieu de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés, des milieux simples, comme le mKRB (Modified Krebs Ringer Bicarbonate), le SOF (Synthetic Oviductal Fluid), ou des milieux dits complexes, comme le TCM 199 (Tissue Culture Medium), ayant une composition plus complète (sels inorganiques, acides aminés, vitamines). Le milieu le plus utilisé actuellement est le TCM199. Une étude comparant le TCM199 à un autre milieu complexe, le CMRL1066, a montré que ce dernier ne serait pas adapté à la culture in vitro d'ovocytes canins (Songsasen et al., 2002). Ces deux milieux ont des compositions assez différentes (le CMRL ne contient pas d'hypoxanthine, moins de vitamines et est plus riche en cystéine et en acide ascorbique) mais les composés responsables de la meilleure efficacité du TCM199 ne sont pas connus.

Au milieu de base utilisé en culture peuvent être ajoutés différents composés visant à améliorer la qualité de la maturation in vitro en se rapprochant des compositions intra-folliculaires.

(i) Supplémentation par des hormones

La supplémentation en FSH (Follicle Stimulating Hormone), ayant un effet positif sur la reprise de méiose chez les autres espèces mammifères, n'a pas non plus d'effet aux concentrations usuelles (1 µg/ml). La LH, au même dosage, n'a pas d'effet positif sur les taux de reprise de méiose, ni seules, ni en association à la FSH. En association au β-mercaptoéthanol, la LH diminue fortement les taux de reprise de méiose (Songsasen et al., 2002).

L'ajout de progestérone au milieu de MIV mime le contexte de lutéinisation préovulatoire de la chienne. Néanmoins, la progestérone non plus n'a pas d'effet sur la reprise de méiose. Cependant, les concentrations testées in vitro (1 et 2 µg/ml ; Hewitt et England, 1997 et Kim et al., 2005 respectivement) sont largement inférieures aux concentrations intrafolliculaires observées physiologiquement (7,5 à 11 µg/ml ; Metcalfe, 1999 et Marseloo, 2005 respectivement). Seule une étude récente a utilisé en culture une supplémentation en progestérone (20 µg/ml) plus proche des concentrations intrafolliculaires physiologiques, seule ou en association à l'œstradiol (20 µg/ml) et conclut à un effet positif de la progestérone en culture (Vannucchi et al., 2006). Cependant cette conclusion doit être relativisée. En effet,

cette étude utilise une méthode peu précise de détermination du stade nucléaire (microscopie optique à fluorescence et marquage de l'ADN au Hoechst) source d'erreurs et d'un taux non négligeable de stades restant indéterminés. De plus, le taux de métaphase II est nul, que ce soit dans le groupe témoin ou dans les groupes supplémentés avec de la progestérone. De plus il serait pertinent de prendre en compte non seulement les concentrations intrafolliculaires en progestérone (qui pourrait influencer sur la maturation cytoplasmique pré-meiotique finale) mais aussi de la concentration en progestérone du liquide oviductal, actuellement inconnue, puisque la reprise de la méiose a lieu au cours du transit tubaire. Le taux de progestérone tubaire, qui reste donc à mesurer, dépend non seulement du taux de progestérone circulant, de l'ordre de 40 ng/mL au moment d'apparition du stade métaphase II, mais aussi peut être de la progestérone contenue dans le liquide folliculaire, celui-ci étant éventuellement collecté par l'oviducte. Si le rôle de la progestérone sur l'ovocyte canin est encore inconnu, il est par ailleurs bien établi que ce stéroïde favorise la réaction acrosomique du spermatozoïde canin (Sirivaidyapong et al., 1999).

Différentes hormones de croissance (hST : hormone de croissance humaine, bST : hormone de croissance bovine) ont été ajoutées aux milieux de maturation. La bST accélère la reprise de méiose et augmente significativement le nombre d'ovocytes atteignant la métaphase II chez le renard (Luvoni et al., 2005). Aucune amélioration des taux de maturation in vitro n'est apportée par cette hormone n'a pour autant été mise en évidence chez le chien, mais elle favorise l'expansion du cumulus, phénomène physiologique succédant au pic de LH in vivo mais rarement observé en maturation in vitro (Songsasen et al., 2002).

(ii) Supplémentation par des protéines

La plupart des milieux testés pour la maturation in vitro canine sont supplémentés en protéines, sous forme de sérum albumine bovine (BSA) et de différents sérums animaux (sérum de veau fœtal, de vache, de chienne en anœstrus ou en œstrus, de chiot). Une augmentation significative des taux de reprise de méiose peut être observée (jusqu'à 36% de stades métaphase I et II pour 0,3% de BSA, Hewitt et al., 1998), mais elle reste peu importante. De plus, la composition exacte de ces sérums reste inconnue et très variable. La culture sans supplémentation en protéines est possible et permet (à de faibles taux) la reprise de méiose, la fécondation in vitro, le développement jusqu'aux stades précoces embryonnaires (Songsasen et al., 2002).

(iii) Supplémentation par des sources d'énergie

L'ajout de glucose, ayant un effet positif chez la souris, n'a pas d'effet et diminue même le taux de reprise de méiose chez le chien à forte dose (11 mM ; Songsasen et al., 2002). L'ajout de pyruvate (0 à 2.5 mM) et de glutamine (0 à 4 mM) n'a pas d'effet significatif sur la maturation nucléaire des ovocytes canins (Songsassen et al., 2007).

(iv) Conditions antioxydantes

L'ajout de  $\beta$ -mercaptoéthanol (anti-oxydant), améliorant la maturation nucléaire chez la vache (Mizushima et Fukui, 2001), n'a pas d'effet significatif chez le chien (Songsasen et Apimeteetumrong, 2002).

Les conditions usuelles de culture sont une température de 37 à 39°C en atmosphère modifiée (5% de CO<sub>2</sub>, 5% d'O<sub>2</sub>, saturation en eau), mais leur effet positif n'a pas été clairement démontré chez le chien. Chez la chienne, la réduction du taux en oxygène de l'atmosphère (20%) à 5% ne semble pas avoir d'effet (Songsasen et al., 2002). Lorsque la culture est réalisée en goutte sous huile, l'huile a alors pour but de protéger le milieu de culture de l'atmosphère, limitant ses effets oxydants. Elle a cependant comme inconvénient d'attirer les composés lipophiles hors du milieu de culture.

b) Les conditions de culture

La densité des ovocytes aurait une influence sur le taux de reprise de méiose in vitro en anœstrus. En effet, le taux de métaphase II est significativement plus important en cultivant 10 ovocytes que 5 ovocytes dans 100  $\mu$ l de milieu (16,2% et 4,6% respectivement ; Otoi et al., 2002).

La durée optimale de maturation in vitro chez la chienne, 72 heures, est beaucoup plus longue que celle applicable aux autres mammifères (expulsion du globule polaire dès 16h de culture chez la vache, Park et al., 2005). Le taux de métaphase est en effet maximal à 72h, et l'augmentation de la durée à 96h n'apporte aucune amélioration de ce taux et augmente même le taux de dégénérescence (Otoi et al., 2004).

c) Les co-cultures

Face à tous ces essais infructueux de maturation in vitro et afin de se rapprocher des conditions de maturation in vivo, quelques essais de co-culture d'ovocytes avec des cellules oviductales ont été réalisés mais ni les cellules oviductales bovine ni les cellules canines n'ont permis d'améliorer significativement les taux de métaphase II obtenus (Hewitt et England, 1999 ; Bogliolo et al., 2002 ; Vannucchi et al., 2006). Lorsque des ovocytes sont cultivés ex

vivo dans un oviducte de chienne en anœstrus, les taux de métaphases (I et II) augmentent significativement, atteignant 12 à 32% (Luvoni et al., 2003). Ce principe de culture semble prometteur et mériterait d'être approfondi, afin d'améliorer la survie de l'oviducte ex vivo (48 heures maximum) et en utilisant des oviductes de chiennes en période post-ovulatoire.

### 3. La fécondation in vitro

La fécondation présente in vivo un excellent rendement (81% ; Reynaud et al., 2005) et la polyspermie n'y est pas décrite. A l'inverse, in vitro, le taux de fécondation est très faible chez la chienne, entre 10 et 20 % (Mahi et Yanagimashi, 1976 ; Saint-Dizier et al., 2001), alors qu'il atteint couramment 80 à 90 % chez les bovins. De plus, le taux de polyspermie est particulièrement élevé in vitro : 47 % des ovocytes fécondés, avec entre 2 et 12 spermatozoïdes par ovocyte (3,3 en moyenne, Saint-Dizier et al., 2001).

La technique d'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) pourrait apporter une solution à la fois au faible taux de fécondation et au fort taux de polyspermie. Elle pourrait aussi être utilisée dans les cas d'oligo-asthénospermie, qui est l'indication majeure de la technique en médecine humaine. Dans l'espèce canine, l'utilisation de l'ICSI n'a été décrite qu'une seule fois (Fulton et al., 1998). Malgré la bonne qualité du sperme utilisé dans cette étude, seulement 8 % des ovocytes micro-injectés ont formé deux pronoyaux. Leur développement ultérieur n'a pas été observé.

La fécondation in vitro serait importante à maîtriser, d'une part pour avoir accès à la production d'embryons in vitro, et d'autre part comme outil d'évaluation de la maturation in vitro. En effet, la qualité de la maturation cytoplasmique de l'ovocyte est généralement évaluée par le taux de fécondation normal et de développement embryonnaire précoce. Nous ne savons cependant pas si l'échec actuel de la fécondation in vitro canine est lié à la mauvaise qualité de la maturation cytoplasmique, à une technique de fécondation in vitro inadaptée, ou aux deux facteurs.

### 4. Développement embryonnaire in vitro et transfert

Chez les bovins, le taux de blastocystes moyen obtenu 7 jours après la fécondation in vitro est de 30%, parmi lesquels on obtiendra un taux de gestation de 50% après transfert chez des femelles receveuses (Van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Chez la chienne, comme nous l'avons décrit plus haut, chacune des étapes de la production d'embryons in vitro reste du domaine de la recherche et aucune n'est au point. Comparativement, le nombre d'études est

élevé sur la maturation in vitro, bien moindre sur la fécondation in vitro et les travaux concernant la culture embryonnaire in vitro restent exceptionnels. Le rendement de la production d'embryons in vitro (maturation, fécondation puis culture) est actuellement très faible, au point qu'un seul travail décrit l'obtention d'un blastocyste après 9 jours de culture in vitro pour 217 ovocytes mis en maturation (Otoi et al., 2000). Un seul essai de transfert in vivo est également recensé : après la mise en maturation de 169 ovocytes au stade préovulatoire et leur fécondation in vitro, 90 « embryons » ont été transférés, après 3,5 à 5,5 jours de culture, chez une seule receveuse (England et al., 2001). Une gestation de trois conceptus a été obtenue, mais ceux-ci sont morts vers 21 jours de gestation. Le moindre résultat obtenu dans ce domaine chez la chienne appartient au domaine de l'exceptionnel. Ces faibles taux de développement révèlent la mauvaise qualité des ovocytes (au sens de leur aptitude à assurer le développement embryonnaire) et/ou des conditions de maturation ou de fécondation inadéquates. Des études fondamentales sur l'ovocyte et sa maturation, in vivo et in vitro, revêtent donc une importance centrale.

La production d'embryons in vitro aurait pourtant plusieurs intérêts spécifiques, supplémentaires par rapport à ceux du transfert d'embryons obtenus in vivo : tout d'abord, une augmentation du nombre de descendants par femelle génétiquement intéressante (sous réserve du rendement et de la possibilité ou non d'obtenir des ovocytes hors de la phase œstrale). L'autre intérêt serait de permettre la reproduction d'animaux infertiles en saillie ou en insémination artificielle, en particulier de femelles souffrant de cycles anovulatoires.

## 5. Le clonage

Quatre chiots, appartenant à deux portées, ont été obtenus à partir d'embryons issus du transfert de cellules cutanées auriculaires adultes dans des ovocytes au stade métaphase II récoltés in vivo (Lee et al., 2005 ; Parker et al., 2006 ; Jang et al., 2007). Les embryons reconstitués ont été transférés chez des femelles spontanément synchrones des femelles donneuses. Le rendement est beaucoup plus faible que chez les autres mammifères : sur les 1095 embryons obtenus par transfert nucléaire, deux chiots clonés sont nés, l'un est mort à l'âge de 22 jours. Le chiot survivant (un mâle lévrier afghan nommé SNUPPY pour « Seoul National University Puppy ») a été le premier chiot officiellement issu de clonage, avec un rendement de 0,1%. Une autre étude a rapporté un rendement de 1,7% en obtenant la naissance de trois femelles lévrier afghan dans une même portée, après transfert de 167 embryons reconstitués chez 12 femelles receveuses (Jang et al., 2007).

La difficulté d'obtention d'ovocytes canins au stade métaphase II a conduit à la réalisation de transferts nucléaires hétérosécifics : transfert de cellules adultes canines dans des cytoplasmes provenant d'ovocytes bovins. Ces transferts intersécifics ont permis d'obtenir d'excellents taux de clivage (74 à 81%) et un taux de développement embryonnaire tardif plus important que par fécondation in vitro (1,3 % morulas – 0,4% blastocystes ; Westhusin et al., 2001 et 2003 ; Murakami et al., 2005), mais aucun développement à terme n'a jamais été obtenu.

La principale application du clonage des canidés serait la sauvegarde de génotypes intéressants. Le clonage permettrait de créer une réplique d'un animal, permettant d'empêcher ses caractéristiques génétiques de disparaître à sa mort. Ceci pourrait s'appliquer aux canidés appartenant à des espèces en voie de disparition, aux champions de beauté ou de travail, ou aux chiens de particuliers lorsque les propriétaires y sont très attachés. Ainsi, dans le cadre de la lutte contre la disparition de canidés sauvages en voie d'extinction, deux louveteaux ont été obtenus récemment par transfert nucléaire (Kim et al., 2007). Le clonage pourrait également permettre de générer des lots de chiens génétiquement identiques, qui représenteraient des outils puissants pour la recherche biomédicale (modèles de maladies humaines).

Le clonage canin soulève cependant des questions d'ordre éthique. Le clonage somatique fait apparaître, chez environ 30 % des fœtus et nouveau-nés bovins, des anomalies graves, regroupées sous le terme « Large Offspring Syndrom » : hyperdéveloppements du placenta, croissance fœtale excessive, anomalies cardiaques et immunitaires, troubles de la croissance de certains organes (Renard et Chavatte-Palmer, 2004). Elles conduisent le plus souvent à la mort du clone avant sa naissance ou dans les premières semaines de vie, et parfois aussi à la mort de la femelle receveuse. Ces possibles atteintes au bien-être animal prennent une importance particulière dans l'espèce canine, en raison de l'importance sociale du chien aux côtés de l'Homme et de sa place particulière au sein de la famille.

## C. Spécificités expérimentales de l'étude de la maturation ovocytaire chez la chienne

Nous venons de passer en revue les spécificités que présente la reproduction canine, tant in vivo qu'in vitro. Le retard des biotechnologies de la reproduction dans cette espèce est lié en partie à ces particularités physiologiques, mais aussi à des limites d'ordre technologiques, économiques et sociales. L'intérêt de l'étude de ce modèle ne paraît pas toujours évident de prime abord. En effet, le gain économique potentiel qui serait permis par les biotechnologies de l'embryon chez la chienne est beaucoup plus faible que celui obtenu chez les bovins ou les équins par exemple. De plus, il peut aussi sembler paradoxal de mettre au point des techniques avancées de reproduction dans cette espèce, alors que la plupart des pays souffrent de surpopulation canine et que la reproduction naturelle globale est considérée comme suffisante, voire excédentaire (Zawistowski et al., 1998 ; McNeil et Constandy, 2006 ; Purswell et Kolster, 2006).

Pourtant, quelques équipes (très peu nombreuses, de l'ordre de 7) à travers le monde persistent à essayer d'améliorer les biotechnologies de la reproduction canine. En effet, dans la société actuelle, l'importance du rôle sociétal du chien est en pleine expansion. Le chien a pris un rôle à part entière dans la famille, dans le travail (chiens de bergers, pompiers, policiers), dans le domaine de la santé (chiens d'assistance aux handicapés, rôle de sociabilisation) et dans la recherche biomédicale (modèle de maladies génétiques humaines dont les myopathies, Sampaolesi et al., 2006). De plus l'accès aux biotechnologies de la reproduction canine participerait aux politiques de préservation de la biodiversité génétique, en apportant un modèle domestique d'étude pour les espèces de canidés en voie de disparition, telles que le lycaon, le loup rouge, le loup mexicain et plusieurs renards. C'est ainsi par exemple que l'équipe coréenne de Kim et al. (2007) qui a mis au point le clonage du chien a ensuite réussi le clonage du loup gris (*Canis lupus*). L'intérêt purement cognitif, de compréhension de modalités de physiologie de la reproduction différentes de celles partagées par les femelles d'autres mammifères existe, mais peu de travaux disponibles dans la littérature en témoignent. Pour la maturation ovocytaire, les publications traitent en grande majorité d'essais techniques (approches empiriques de la maturation in vitro) et peu d'expérimentations visent à élucider les mécanismes de reprise de la méiose.

Les équipes qui étudient la biologie de la reproduction canine se heurtent à des difficultés nombreuses, allant de la rareté du matériel biologique aux difficultés

technologiques rencontrées pour étudier l'ovocyte et à la difficulté de confronter les résultats obtenus entre les différentes équipes. Ces difficultés d'études ont pour conséquence le manque de données bibliographiques sur la maturation ovocytaire canine in vivo. En effet, bien que des études sur la maturation in vitro soient régulièrement publiées, la lourdeur d'une étude in vivo fait que ce modèle physiologique conserve encore une grande partie de son mystère.

### 1. Rareté du matériel biologique

Le matériel biologique nécessaire aux expériences (ovaires et ovocytes canins) est rare : chez les espèces consommées pour leur viande, l'abattoir permet de collecter de ovaires en très grand nombre, ce qui n'est évidemment pas le cas chez la chienne, au moins en Europe. Dans les autres espèces mammifères, un traitement de superovulation est en général administré à la femelle donneuse pour augmenter le nombre d'ovocytes (ou d'embryons) à collecter. Malheureusement, la chienne ne répond pas ou mal aux traitements hormonaux de superovulation classiquement utilisés à base d'eCG (equine Chorionic Gonadotropin ; anciennement PMSG) et d'hCG (human Chorionic Gonadotropin ; Archbald et al., 1990 ; Yamada et al., 1992).

Si l'augmentation du nombre d'ovocytes ou d'embryons par femelle ne peut pas se faire par les protocoles de superovulation actuellement disponibles, une alternative pourrait être le raccourcissement de l'intervalle entre deux périodes de chaleurs, intervalle particulièrement long chez la chienne (environ six mois). Néanmoins, les protocoles hormonaux classiques d'induction des cycles (à base de progestagènes, œstrogènes et prostaglandines F2 alpha), efficaces dans les autres espèces, ne sont pas fiables chez la chienne. Des essais d'induction ont été conduits avec l'eCG combinée à l'hCG, ou avec des dopaminergiques, mais les molécules les plus prometteuses sont les agonistes du GnRH (desloréline principalement). Les résultats préliminaires obtenus, suite à des traitements par des agonistes du GnRH sous forme d'implants sous-cutanés ou d'injections intramusculaires répétées, ouvrent de très intéressantes perspectives, mais ces résultats nécessitent absolument d'être confirmés (Kutzler, 2005). Les implants de desloréline sont disponibles actuellement aux Etats-Unis et en Australie ; un implant contenant un autre agoniste (azagly-nafaréline, GONAZON<sup>ND</sup>, Intervet, Angers, France) a obtenu très récemment une Autorisation de Mise sur le Marché en France, ce qui devrait permettre de mieux évaluer l'intérêt de ces molécules pour l'induction de l'œstrus chez la chienne.

La mise au point de ces protocoles serait également très utile pour la maîtrise des cycles des receveuses d'embryons. Le recrutement de ces femelles, dont le cycle doit être synchrone de celui de la donneuse, est problématique du fait de l'impossibilité de maîtrise médicamenteuse. Le recrutement des donneuses se faisant donc sur cycles spontanés, un très grand effectif de femelles est nécessaire pour espérer pouvoir disposer de plusieurs femelles ovulant en même temps que la donneuse. Le décalage maximal entre donneuse et receveuse(s) compatible avec la gestation serait d'un à deux jours (Tsutsui et al., 2001a et b).

Au final, une chienne ne peut fournir qu'une dizaine d'ovocytes en maturation finale *in vivo*, et ce tous les six mois. De plus, la récolte des ovocytes nécessitant jusqu'à présent la stérilisation (voir plus haut), une chienne ne peut donc être utilisée qu'une seule fois. La dissection d'ovaires de chiennes en anœstrus permet de récolter un plus grand nombre d'ovocytes (75 ovocytes par chienne en moyenne ; Fuji et al., 2000) mais on peut s'interroger sur leur compétence méiotique et plus encore, développementale. Les études réalisées sur la maturation de l'ovocyte canin *in vivo* sont donc soit très longues à réaliser pour obtenir un effectif valable, soit réalisées sur un faible échantillon, ce qui est malheureusement le cas le plus souvent rencontré actuellement : 5 chiennes ( Kim et al., 2007), 8 chiennes (Archbald et al., 1980), 9 chiennes (Tsutsui, 1975), 10 chiennes (Renton et al., 1991), 17 chiennes ( Lee et al., 2006 ). Rares sont les études portant sur plus de vingt chiennes : 36 chiennes (Holst et Phemister, 1971), 50 chiennes (Reynaud et al., 2005), 124 chiennes (Hossein et al., 2007).

## 2. Définition de références de temps

L'étude de la cinétique de reprise de la méiose et de développement embryonnaire rend indispensable de définir des références temporelles. Plusieurs méthodes ont été utilisées jusqu'à présent chez la chienne, mais de technicité et d'exactitudes hautement variables. Elles concernent des signes cliniques d'expression des chaleurs (écoulements vulvaires, modifications comportementales de la chienne), des événements endocrinologiques ou la visualisation directe de l'ovulation. Les références classiquement utilisées dans les espèces mammifères sont l'observation du comportement d'œstrus, le pic de LH ou l'ovulation. Comme on cherche à disposer d'un critère utilisable instantanément, la détermination du moment de l'ovulation semble plus adéquate. Le moyen utilisé pour le déterminer doit présenter une variation minimale entre individus, quelque soit la race concernée. Le critère choisi doit aussi être facile à mettre en œuvre, pour pouvoir être utilisé par toutes les équipes à travers le monde et constituer ainsi une référence commune.

#### a) Utilisation de signes cliniques et comportementaux

Le début des pertes vulvaires sanguines a été utilisé pendant longtemps comme repère temporel, mais ce symptôme n'est corrélé que très imprécisément au moment de l'ovulation (Tsutsui, 1989). Les signes comportementaux associés au début des chaleurs ont aussi été utilisés pour évaluer le moment de l'ovulation : une étude prétend que l'ovulation a lieu 24 à 48 heures après la première acceptation d'accouplement de la femelle (Holst et Phemister, 1971). Cependant, des études plus complètes ont démontré depuis que la première acceptation du mâle avait lieu de 5 jours avant à 3 jours après l'ovulation (Concannon et al., 1977 ; Wildt et al., 1978 ; Renton et al., 1991).

Historiquement ces critères ont été les premiers à être utilisés et laissent aujourd'hui une grande imprécision dans l'utilisation du vocabulaire utilisé en reproduction canine. Les phases du cycle reproducteur au cours desquelles l'ovulation peut avoir lieu (prœstrus et œstrus) sont classiquement définies uniquement par la présence ou non d'écoulement vulvaires, associés ou non à l'acceptation de l'accouplement. Cependant, aucune de ces modifications n'apparaît de façon temporellement fixe par rapport à l'ovulation. D'autres fois, le prœstrus est confondu avec la période précédant le pic de LH et l'œstrus avec la phase préovulatoire.

L'utilisation des termes de prœstrus et d'œstrus doit donc être bannie du vocabulaire dans le domaine de la recherche car elle mène à trop d'imprécision, tant par la variation inter-individuelle qu'elle présente, que par la variation de ses définitions. Les termes de phases « pré LH » (avant le pic de LH), « post LH » (après le pic de LH et pré ou post ovulatoire) seraient à généraliser pour standardiser l'expression des résultats.

#### b) Utilisation de données endocrinologiques

Si l'association aux signes cliniques n'est pas très fiable, le moment de l'ovulation est très bien corrélé à deux événements endocriniens : le pic de LH et l'élévation de la progestéronémie. En effet, deux jours séparent le pic de LH et l'ovulation, avec une fourchette allant de 36 à 50 heures (Phemister et al., 1973 ; Concannon et al., 1989 ; England et Yaeger, 1993 ; Marseloo et al., 2004). Cependant même si le kit de dosage ELISA mis au point chez la brebis permet le dosage de la LH canine, la détermination du pic de LH n'est pas une méthode utilisable en routine pour des raisons de coût et de temps. De plus, elle nécessite deux à trois prises de sang par jour et les dosages sont faits à posteriori sur la série d'échantillons. Son utilisation est donc souvent limitée aux protocoles de recherche.

A l'opposé, le dosage de la progestérone dans le sérum peut quant à lui être réalisé facilement en routine, dans les laboratoires vétérinaires mais aussi dans les nombreux laboratoires d'analyse médicale humaine. La concentration sérique en progestérone mesurée au moment de l'ovulation est relativement constante, entre 5 et 7 ng/ml et ce quelle que soit la race de chienne (Concannon et al., 1989 ; Marseloo et al., 2004). Le suivi de la progestéronémie se trouve ainsi largement utilisé à l'heure actuelle pour la détermination du moment de l'ovulation tant dans le cadre de la recherche que de la clinique (détermination du moment optimal de l'insémination artificielle).

### c) Visualisation directe de l'ovulation

La laparotomie répétée ou l'endoscopie ont aussi été utilisées afin de visualiser directement les ovaires et de noter la présence de follicules préovulatoires ou la survenue de l'ovulation (Tsutsui, 1975b), mais ces méthodes très invasives induisent du stress et nécessitent une anesthésie, deux éléments susceptibles de perturber la survenue du pic de LH. Pour suivre la croissance folliculaire et observer directement l'ovulation en s'affranchissant des inconvénients présentés par la laparotomie, l'échographie ovarienne transabdominale a été récemment mise au point (Figure 10). Cette méthode requiert cependant une formation spécifique et un échographe de très bonne qualité, ce qui représente un investissement de départ important, mais elle est non invasive et ne nécessite pas même une tranquillisation. Elle permet un suivi en temps réel de l'ovulation sous réserve de réaliser deux ou trois échographies par jour (Fontbonne et al., 2004). A noter qu'un essai d'observation des ovaires par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) réalisé sur des chiennes anesthésiées a montré que cette technique n'est pas adaptée et ne permet ni de compter, ni de mesurer les follicules (Nöthling et al., 2006).



Figure 10 : Image échographique d'ovaire de chienne obtenue par voie transabdominale. Quatre follicules préovulatoires sont visibles (zones anéchogènes).

En conclusion et face à la longue durée de l'ovulation chez la chienne (24 à 36 heures, voir plus haut), la meilleure solution pour définir une chronologie précise de la maturation ovocytaire canine in vivo pourrait être sur la base d'un suivi de la progestéronémie, de coupler l'utilisation de l'échographie ovarienne au dosage du pic de LH, qui s'étend sur 36 heures en moyenne chez la chienne (de Gier et al., 2006).

### 3. Difficultés d'observation de l'ovocyte canin

Une fois qu'une équipe de recherche a surmonté les difficultés de récolte du matériel biologique et la caractérisation du moment du cycle, l'ovocyte canin se révèle sans doute le plus difficile à observer en comparaison à celui des autres mammifères. En effet, le cytoplasme de l'ovocyte canin est très riche en gouttelettes lipidiques, ce qui lui confère un aspect particulièrement opaque et sombre (Figure 11 ; Van der Stricht, 1923 ; Guraya, 1965). Ces gouttelettes lipidiques, composées principalement de phospholipides et de triglycérides, sont encore plus abondantes que dans les ovocytes félines et porcins possédant eux aussi un cytoplasme relativement sombre. L'accumulation des lipides dans l'ovocyte débute tôt après l'initiation de la croissance folliculaire, dès le follicule primaire (Tesoriero, 1981).



*Figure 11 : Complexe cumulo-ovocytaire canin issu d'un ovaire de chienne en anœstrus. Observation en microscopie optique. Le cytoplasme est opaque en raison d'une grande richesse en lipides.*

L'opacité du cytoplasme empêche la visualisation directe du noyau. La visualisation de la vésicule germinale ne peut donc pas se faire par simple observation en microscopie optique comme c'est le cas pour la souris, la femme ou la vache. Les essais de centrifugation des ovocytes pour déplacer les lipides et visualiser la vésicule germinale se sont avérés infructueux (Chastant-Maillard, communication personnelle). Les premières études utilisaient préférentiellement l'observation en microscopie optique de l'ADN coloré avec de l'acéto-orcéine après élimination des lipides par le phénol ou le chloroforme (Hewitt et al., 1998). Aujourd'hui, les méthodes les plus utilisées sont le marquage de l'ADN par un fluorochrome (Hoechst, ethidium homodimere II) avec observation en microscopie à fluorescence. Cependant dans ces conditions, les lipides gênent la détermination du stade nucléaire : avec un marquage de l'ADN au Hoechst 33342 détecté par microscopie optique à fluorescence, les stades nucléaires de 30% des ovocytes restent indéterminés. Une technique d'observation plus puissante comme la microscopie confocale (après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium) réduit le taux d'ovocytes dont le stade reste indéterminé à 1,4% (Saint-Dizier et al., 2004). L'utilisation de la microscopie confocale pour évaluer la maturation nucléaire a donc apporté un immense progrès : un taux de non détermination du stade nucléaire de 10 à 40%, comme en microscopie optique (Hewitt et al., 1998) représente un biais majeur dans l'analyse de résultats de reprise de méiose, quand le taux de métaphase II en fin de culture est en moyenne de 10 à 20%.

#### D. But de la thèse

L'ovocyte canin est donc une cellule rare, différente du modèle mammifère et complexe à étudier. Au vu des spécificités de la biologie du développement canin, de l'état actuel des connaissances sur la maturation ovocytaire chez la chienne, tant in vivo qu'in vitro, et du retard des biotechnologies disponibles dans cette espèce, il semble clair que la première étape clef à maîtriser soit la maturation ovocytaire. Or nous manquons d'éléments de connaissance sur la maturation in vivo. L'objectif de ce travail de thèse a donc été, dans un premier temps, de mieux décrire la maturation ovocytaire canine in vivo. Pour cela, nous avons cherché à établir précisément les événements intracellulaires de la maturation ovocytaire in vivo, en les replaçant dans le contexte physiologique si particulier de la chienne. Nous avons ainsi tenté de relier chronologiquement les principales étapes de la maturation ovocytaire canine avec le moment du pic de LH et de l'ovulation. Ces deux événements sont capitaux dans l'étude de la physiologie de la reproduction puisqu'ils sont intimement liés au moment optimal de la fécondation, aux stades du développement embryonnaire et à la date de la mise-bas (Luvoni, 2000 ; Reynaud et al., 2006). Il était donc indispensable pour décrire précisément la maturation ovocytaire d'utiliser le pic de LH et l'ovulation comme références temporelles. De plus, bien que la maturation in vivo nucléaire ait déjà été décrite (voir plus haut), peu d'informations sont disponibles sur la maturation cytoplasmique. Le choix de la microscopie électronique à transmission, permettant une description précise et simultanée des organites cytoplasmiques, du noyau et de la membrane, s'est donc imposé malgré sa lourdeur.

La réalisation d'une chronologie détaillée de la maturation ovocytaire canine in vivo a pour but non seulement de générer des connaissances fondamentales sur la biologie de l'ovocyte canin, mais aussi de réaliser un standard auquel nous pourrions dans un second temps comparer les ovocytes maturés in vitro. Si les techniques de maturation in vitro actuellement utilisées pour l'ovocyte canin sont inefficaces (très faibles taux de maturation nucléaire, de fécondation et des développements embryonnaires exceptionnellement observés), les causes de cet échec restent indéterminées. Les études ayant cherché à évaluer la maturation in vitro se sont limitées à une évaluation du stade nucléaire. Les rares essais de fécondation in vitro ont permis de mettre en évidence de forts taux de polyspermie et de non fécondation, sans permettre de déterminer les rôles respectifs d'une mauvaise qualité de l'ovocyte et de conditions de maturation et/ou de fécondation in vitro inadaptées. Les différents essais de modification des conditions de culture étant jusqu'à présent restés

infructueux, il était donc devenu capital de faire un bilan précis de l'état de maturation, tant nucléaire que cytoplasmique, des ovocytes canins avant et après culture. Ce bilan sera comparé aux observations réalisées in vivo dans la première partie de cette thèse et aux études réalisées sur la maturation in vitro des ovocytes des autres espèces de mammifères.

Nous espérons ainsi pouvoir un peu mieux comprendre le très faible succès actuel des biotechnologies de la reproduction canine et ouvrir de nouvelles pistes pour rattraper le retard dans ce domaine des canidés sur les autres espèces mammifères. Avoir accès à des techniques telle que la fécondation et le développement embryonnaire in vitro aurait de nombreuses applications, en particulier dans le domaine de la sauvegarde des canidés sauvages en voie d'extinction et dans l'éradication des tares génétiques présentes chez de nombreuses races canine (via le diagnostic préimplantatoire).

## **II. Approche ultrastructurale de la maturation ovocytaire canine in vivo**

### **A. Introduction**

L'observation que l'ovulation libère des ovocytes immatures au stade de vésicule germinale (VG) et non pas métaphase II a été décrite il y a un siècle (Van der Stricht, 1908), mais la maturation in vivo de l'ovocyte de chienne n'a pas été précisément décrite depuis. Le mécanisme responsable du retard de reprise de la méiose comparé aux autres espèces mammifères n'a pas non plus été identifié. Les ovocytes ovulés n'atteindront le stade métaphase II qu'après avoir passé 54 à 72h dans l'oviducte (Tsutsui et Shimizu, 1975 ; Reynaud et al., 2005). La cause de ce retard, les événements se déroulant durant cette période ainsi que les facteurs de régulation de reprise de méiose chez la chienne restent donc inconnus, et peu d'études se sont penchées sur la question.

Chez les autres mammifères, le pic de LH (Luteinizing Hormone) provoque la reprise de méiose en induisant la rupture des communications établies entre l'ovocyte et son cumulus, ce qui interrompt le transfert d'un signal inhibiteur exercé par le cumulus. Or chez la chienne, le délai entre le pic de LH et la reprise de méiose est particulièrement long (environ cinq jours ; Reynaud et al., 2005) et parallèlement, les communications ovocyte-cumulus se révèlent également particulières : le cumulus reste solidement attaché à l'ovocyte plusieurs jours après le pic de LH et l'ovulation (Reynaud et al., 2006a). La dénudation mécanique et chimique des ovocytes canins est beaucoup plus difficile que chez les autres espèces (Reynaud et al., 2004).

Ces informations soulèvent donc la question du rôle du pic de LH sur la structure du complexe ovocyte-cumulus (COC) et du rôle des cellules du cumulus dans la régulation de la méiose chez cette espèce.

De plus, la chronologie de la reprise de méiose n'est pas connue en détails. Les quelques études portant sur la maturation in vivo de l'ovocyte canin en période peri-ovulatoire ont été réalisées en microscopie soit optique (Van der Stricht, 1923 ; Holst et Phemister, 1971 ; Tsutsui et Shimizu, 1975) soit confocale (Reynaud et al., 2005). Ces études ont décrit la reprise de la méiose mais uniquement sous l'angle de la maturation nucléaire et/ou de

l'organisation du cytosquelette de l'ovocyte. Aucune donnée ultrastructurale n'est disponible pour la période de reprise de méiose in vivo. Les rares études ayant utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) sur des ovocytes canins sont peu détaillées et ont été réalisées sur des animaux prépubères (Haenisch-Woehl et al., 2003), sur les stades précoces de la folliculogénèse (Tesoriero, 1981), ou sur des ovocytes de petits follicules antraux de chiennes en métœstrus (Lopez et al., 2006).

Le but de notre étude est donc d'évaluer l'évolution du COC canin lors de la maturation finale in vivo, tant en terme de maturation cytoplasmique et nucléaire, que de communications ovocyte-cumulus. Nous avons couvert la période de maturation in vivo en observant en MET des ovocytes prélevés entre le début du proœstrus et le quatrième jour après l'ovulation. Afin d'obtenir une chronologie précise, le moment du pic de LH a été déterminé et l'ovulation a été précisément datée par échographie.

## B. Matériel et méthodes

Sauf indication contraire, tous les réactifs de l'étude proviennent de Sigma (St. Quentin-Fallavier, France).

### 1. Animaux

Vingt-cinq chiennes Beagle de notre chenil, âgées de 7 mois à 8 ans, ont été utilisées dans cette étude. Des frottis vaginaux ont été réalisés hebdomadairement pour détecter le début des chaleurs. Une fois l'entrée en chaleurs détectée, des prises de sang ont été réalisées à la veine céphalique ou jugulaire, jusque trois fois par jour, et le sang transféré dans des tubes en verre héparinés. Les échantillons ont été ensuite centrifugés pendant cinq minutes à 3000g, et le plasma a été soit immédiatement dosé en progestérone et stocké à -20°C pour le dosage ultérieur de LH. La croissance folliculaire et le moment de l'ovulation ont été suivis par échographie ovarienne transabdominale (échographe HDI3500, sonde 7,5 MHz ; ATL, Philips Systèmes Médicaux, Suresnes, France ; Reynaud et al., 2005).

Ce protocole a été approuvé par le comité éthique de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Le schéma expérimental est détaillé sur la Figure 12.

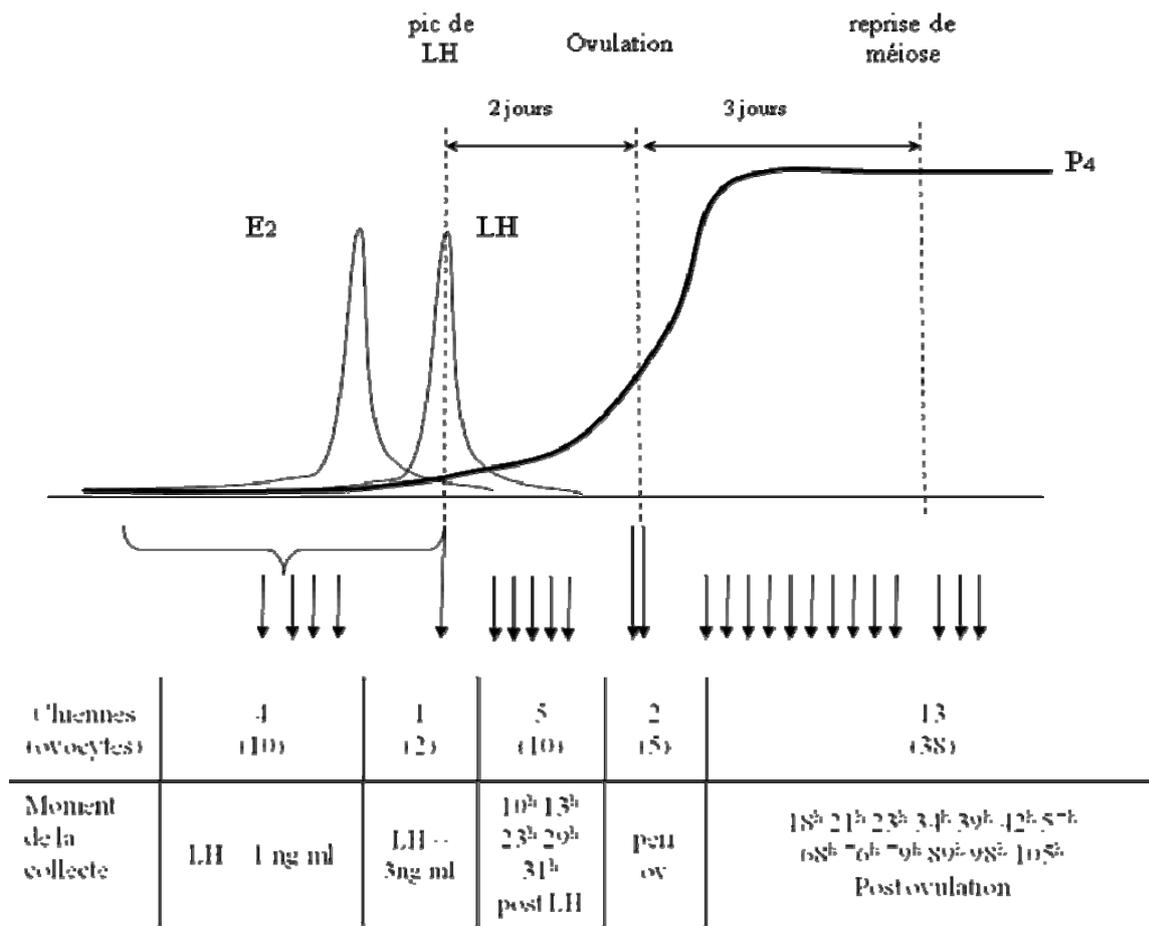


Figure 12 : Schéma expérimental. Répartition des 25 chiennes et des 65 ovocytes de l'étude en fonction des grands événements du cycle œstral. E<sub>2</sub> = œstrogènes, LH = hormone lutéinisante, P<sub>4</sub> = progestérone, péri ov = pendant l'ovulation.

## 2. Dosages hormonaux

La progestérone a été dosée dans les échantillons de plasma avec un kit de chemiluminescence sur un automate Elecsys 1010 (Roche Diagnostics, Meylan, France.). Les coefficients de variation inter- et intra-dosage étaient inférieurs à 5%. Les dosages de LH ont été réalisés avec un kit ELISA (ELISA method; kit LH detect; INRA, Nouzilly, France; Guerin et al., 1997). Le logiciel Microcal Origin (Microcal software, Northampton, USA) nous a permis de déterminer la courbe gaussienne la mieux adaptée au profil de la concentration de la LH et le centre de cette dernière a été utilisé comme temps de référence du pic de LH.

## 3. Récolte des ovocytes

Des ovariectomies ont été réalisées par une méthode chirurgicale conventionnelle à différents moments de la période de chaleurs : avant le pic de LH (n=4 chiennes), entre le pic

de LH et l'ovulation (groupe post-LH, n=6), au cours du processus d'ovulation (n=2) et après l'ovulation (n=13) (Figure 12). Les ovaires, les oviductes et l'apex des cornes de l'utérus ont été collectés. Avant l'ovulation, les diamètres folliculaires ont été mesurés et tous les follicules de plus de 3 mm ont été ponctionnés individuellement à l'aide d'une pipette Pasteur étirée. Les liquides folliculaires ont ensuite été examinés sous loupe binoculaire pour prélever les COCs. L'état de mucification du cumulus a alors été noté. Après l'ovulation, les COCs ont été récoltés par rinçage des oviductes avec du milieu de culture M199 supplémenté de 20% avec sérum de veau fœtal (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) à 38,5°C (Reynaud et al., 2005). Au moins deux COCs par chienne ont été examinés en MET.

#### 4. Microscopie Optique et Microscopie Electronique à Transmission

Les COCs ont été fixés 90 minutes dans une solution de glutaraldéhyde à 2% dans un tampon cacodylate de sodium à 0,1 M (pH=7,2) à 38,5°C puis stockés dans un mélange de cacodylate de sodium 0,1 M et de sucrose 0,2 M à 4°C. Les échantillons ont été post-fixés dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1% et de cyanoferrate de potassium à 1,5% puis contrastés à l'acétate d'uranyl. Ils sont ensuite déshydratés dans des bains d'alcool de titres croissants (30-100%). Les COCs ont été ensuite inclus dans de la résine époxy (Delta Microscopie, Labège, France) et la polymérisation a été réalisée à 60°C pendant 48h.

Les COCs ont alors été coupés intégralement en coupes semi-fines de 2 µm d'épaisseur avec un microtome Ultracut E (Reichert E, Leica, Reuil-Malmaison, France). Les coupes ont été récoltées sur des lames Superfrost plus (Menzel-Glazer, CML, Nemours, France) et colorées au bleu de méthylène et au bleu Azur II. Les séries de coupes ont été observées en microscopie optique (microscope inversé IX70; Olympus, Rungis, France) pour déterminer les plus grands diamètres de l'ovocyte et de son noyau (mesures réalisées avec le logiciel DPSOft ; Olympus). Des coupes passant par le matériel nucléaire et des coupes représentatives du COC ont été sélectionnées et ré-incluses dans la résine époxy, d'après la méthode décrite par Hyttel et Madsen (1987). Des coupes ultra-fines de 70 nm d'épaisseur ont alors été réalisées et récoltées sur des grilles en cuivre, puis contrastées au citrate de cuivre avant leur observation sur un microscope électronique à transmission Philips CM12 (FEI, Eindhoven, The Netherlands) ou Zeiss EM 902 (Carl Zeiss SMT, Nanterre, France) à 80 kV de tension (MIMA2, plateau de Microscopie Electronique, unité GPL, Jouy-en-Josas, France). Les photographies numériques ont été obtenues à l'aide d'une caméra CCD MegaView III et analysée avec le logiciel ITEM (Eloïse-SARL, Roissy, France).

## 5. Analyse statistique des données

Les données ont été analysées grâce au programme SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA 2002-2003). Nous avons réalisé des analyses de la variance (ANOVA) suivies de tests de Student. Une valeur de p inférieurs à 0,05 a été considérée comme significative. Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  SEM.

### C. Résultats

#### 1. Récolte des complexes ovocyte-cumulus et mesures

Les quatre chiennes opérées avant le pic de LH ont fourni 10 COCs provenant de follicules de 3,5 à 5,5 mm de diamètre. Au moment de l'ovariectomie, la concentration sérique en progestérone était comprise entre 0,32 et 0,84 ng/ml de sérum et le taux de LH était basal (inférieur à 1 ng/ml). Le diamètre moyen de l'ovocyte était de  $127 \pm 2 \mu\text{m}$  [118-135  $\mu\text{m}$ ] (zone pellucide non comprise). Les cumulus étaient compacts autour de l'ovocyte et aucune mucification n'a été notée.

Douze COCs provenant de 6 chiennes stérilisées entre le pic de LH et l'ovulation ont été sélectionnés. Ils provenaient de follicules de 4,5 à 8 mm de diamètre. Au moment de l'ovariectomie, la concentration sérique en progestérone était comprise entre 3,5 et 7,1 ng/ml. Une chienne (2 COCs) a été opérée au cours de la phase d'augmentation du pic de LH, à une valeur de 3 ng/ml. Les cinq autres chiennes ont été stérilisées entre 10 et 31 heures après le pic de LH. La hauteur de la courbe gaussienne adaptée aux dosages de la LH était de  $9 \pm 3,1$  ng/ml et la largeur à mi-hauteur était de  $16,5 \pm 3,8$  heures. Le diamètre moyen des ovocytes de ce groupe "post-LH" était de  $132 \pm 2 \mu\text{m}$  [129-144  $\mu\text{m}$ ]. Tous les ovocytes post-LH présentaient une mucification et une expansion du cumulus. Elles étaient cependant moins marquées sur les ovocytes de la chienne stérilisée en phase de montée du pic de LH.

Quarante-trois COCs ont été sélectionnés des 15 chiennes stérilisées au cours ou après l'ovulation. Le diamètre moyen des ovocytes était de  $133 \pm 2 \mu\text{m}$  [117-144  $\mu\text{m}$ ] pour les 14 ovocytes récoltés dans les 72 heures suivant l'ovulation. Il était de  $117 \pm 1 \mu\text{m}$  [113-121  $\mu\text{m}$ ] pour les 9 ovocytes récoltés après 72h post ovulation et n'ayant pas repris leur méiose ("VG tardives") et de  $133 \pm 1 \mu\text{m}$  [128-137  $\mu\text{m}$ ] pour les 10 ovocytes au stade métaphase II récoltés à 98 et 105 heures après l'ovulation.

Le diamètre moyen des ovocytes était significativement plus petit pour les VG tardives ( $117 \pm 1 \mu\text{m}$ , n=9) que pour tous les autres groupes ( $131 \pm 1 \mu\text{m}$ , n=56). Il n'existait pas de

différence significative de diamètre ovocytaire entre tous les autres groupes (pré-LH, post-LH, post ovulation avant 72h et stades métaphase II).

## 2. L'ovocyte avant le pic de LH

Le cumulus des COCs avant le pic de LH était composé de deux à trois couches de petites cellules rondes avec un rapport nucléo-cytoplasmique très important (Figure 13.A, B). Leur cytoplasme était relativement pauvre en organites, essentiellement représentés par du réticulum endoplasmique lisse et des mitochondries. Seuls deux des dix COCs présentaient des grosses vésicules rondes et foncées dans le cytoplasme des cellules du cumulus.

La zone pellucide était de structure homogène et mesurait  $9,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$  d'épaisseur. Le cumulus émettait de nombreuses projections transzonales, observables en coupe longitudinale ou transversale dans la zone pellucide. Ces projections entraient en contact avec la membrane plasmique en formant soit une terminaison bulbeuse superficielle, soit de fines invaginations tortueuses, pénétrant jusqu'à 1 à 2  $\mu\text{m}$  de profondeur (Figure 13.C). On peut observer des organites (mitochondries, vésicules, gouttelettes lipidiques) à différentes hauteurs des projections transzonales, parfois même au niveau de la terminaison. Les terminaisons dégénérées ont été très rarement observées à ce stade. Les microvillosités formées par la membrane plasmique de l'ovocyte étaient présentes en quantité variable, émises perpendiculairement à la surface et incluses dans la zone pellucide (Figure 13.D). Des vésicules d'échange ont fréquemment été observées à leur base.

Les mitochondries étaient peu nombreuses. Elles se concentraient dans la zone corticale ; ailleurs dans le cytoplasme elles formaient de petits clusters (Figure 13.I). Elles étaient relativement rondes et plutôt petites (0,5 à 2  $\mu\text{m}$  de long). Quelques rares mitochondries très longues (jusqu'à 5  $\mu\text{m}$  de long) avec de nombreuses crêtes ont été observées. Des nuages mitochondriaux rassemblaient des mitochondries autour d'une sphère granuleuse et dense de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 13.J).

L'appareil de Golgi était présent en faible quantité et peu développé. Sa localisation s'est limitée aux régions péri-nucléaire et corticale. Le réticulum endoplasmique granuleux était présent en quantité très variable en fonction de l'ovocyte. Lorsqu'il était abondant, il s'organisait en lignes parallèles dans une zone du cytoplasme (Figure 13.I). Le réticulum endoplasmique lisse était présent en assez faible quantité et entourait partiellement ou totalement des gouttelettes lipidiques (Figure 13.K).

Les granules corticaux mesuraient 350  $\mu\text{m}$  de diamètre et étaient présents en quantité variable, toujours dans la zone corticale, à moins de 1 $\mu\text{m}$  de distance de la membrane plasmique. Ils étaient soit éloignés les uns des autres, soit groupés en petits alignements de 3 à 5 granules ou en gros clusters (Figure 13.D).

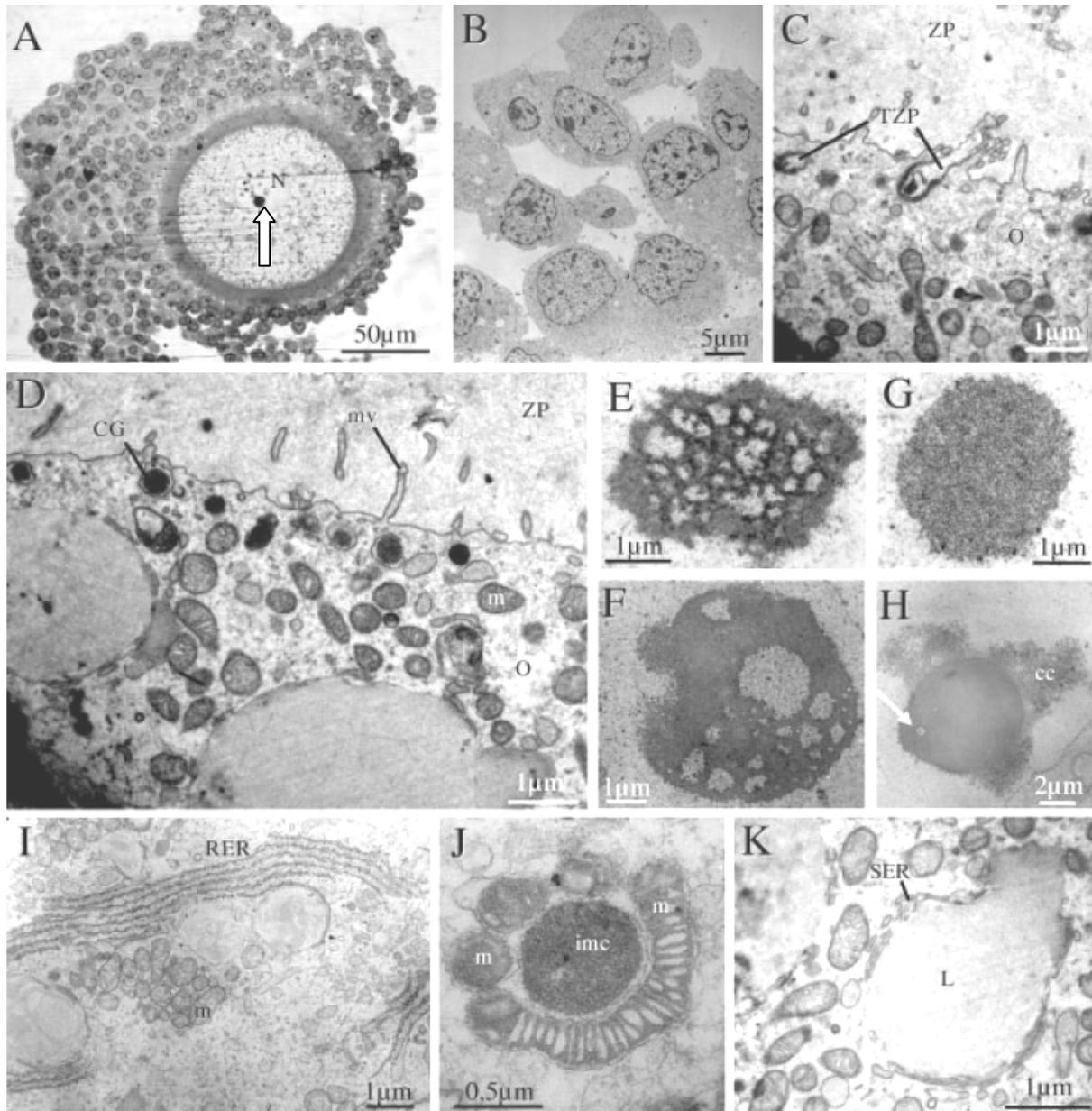


Figure 13 : Complexe cumulo-ovocyttaire canin au stade pré LH. A : Coupe semi-fine d'un ovocyte à noyau central (N). Les cellules du cumulus forment un ensemble compact organisé sur deux couches autour de l'ovocyte. Un gros nucléole réticulé (confirmé en microscopie électronique) est visible (flèche). B : Coupe ultra fine de cellules du cumulus. C : Deux terminaisons de projections transzonales profondes (TZP) pénètrent dans le cytoplasme de l'ovocyte (O). La zone pellucide (ZP) est en contact étroit avec la membrane plasmique. D : Portion de région corticale de l'ovocyte (O) riche en mitochondries (m). Des microvillosités (mv) sont émises perpendiculairement à la membrane plasmique et un petit

*groupe de granules corticaux (GC) est localisé juste sous la membrane. E : Nucléole réticulé de forme régulière. F : Nucléole réticulé légèrement difforme. G : Nucléole condensé formé uniquement de composante fibrillaire dense. H : Nucléole condensé présentant une petite vacuole (flèche) et entouré de chromatine condensée (cc). I : Alignements parallèles de réticulum endoplasmique rugueux (RER) à côté d'un petit cluster de mitochondries (m). J : Nuage mitochondrial composé de mitochondries (m) rassemblées autour du ciment intermitochondrial (imc). K : Gouttelettes lipidiques entourées de vésicules de réticulum endoplasmique lisse (SER).*

Les noyaux des ovocytes étaient tous au stade de la vésicule germinative (prophase I) avant le pic de LH. Sur les dix COCs du groupe, les noyaux de 7 ovocytes étaient localisés en périphérie du cytoplasme, ceux de deux ovocytes étaient à mi-distance entre le centre et la membrane plasmique. Un seul ovocyte a présenté un noyau en position centrale. Le noyau était de forme ronde ou légèrement aplatie et mesurait de 30 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre. Sur les 3 noyaux qui n'étaient pas périphériques, l'enveloppe nucléaire était lisse. Sur les 7 noyaux périphériques, l'enveloppe était soit lisse, soit légèrement ondulée.

La moitié des ovocytes présentait un nucléole réticulé fibrillo-granulaire, de forme plus ou moins irrégulière (Figure 13.E, F). Les autres nucléoles observés étaient ronds, denses et formés de composante granulaire (Figure 13.G). Ils mesuraient entre 5 et 7  $\mu\text{m}$  de diamètre et certains étaient reliés à une masse de chromatine condensée (Figure 13.H). D'autres nucléoles similaires, en nombre très variable, avaient une taille plus réduite (1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre) et sans jamais être reliés à de la chromatine dense.

### 3. L'ovocyte entre le pic de LH et l'ovulation

Les huit COCs provenant des cinq chiennes du groupe post-LH présentaient une expansion complète du cumulus (Figure 14.A). L'expansion était déjà présente, mais moins marquée, pour les deux ovocytes de la chienne stérilisée pendant la phase d'augmentation de la LH. Les cellules du cumulus n'étaient en contact les unes avec les autres que sur de petites zones. Leur cytoplasme contenait de grandes vésicules sombres (Figure 14.B). Celles-ci étaient plus fréquentes tardivement après le pic de LH.

Les terminaisons de projections transzonales dégénérées (Figure 14.C) étaient un peu plus fréquentes qu'au stade pré-LH, mais les terminaisons non dégénérées restaient toujours la forme majoritaire.

Les mitochondries étaient de plus en plus nombreuses et réunies en clusters de taille petite à moyenne (Figure 14.H), avec toujours une densité plus importante dans la région corticale de l'ovocyte. L'appareil de Golgi était présent en plus grande quantité qu'avant le

pic de LH. Toujours restreint à la région corticale et à la zone périnucléaire, il se concentrait plus spécialement au niveau des terminaisons transzonales (Figure 14.C).

Le réticulum endoplasmique rugueux était, comme au stade précédent, rare. Le réticulum endoplasmique lisse était quant à lui présent en quantité de plus en plus importante et s'organisait en alignements parallèles ou concentriques. Plusieurs cercles de réticulum endoplasmique lisse autour de gouttelettes lipidiques ou de mitochondries étaient fréquemment observés. Ces structures pouvaient atteindre 15  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le réticulum endoplasmique lisse était aussi présent sous forme de petites vésicules entremêlées avec les mitochondries (Figure 14.I) ou à proximité de l'enveloppe nucléaire (Figure 14.D).

Les granules corticaux étaient nombreux et rassemblés en clusters, en une à trois lignes sous la membrane plasmique. Ils ont souvent été observés associés avec de l'appareil de Golgi à proximité des terminaisons transzonales (Figure 14.C).

Les huit ovocytes du groupe étaient au stade vésicule germinative. Les noyaux étaient périphériques et légèrement aplatis contre la membrane (Figure 14.A). L'enveloppe formait une ou deux petites invaginations de 2  $\mu\text{m}$  maximum observables face à la membrane plasmique (Figure 14.E) et des ondulations de faible amplitude sur les bords latéraux du noyau (Figure 14.F). Seul un des ovocytes possédait un nucléole fibrillogranulaire, de forme très irrégulière. Les autres nucléoles étaient fibrillaires, soit très dense et de forme ronde, soit moins dense, et dans ce cas vacuolisé et de forme plus irrégulière (Figure 14.G).

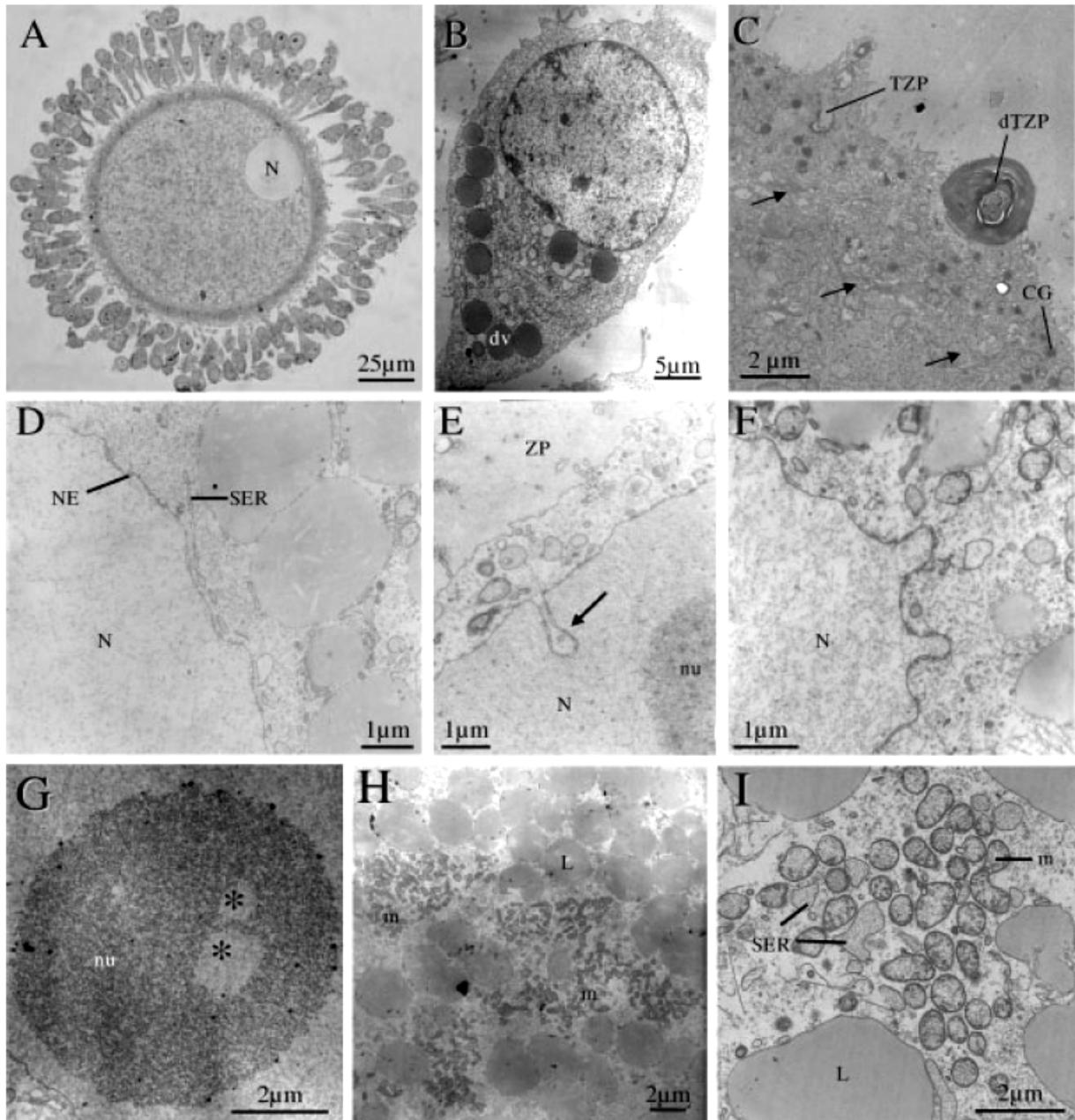


Figure 14 : Complexe cumulo-ovocytaire canin entre le pic de LH et l'ovulation. **A** : Coupe semi fine d'un ovocyte issu d'une chienne pendant le pic de LH. Une expansion du cumulus est observable. Le noyau (N) est arrondi et périphérique. **B** : Vésicules sombres (dv) dans une cellule de cumulus. **C** : Petit groupe de granules corticaux (CG) dans la région corticale d'un ovocyte. Une accumulation d'appareil de Golgi (flèche) et de réticulum endoplasmique lisse est visible autour d'une terminaison de projection transzonale (TZP). Aucun espace n'est discernable entre la zone pellucide (ZP) et la membrane plasmique. Une TZP dégénérée est visible (dTZP). **D** : Alignement de vésicules de réticulum endoplasmique lisse (SER) parallèlement à l'enveloppe nucléaire (NE). La chromatine est très décondensée dans le noyau (N). **E** : Petite invagination de l'enveloppe nucléaire (flèche). **F** : Noyau (N) présentant une légère ondulation de l'enveloppe. **G** : Nucléole fibrillaire dense (nu) avec deux petites vacuoles (astérisques). **H** : Cluster de mitochondries (m) de taille moyenne entre des gouttelettes lipidiques (L). **I** : Petit cluster de mitochondries (m) infiltré de vésicules de SER.

#### 4. L'ovocyte au cours des trois premiers jours après l'ovulation

Le cumulus était plus compact qu'au stade précédent et composé de cellules moins allongées arrangées sur un ou deux rangs (Figure 15.A). Plus on s'éloigne de l'ovulation, plus les cellules contenant des vésicules sombres étaient nombreuses. Ces vésicules étaient d'aspect hétérogène (Figure 15.B). Certaines cellules ont montré des signes de caryolyse.

Quelques espaces vides ont été formés entre la zone pellucide et la membrane plasmique, mais aucun véritable espace périvitellin continu n'a été observé. Le nombre total de terminaisons transzonales a diminué progressivement au cours de la période post-ovulatoire, et le taux de terminaisons dégénérées a augmenté (Figure 15.C). Les microvillosités émises par l'ovocyte n'étaient plus perpendiculaires à la surface mais couchées sur la membrane plasmique. Leur distribution à la surface de l'ovocyte était très hétérogène, avec alternance de zones très denses et de zones où elles étaient rares.

Les clusters de mitochondries formaient de grandes travées. Après 24h post ovulation, les mitochondries étaient nombreuses et montraient une répartition homogène dans le cytoplasme. On ne pouvait alors plus distinguer de clusters de mitochondries. Certains ovocytes présentaient des mitochondries de formes annulaire ou irrégulière et un espace augmenté entre les membranes interne et externe.

A partir de 24h post ovulation, l'appareil de Golgi était de moins en moins développé et en quantité de plus en plus faible. La quantité de réticulum endoplasmique a continué à augmenter tout au long de la période post-ovulatoire. Cet organite s'organisait toujours en grandes structures concentriques (Figure 15.H), autour des gouttelettes lipidiques et entre les mitochondries. Le nombre de granules corticaux a augmenté progressivement au cours du stade post-ovulatoire. Ils s'organisaient en clusters plus gros qu'au stade précédent, sur une à trois lignes d'épaisseur. Ces clusters étaient séparés les uns des autres par de grands espaces, avec quelques rares granules isolés plaqués contre la membrane. Les granules étaient tous localisés dans la zone corticale, à proximité de la membrane plasmique.

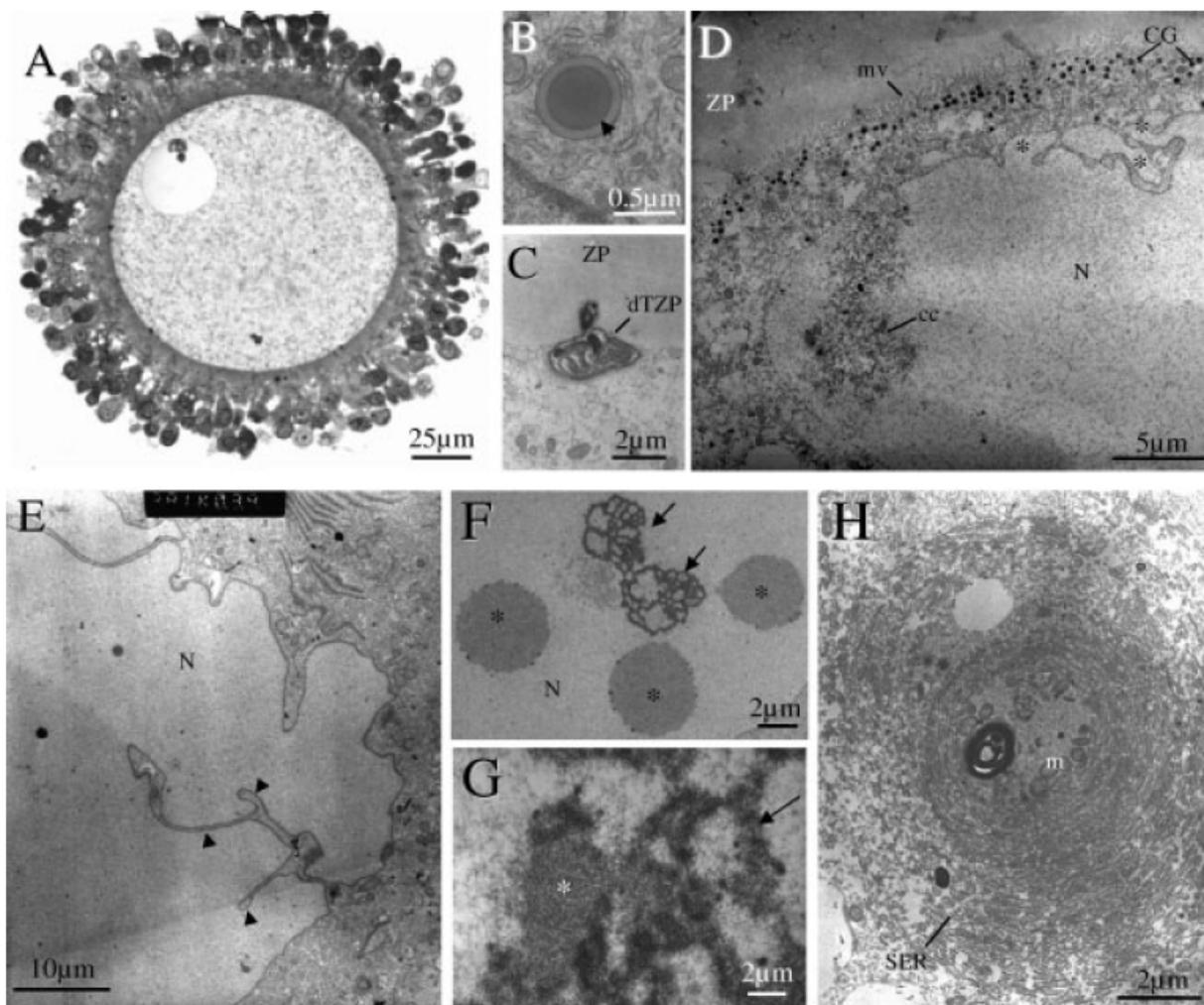


Figure 15 : Complexe cumulo ovocytaire canin au cours de trois premiers jours post ovulation. **A** : Coupe semi fine d'un ovocyte issu d'une chienne 42h post ovulation. Le cumulus a un aspect compact. **B** : Cytoplasme d'une cellule de cumulus avec une vésicule (dv) composée d'un centre foncé entouré d'une zone annulaire plus claire. Une ligne plus sombre (flèche) sépare les deux zones. **C** : Projection transzonale dégénérée (dTZP) présentant un aspect de myéline. La zone pellucide (ZP) est en contact étroit avec la membrane plasmique. **D** : Noyau (N) présentant des invaginations marquées de l'enveloppe (astérisque) et une masse de chromatine dense (cc). Un gros cluster de granules corticaux (CG) est présent entre le noyau et la membrane plasmique. De nombreuses microvillosités (mv) sont émises perpendiculairement à la membrane. **E** : Longue invagination de l'enveloppe du noyau (N) présentant des embranchements (flèches). **F** : Noyau (N) présentant trois nucléoles fibrillaires denses (astérisques) et deux nucléoles réticulés (flèche). **G** : Détail d'un nucléole réticulé mettant en évidence la présence de composante granulaire (astérisque) et fibrillaire. **H** : Importante organisation concentrique de vésicules de réticulum endoplasmique lisse (SER) autour d'un groupe de mitochondries (m).

Jusqu'à 72h post ovulation, les 19 ovocytes observés se trouvaient tous au stade vésicule germinative. Les ondulations de l'enveloppe nucléaire étaient de plus en plus marquées, les invaginations plus profondes (jusqu'à 10 µm de longueur) et plus nombreuses. Les invaginations les plus longues se divisaient en plusieurs branches (Figure 15.D, E). Sur

les dix ovocytes récoltés entre le moment de l'ovulation et 23h plus tard, la présence d'un gros nucléole dense a toujours été notée et pouvait parfois présenter deux ou trois petites vacuoles. Entre 34 et 68h post ovulation, les nucléoles de neuf des dix ovocytes observés ont montré à nouveau un aspect réticulé et on pouvait alors distinguer les trois composantes de la structure fibrillo-granulaire (centre fibrillaire dense, composante granulaire, centre fibrillaire). Le noyau possédait plusieurs nucléoles, certains denses et d'autres réticulés. Les nucléoles fibrillo-granulaires étaient de taille variable, les plus grands atteignant 7  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 15.F, G). Ils s'organisaient le plus souvent en groupe de deux ou trois, reliés par un nuage de chromatine condensée. Plusieurs nucléoles denses de 6 à 10  $\mu\text{m}$  étaient aussi présents dans les noyaux (Figure 15.F).

## 5. Quatrième et cinquième jours après l'ovulation

### a) Vésicules Germinales tardives

Parmi les treize chiennes stérilisées plus de 72h après l'ovulation, deux chiennes présentaient des COCs qui étaient toujours au stade vésicule germinative. Six « vésicules germinatives tardives » ont été ainsi récoltées à 79 et 89h post ovulation.

Pour ces COCs, presque toutes les cellules du cumulus étaient remplies de vésicules lipidiques sombres. L'espace périvitellin a commencé à se former (Figure 16.A), mais il ne concernait pas plus du cinquième de la périphérie de l'ovocyte et ne dépassait pas 1  $\mu\text{m}$  de hauteur. Le nombre de TZP était encore plus faible qu'au stade précédent. Les microvillosités de la membrane de l'ovocyte étaient toujours plus nombreuses à hauteur du noyau de l'ovocyte (Figure 16.B).

Il n'y a pas eu de modifications du nombre ni de la localisation des mitochondries par rapport au stade précédent. L'appareil de Golgi était présent en faible quantité et peu développé. Les gros arrangements concentriques de réticulum endoplasmique lisse étaient toujours présents.

Un cluster très important de granules corticaux était présent entre le noyau et la membrane plasmique (Figure 16.B). Ailleurs, ils étaient peu nombreux et localisés juste sous la membrane plasmique.

Le noyau présentait une forme très irrégulière avec plusieurs longues invaginations de l'enveloppe. Il contenait un unique nucléole, ce dernier correspondant soit à une sphère dense de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre entouré par un nuage de chromatine condensée, soit à une structure de forme irrégulière, dense et vacuolisée mesurant entre 5 et 8  $\mu\text{m}$ .

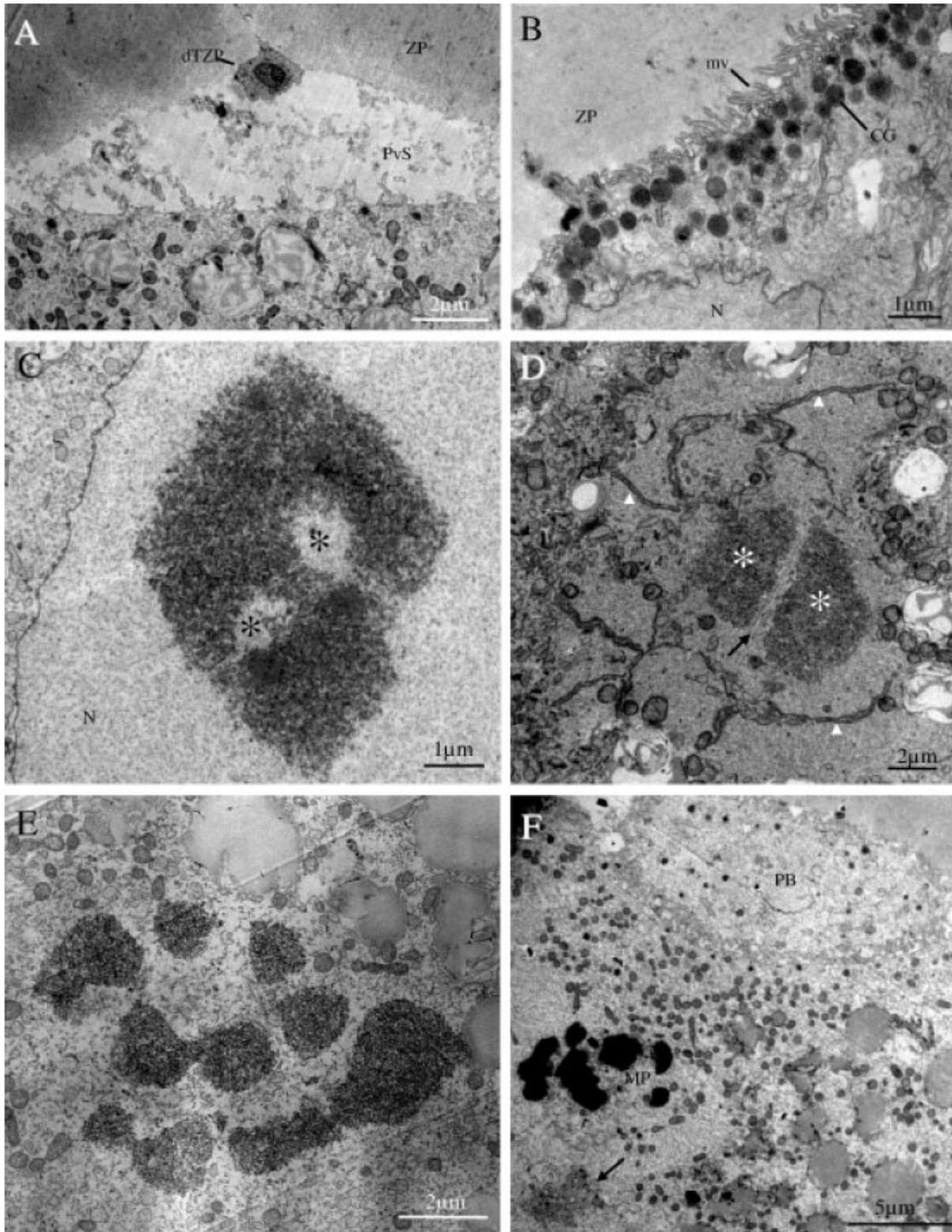


Figure 16 : Complexe cumulo ovocytaire issu de chiennes à plus de 72h post ovulation. **A** : Terminaison de projection transzonale dégénérée (dTZR) rétractée. L'espace périvitellin (PvS) est formé et contient des débris cellulaires. **B** : Grand cluster de granules corticaux (CG) entre le noyau (N) et la membrane plasmique. De nombreuses microvillosités (mv) sont libres dans le PvS. **C** : Noyau (N) présentant un nucléole dense avec deux petites vacuoles (astérisques). **D** : Ovocyte au stade GVBD. Deux masses de chromatine condensée (astérisques) sont séparés par des filaments (flèche) et entourés de segments d'enveloppe nucléaire. **E** : Ovocyte au stade métaphase I. Plaque métaphasique. Des filaments sont visibles entre les chromosomes. **F** : Ovocyte au stade métaphase II. Chromosomes alignés sur la plaque métaphasique (MP), globule polaire et centre organisateur des microtubules (flèche)

## b) Ovocytes ayant repris leur méiose

Seul un des ovocytes récoltés après 72h post ovulation était au stade de la rupture de la vésicule germinative (GVBD, condensation très forte de la chromatine et discontinuité de l'enveloppe nucléaire). Il provenait d'une chienne stérilisée 79h après l'ovulation.

Cinq ovocytes au stade métaphase I (alignement des chromosomes en plaque métaphasique et absence d'un globule polaire) ont été récoltés sur une chienne stérilisée 76h après l'ovulation et 10 ovocytes au stade métaphase II (alignement des chromosomes en plaque métaphasique et présence d'un globule polaire) ont été récoltés sur deux chiennes stérilisées à 98 et 105h respectivement.

Les cumulus des trois stades (GVBD, métaphase I et II) étaient très similaires. Les cellules du cumulus étaient moins nombreuses et plus lâches qu'avant la reprise de la méiose. L'ovocyte pouvait même être partiellement dénudé. Les cellules du cumulus étaient de forme irrégulière et émettaient de très fines projections latérales. Environ la moitié des COCs étaient entourés d'une matière gélatineuse leur donnant un aspect bien lisse. Environ 10% des cellules seulement contenaient encore des vésicules sombres. La caryolyse était encore plus fréquente qu'avant la reprise de méiose. Le cytoplasme ne montrait pas de signes de dégénérescence et était riche en organites (mitochondries, réticulum endoplasmique lisse et Golgi).

L'espace périvitellin n'était formé complètement que pour les stades métaphase II récoltés 105h après l'ovulation. Son épaisseur variait de 0 à 5  $\mu\text{m}$ . La zone pellucide était significativement plus épaisse ( $17 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) qu'avant la reprise de méiose ( $11 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ). Elle était organisée en deux zones concentriques. La zone la plus interne était très homogène et ne contenait pas de projections transzonales, tandis que la plus externe était percée de nombreux trous et contenait des projections transzonales rétractées.

Quelques rares terminaisons transzonales pouvaient encore être observées contre la membrane plasmique des ovocytes aux stades GVBD et métaphase I, mais aucune jonction formée avec l'ovocyte n'a été observée. Les terminaisons transzonales étaient toutes dégénérées et rétractées au stade métaphase II.

Les microvillosités de la membrane ovocytaire étaient très nombreuses, longues et tortueuses au-dessus de la GVBD ou de la plaque métaphasique. Lorsque le globule polaire était présent, les microvillosités étaient très longues et le recouvrait.

Le cytoplasme avait un aspect très homogène. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique lisse occupaient tout l'espace libre entre les gouttelettes lipidiques. Ces

dernières étaient toutes entourées de vésicules de réticulum endoplasmique lisse. La fréquence des nuages mitochondriaux a beaucoup diminuée par rapport au stade précédent. Ils étaient très rares et de petite taille au stade métaphase II. Les grandes structures concentriques de réticulum endoplasmique lisse n'ont jamais été observées après la reprise de la méiose.

L'ovocyte au stade GVBD présentait toujours un cluster très important de granules corticaux entre les restes du noyau et la membrane plasmique. Ce phénomène n'a pas été observé aux stades métaphase I et II dans lesquels la répartition des granules corticaux est régulière le long de la membrane plasmique (tous les 1 à 2  $\mu\text{m}$ ). Dans cet ovocyte, plusieurs masses de chromatine condensée étaient séparées les uns des autres par des filaments parallèles. L'ensemble des chromosomes était entouré par des fragments discontinus d'enveloppe (Figure 16.D).

Au stade métaphase I, les chromosomes formaient une plaque métaphasique (Figure 16.E) parallèle à la membrane plasmique. Ils étaient soit séparés en petits patchs bien distincts de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre, soit accolés en une grosse structure vermiforme d'une longueur totale de 15  $\mu\text{m}$  sur 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Des filaments s'organisaient autour et entre les chromosomes pour former un fuseau ovoïde perpendiculaire à la membrane plasmique, délimitant un espace sans organites de 8  $\mu\text{m}$  de large sur 5  $\mu\text{m}$  de haut. Au stade métaphase II (Figure 16.F), l'orientation et la taille de la plaque métaphasique était la même qu'au stade métaphase I. Les chromosomes étaient toujours en patchs bien séparés les uns des autres. Deux centres organisateurs des microtubules (MTOC) de 2 sur 3  $\mu\text{m}$  étaient systématiquement présents aux deux pôles du fuseau. Sur les dix ovocytes au stade métaphase II, le globule polaire était totalement extrudé de l'ovocyte et contenant une grosse masse très dense de chromatine ainsi que quelques organites (granules corticaux, mitochondries et petites vésicules).

Sur les six ovocytes récoltés 98h après ovulation, les globules polaires étaient ronds et situés en regard de la plaque métaphasique, alors que sur les quatre ovocytes récoltés 105h après l'ovulation, ils étaient beaucoup plus allongés, partiellement fragmentés et plus éloignés de la plaque métaphasique.

## D. Discussion

Cette étude décrit l'évolution ultrastructurale du COC canin tout au long de la maturation finale in vivo, en rapport avec le pic de LH et l'ovulation (Figure 17).

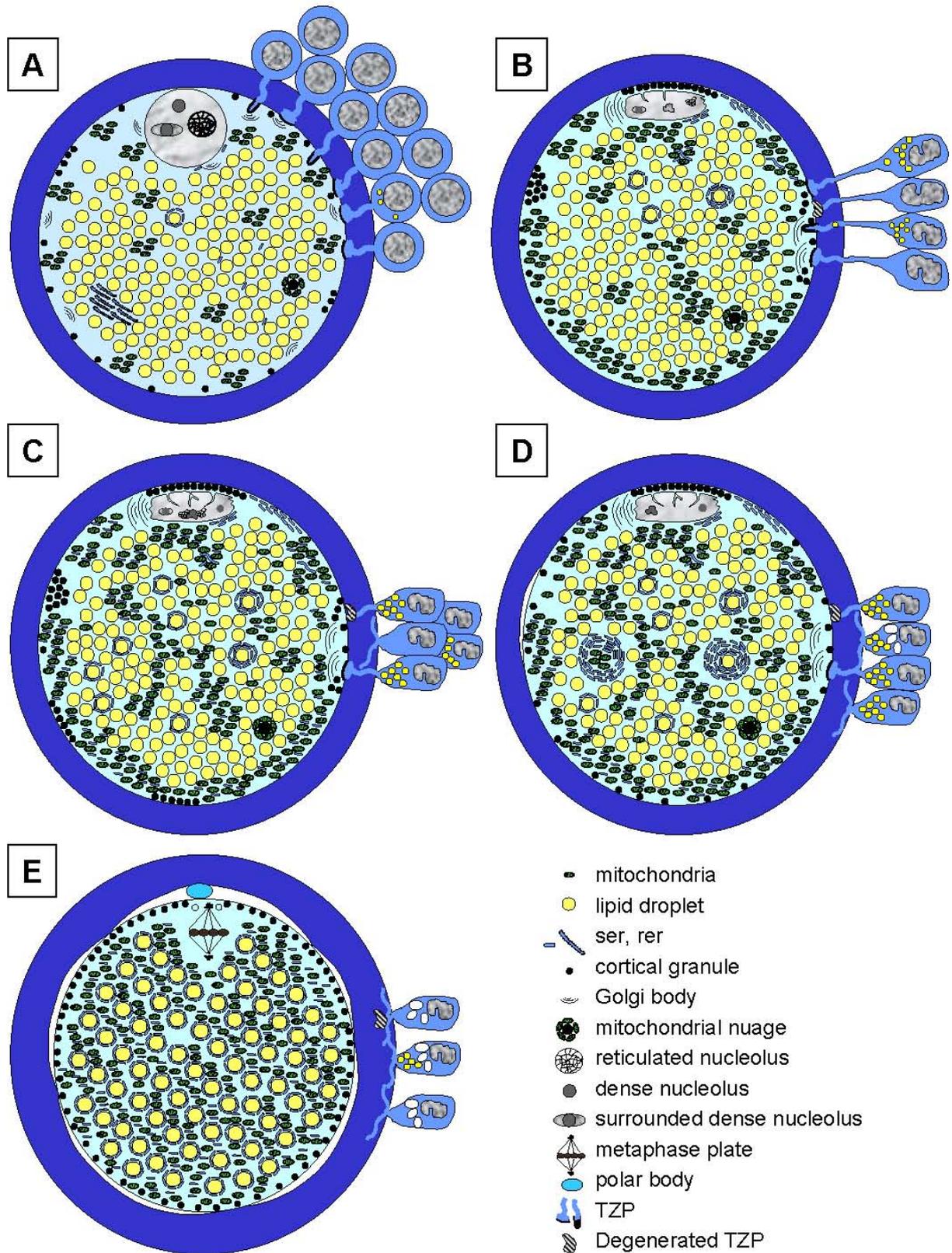


Figure 17 : Représentation schématique de l'évolution ultrastructurale d'un COC canin au cours de la maturation in vivo. A : avant le pic de LH. B : entre le pic de LH et l'ovulation. C : au cours des 72h post ovulation. D : ovocyte n'ayant pas repris sa méiose à plus de 72h post ovulation. E : stade métaphase II à plus de 72h post ovulation

L'ovulation est datée précisément grâce à l'échographie ovarienne (Marseloo et al., 2004), technique récemment utilisée dans cette indication et beaucoup plus précise que celles utilisées auparavant (début de l'œstrus, acceptation du mâle, laparotomies, et concentration de progestérone).

Nous avons concentré nos observations sur la période située entre le début du proœstrus et le cinquième jour après l'ovulation, incluant ainsi les événements physiologiques majeurs de la reproduction de la chienne : la lutéinisation préovulatoire du follicule, le pic de LH, l'ovulation de l'ovocyte au stade VG, la reprise de méiose dans l'oviducte. Nous avons mis en évidence que des changements cytoplasmiques majeurs ont lieu pendant la période de croissance folliculaire terminale, qui, si l'on fait abstraction de la chronologie, sont tout-à-fait similaires à ceux décrits chez les autres mammifères. La maturation nucléaire est quant à elle plus inhabituelle.

Cette étude a permis de décrire dans le cytoplasme de l'ovocyte canin de nombreuses associations entre organites. L'association du SER et des mitochondries a été décrite chez de nombreuses autres espèces (vache, Fleming et Saacke, 1972 ; Kruip et al., 1983 ; jument, Grondahl et al., 1995). Une telle association pourrait jouer un rôle dans le stockage de molécules, la stéroïdogenèse ou l'utilisation de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate). La présence de gouttelettes lipidiques entourées de vésicules de SER a aussi souvent été décrite et pourrait refléter la métabolisation des réserves lipidiques ou les synthèses lipoprotéiques. Chez la chienne, l'association SER/mitochondries et SER/gouttelettes lipidiques sont exacerbées en comparaison des autres espèces puisque le SER forme de grandes structures concentriques autour de mitochondries ou de gouttelettes lipidiques. Ces complexes ont été observés entre le moment de l'ovulation et la reprise de la méiose. Des structures similaires ont été observées sur des ovocytes de petits follicules antraux de chienne en metoœstrus (Lopez et al., 2006). Elles ont aussi été décrites, mais avec un développement bien moindre, à des stades précoces de la folliculogenèse des invertébrés (Amor et al., 2004), du hamster (Weakley, 1976) ainsi que chez la vache (Assey et al., 1994). Chez cette dernière espèce, ces structures ne sont pas systématiquement présentes et observées seulement dans des follicules subordonnés et sur des animaux ayant subi une synchronisation hormonale du cycle. D'après les données disponibles dans la littérature, elles n'ont pas été décrites chez d'autres mammifères, pas même chez la renarde (Hyttel et al., 1990). Leur abondance dans la période post-ovulatoire de la chienne pourrait être une spécificité canine liée à la nécessité de

maintenir la viabilité de l'ovocyte pendant la période particulièrement longue qu'il doit passer dans l'oviducte sans le soutien de son follicule : deux jours de plus que la renarde, Farstad et al., 1989 ; et trois jours de plus que les autres mammifères. Les formations particulières de SER étant aussi retrouvées habituellement à des stades précoces de la folliculogenèse, elles pourraient également être le signe d'une relative immaturité de l'ovocyte canin.

Une autre structure cytoplasmique originale observée dans notre étude est le regroupement de mitochondries autour d'une sphère granuleuse, forme retrouvée tout au long de la période péri-ovulatoire. Ces structures sont tout à fait similaires à celles décrites chez les vertébrés inférieurs sous le nom de « ciment intermitochondrial » (Clérot, 1979), dans l'ovogonie et l'ovocyte primaire de la femme sous le nom de « nuage mitochondrial » (Motta et al., 2000) et chez le hamster, de l'ovogonie jusqu'au follicule antral, sous le nom de « corps fibrillo-granulaire » (Weakley, 1976). Le centre granulaire contenant les ARNm codant pour des protéines mitochondriales, toutes ces structures pourraient être des lieux de multiplication intense des mitochondries. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle structure est observée à des stades si tardifs de la maturation ovocytaire, indépendamment de l'espèce. La présence de nuages mitochondriaux moins nombreux et moins développés dans les stades métaphase I et II pourrait refléter une diminution importante de la multiplication des mitochondries après la reprise de la méiose.

La présence des grands agrégats concentriques de SER et des nuages mitochondriaux suggère une maturation cytoplasmique canine très intense durant la phase de croissance folliculaire terminale. Cela impliquerait donc logiquement qu'à des stades folliculaires plus précoces, les ovocytes soient très immatures. Les ovocytes récoltés dans des follicules antraux en période d'anœstrus, principale source d'ovocytes pour la maturation in vitro, pourraient donc être beaucoup plus immatures que ceux des autres mammifères au même stade. Cette insuffisance de maturation pourrait contribuer à expliquer les très mauvais résultats de culture d'ovocytes canins.

Nos observations nous conduisent à diviser la maturation cytoplasmique en trois périodes. Durant la première période, avant l'ovulation, l'ovocyte et son cumulus montrent des signes de communication intense (distribution asymétrique des organites ovocytaires en faveur de la région corticale, densité importante en microvillosités, présence de nombreux puits d'endocytose et de projections transzonales). Au cours de la deuxième période, autour du deuxième jour après l'ovulation, ces signes de communication diminuent graduellement. Pendant la dernière période, autour du troisième jour après l'ovulation, l'ovocyte semble être totalement déconnecté de son cumulus. Cette succession de phases de couplage, de

découplage puis d'indépendance est communément décrite chez d'autres mammifères (mouton, Moor et al., 1980 ; vache, Kruijff et al., 1983 ; jument, Grondahl et al., 1995). Le découplage de l'ovocyte et du cumulus est induit chez ces espèces par le pic de LH et la reprise de méiose a lieu une fois que l'ovocyte est devenu indépendant. Chez la chienne, il est peu probable que le découplage du COC soit induit directement par le pic de LH puisqu'il a lieu trois à quatre jours plus tard. La phase indépendante est par contre chez la chienne, comme chez les autres mammifères, liée à la reprise de méiose. Il serait donc assez probable que l'arrêt de la communication entre l'ovocyte et le cumulus soit associée à la reprise de la méiose chez la chienne. Une étude récente a montré en effet que la dénudation artificielle avant culture des ovocytes canins est associée à un plus fort taux de reprise de méiose (Reynaud et al., 2006b). Une seconde étude a montré que la dénudation spontanée en fin de culture est aussi associée à une maturation nucléaire plus avancée (Otoi et al., 2007). Cependant notre étude ne fournit que des données ultrastructurales qui nécessitent d'être complétées par une étude fonctionnelle.

Lors de la maturation nucléaire, le déplacement du noyau est un événement qui intervient à des moments très variables selon l'espèce : dès la formation de l'antrum (vache et mouton, Hyttel et al., 1986) ou après le pic de LH (renarde, Hyttel et al., 1990 ; tigre, Gjørret et al., 2002 ; femme, Sathanathan, 1997). Chez la chienne, d'après nos observations, la délocalisation du noyau aurait probablement lieu peu de temps avant le pic de LH, en début des chaleurs. En effet, les ovocytes pré-LH de notre étude présentaient des noyaux soit périphériques, soit centraux et les ovocytes post-LH uniquement des noyaux périphériques. De même, l'ondulation de l'enveloppe nucléaire apparaît également peu de temps avant le pic de LH. Assey et al. (1994) ont décrit le même type d'ondulation de l'enveloppe et l'interprètent comme étant liée à une pré-activation du noyau en blocage méiotique. En prenant en compte l'ensemble de ces données (la délocalisation du noyau et l'ondulation de son enveloppe), nous sommes donc amenés à émettre l'hypothèse de l'existence d'un signal émis avant le pic de LH, qui induirait la maturation finale de l'ovocyte chez la chienne. Ce signal, dont la nature reste inconnue, pourrait être le même que celui qui induit la lutéinisation pré-ovulatoire du follicule.

La chronologie de la maturation nucléaire de l'ovocyte canin est récapitulée dans la Figure 18. Malgré cette probable reprise précoce de la maturation nucléaire, la reprise de méiose (sortie du stade VG) est un événement très tardif. Elle est décalée par rapport à la renarde (reprise de méiose 3-4 jours après le pic de LH soit 1-2 jours après l'ovulation ; Pearson and Enders, 1943 ; Hyttel et al., 1990) puisque nous avons observé les premiers

signes de reprise de méiose à partir de 3 jours post ovulation (soit 5 jours post-LH). Nos résultats sont en accord avec les études antérieures (48-72h post ovulation, Tsustsui, 1989 ; à partir de 54h post ovulation, Reynaud et al., 2005). Pour la première fois, nous sommes en mesure d'affirmer que la période d'un à deux jours supplémentaires de maturation par rapport à la renarde n'est pas juste une période d'attente où aucune maturation nucléaire n'a lieu, mais au contraire une période au cours de laquelle sont observés des remaniements nucléolaires intenses. Les nucléoles réticulés observés avant le pic de LH commencent à adopter une structure compacte au moment du pic de LH et jusqu'à 24h post ovulation, plus aucun signe de réticulation n'est observé. A partir de 34h post ovulation, et ce jusque 68h post ovulation, des nucléoles avec une structure réticulée sont à nouveau visibles, mais ils présentent une organisation simplifiée comparée à celles des nucléoles observés avant le pic de LH. La structure réticulée d'un nucléole est généralement associée avec une synthèse d'ARN active (Wachtler et Stahl, 1993), et cette dernière diminue progressivement pendant la maturation intra-folliculaire de l'ovocyte, jusqu'à ce que ce dernier atteigne la compétence méiotique (Bjerregaard et al., 2004). Dans les autres espèces, une fois que le nucléole a perdu sa structure réticulée fibrillo-granulaire pour se transformer en une sphère fibrillaire dense transcriptionnellement inactive, aucune structure réticulée n'a été décrite à nouveau jusqu'à après la fécondation et l'activation du génome zygotique (Laurincik et al., 2000). Une vacuolisation du nucléole est décrite après une compaction du nucléole dans les ovocytes de follicules dominants sur des vaches traitées par des prostaglandines  $F_2\alpha$  (Assey et al., 1994). Cette vacuolisation a été interprétée comme le signe, soit d'une réactivation de la transcription, soit de dissolution du nucléole précédant la reprise de méiose. Quoiqu'il en soit, dans notre cas, il s'agit plus d'une réticulation qu'une simple vacuolisation au vu des différentes composantes, fibrillaire et granulaire, qui sont distinguables. Cette réactivation présumée des nucléoles autour de 48h post ovulation n'ayant pas été décrite chez le renard, il semblerait s'agir d'une spécificité de l'espèce canine. L'activité transcriptionnelle du nucléole durant cette période demande à être explorée par une étude fonctionnelle.

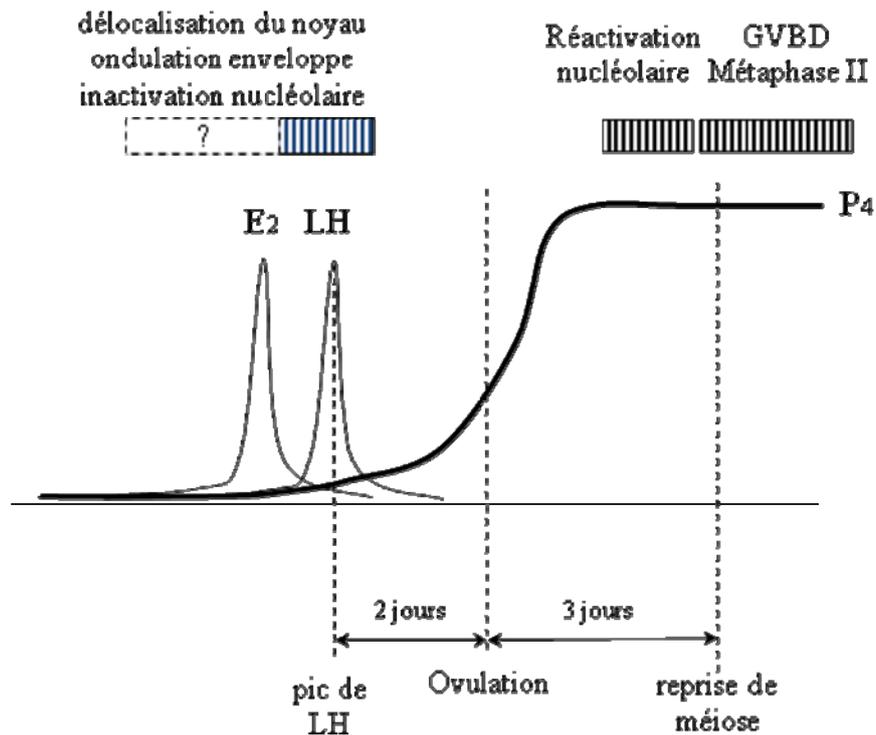


Figure 18 : Chronologie des principaux événements de la maturation nucléaire de l'ovocyte en fonction des pics d'œstrogènes ( $E_2$ ) et de LH, de l'ovulation et de la reprise de méiose.

Ce travail sur l'ultrastructure de l'ovocyte canin in vivo montre que le pic de LH n'est pas suivi par des modifications ultrastructurales cytoplasmiques ou nucléaires brusques, mais uniquement par l'expansion du cumulus. L'ovulation n'est pas non plus associée à des modifications majeures du COC, si ce n'est une recompaction du cumulus qui ne montre alors plus de signes d'expansion. Nos résultats suggèrent aussi que la maturation finale in vivo de l'ovocyte canin serait régulée par deux signaux autres que le pic de LH : un premier, dans les jours précédant le pic de LH, qui serait responsable de la délocalisation du noyau et de l'induction de l'entrée en maturation finale et un second signal, entre 24 et 48h post ovulation, qui induirait la réactivation de la transcription nucléolaire conduisant à terme à la reprise de la méiose. L'œstradiol pourrait être un candidat pour le premier des deux signaux, puisqu'un pic plasmatique d'œstradiol a lieu juste avant l'augmentation de la concentration sanguine en LH (de Gier et al., 2006).

Au bilan, cette étude définit un standard ultrastructural de la maturation ovocytaire canine, auquel pourront être comparés des ovocytes maturés in vitro. Elle met aussi en évidence une particularité ultrastructurale de la chienne, à savoir un remodelage nucléolaire en période post-ovulatoire.

### **III. Approche transcriptionnelle de la maturation ovocytaire canine in vivo**

Notre étude ultrastructurale de la maturation ovocytaire in vivo (Viaris de Iesegno et al., 2008) a mis en évidence une période particulière au cours de laquelle le nucléole, qui arborait un aspect dense depuis le pic de LH, reprend un aspect réticulé entre 34h et 68h post ovulation. Il a été montré chez d'autres espèces que l'aspect ultrastructural du nucléole est corrélé à son état d'activité transcriptionnelle : une organisation réticulée correspond à un état actif alors qu'une organisation dense traduit un état d'inactivité (Wachtler et Stahl, 1993). Nos hypothèses basées sur l'ultrastructure demandant à être confirmées par une étude fonctionnelle, nous nous sommes intéressés au suivi de la transcription ovocytaire au cours de la maturation ovocytaire in vivo chez la chienne.

Plus précisément, nous avons quantifié l'incorporation de BrUTP (Uridine TriPhosphate bromée) dans le nucléoplasme et dans le nucléole, en utilisant l'immunofluorescence et la microscopie confocale. Cette méthode permet l'étude globale de la transcription endogène, sans utilisation de transgène. Le BrUTP peut être introduit dans l'ovocyte par microinjection (Bouniol-Baly et al., 1999) ou plus simplement après perméabilisation des membranes. En ce qui concerne la biologie du développement des mammifères, une seule étude rapporte l'application (et la mise au point) de la technique, et cette unique étude a été menée chez l'embryon de souris, aux stades 2-pronoyaux et 2-cellules (Aoki et al., 1997). Chez toutes les espèces mammifères examinées jusqu'à présent, l'activité transcriptionnelle de l'ovocyte augmente au cours de la phase de croissance ovocytaire et folliculaire, atteignant un pic au moment de la formation de l'antrum (Bloom et Mukherjee, 1972 ; Moore et al., 1974 ; Wassarman et Letourneau, 1976). Lorsque l'ovocyte a terminé sa croissance, la transcription diminue et est alors dépendante de la configuration de la chromatine de la vésicule germinative : transcription active dans les ovocytes de type NSN (nucléole non entouré) et inactive sur les ovocytes de type SN (nucléole entouré de chromatine dense ; Bouniol-Baly et al., 1999). Le stock d'ARN réalisé au long de la croissance ovocytaire (composé à plus de 60% d'ARN ribosomiaux ; Wassarman, 1988) est d'importance capitale puisqu'il doit permettre à l'ovocyte de réaliser la fécondation, la mise en commun des génomes paternel et maternel et le début du développement embryonnaire jusqu'à ce que le relais soit pris par la transcription du génome zygotique. La transcription est

donc un élément clef assurant la qualité de la maturation cytoplasmique de l'ovocyte. La chienne présentant des signes ultrastructuraux d'une reprise de la transcription nucléolaire en fin de maturation *in vivo*, il est capital d'explorer cette spécificité afin de mieux comprendre ce modèle de maturation ovocytaire si particulier.

Le but de notre étude est de vérifier si les modifications ultrastructurales du nucléole lors de la maturation *in vivo* s'accompagnent d'une modification de l'activité transcriptionnelle dans le nucléole et dans le nucléoplasme. Pour cela, nous allons dans un premier temps quantifier la transcription dans des ovocytes immatures provenant de follicules antraux d'ovaires de chiennes en anœstrus, afin de valider notre technique chez la chienne. Dans un second temps, nous quantifierons la transcription de l'ovocyte au cours de la période péri-ovulatoire.

## A. Matériel et Méthodes

Sauf indications contraires, les réactifs de l'étude proviennent de Sigma (St. Quentin-Fallavier, France).

### 1. Animaux

Vingt chiennes âgées de moins de 8 ans ont été utilisées dans cette étude. Pendant les chaleurs, des prises de sang ont été réalisées (une à trois fois par jour) à la veine céphalique ou jugulaire et le sang est transféré immédiatement dans des tubes en verre héparinés. Les échantillons sanguins ont été centrifugés pendant cinq minutes à 3000g, et le plasma a été prélevé. Un aliquot était utilisé pour un dosage immédiat du taux de progestérone. Un autre aliquot était stocké à -20°C pour dosage de LH.

La croissance folliculaire et le moment de l'ovulation ont été suivis par échographie ovarienne par voie transabdominale (échographe HDI3500, sonde 7,5 MHz ; ATL, Philips Systèmes Médicaux, Suresnes, France ; Reynaud et al., 2005).

Ce protocole a été approuvé par le comité éthique de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

### 2. Dosages hormonaux

La progestérone est dosée dans les échantillons de plasma avec un kit de chemiluminescence sur un automate Elecsys 1010 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les

coefficients de variation inter- et intra-dosage était de inférieurs à 5%. Les dosages de LH sont réalisés avec un kit ELISA (kit LH detect; INRA, Nouzilly, France; Guerin et al., 1997). Le logiciel Microcal Origin (Microcal software, Northampton, USA) nous a permis de déterminer la courbe gaussienne la mieux adaptée au profil de la concentration de la LH et le centre de cette courbe est utilisé dans cette étude comme moment du pic de LH.

### 3. Récolte des ovocytes

#### a) Durant l'anœstrus

Les ovaires de sept chiennes ont été collectés à l'issue d'ovariectomies ou d'ovariohystérectomies de convenance pratiquées par l'Unité de Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Les chiennes étaient toutes en anœstrus (absence de signes physiques de chaleurs et ovaires d'aspect lisse sans follicules ni corps jaune visibles). Les chaleurs précédentes avaient eu lieu 3 à 5 mois avant l'ovariectomie. Les ovaires ont été stockés dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) maintenu à 38,5°C et ils ont été transportés au laboratoire dans l'heure suivant leur exérèse. Les ovaires ont été isolés de la bourse ovarique et placés dans du milieu de dissection (M199/Hepes additionné de 20% v/v de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) et de 1% w/v de pénicilline/streptomycine. L'ovaire y est lacéré dans sa longueur et sa largeur à la lame de rasoir (« slicing method ») pour libérer les ovocytes (Reynaud et al., 2004). Seuls 87 ovocytes ont été conservés les ovocytes d'au moins 130 µm de diamètre (zone pellucide comprise), avec un cytoplasme sombre et homogène et entourés d'au moins 2 couches de cellules de cumulus.

#### b) En période péri-ovulatoire

Des ovariectomies ont été réalisées par des méthodes chirurgicales conventionnelles à différents moments des chaleurs : avant le pic de LH (n=2 chiennes) et après le pic de LH, respectivement avant (n=3) et après (n=10) l'ovulation. Les ovaires, les oviductes et l'apex des cornes utérines ont été collectés. Sur les ovaires prélevés avant l'ovulation, les diamètres folliculaires ont été mesurés par observation macroscopique et tous les follicules de plus de 2 mm ponctionnés individuellement à l'aide d'une pipette Pasteur étirée. Les liquides folliculaires ont été examinés sous loupe binoculaire pour collecter les ovocytes. Après l'ovulation, les ovocytes ont été récoltés par rinçage des oviductes avec du milieu de culture M199 supplémenté de 20% de sérum de veau fœtal à 38,5°C (Reynaud et al., 2005).

#### 4. Incorporation du BrUTP

L'incorporation de BrUTP est adaptée de la méthode décrite par Aoki et al. (1997). Les ovocytes sont rincés dans du PBS puis la membrane plasmique est perméabilisée pendant 3 minutes dans une solution de Triton X-100 à 0,1% dans le tampon physiologique (PB : acétate de potassium 100 mM, KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, ATP 1 mM, dithiothreitol (dT) 1 mM, PhenylMethylSulfonyl Fluoride (PMSF) 0,1 mM et RNAsine 50 U/ml). Après trois rinçages de 5 minutes dans le PB, les ovocytes sont placés 15 minutes à 33°C dans le milieu de transcription (TM : acétate de potassium 100 mM, AmSO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, ATP 2 mM, BrUTP 1,6 mM, CTP 1,6 mM, GTP 1,6 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, RNAsine 50 U/ml). Après trois rinçages de 5 minutes dans le PB, une perméabilisation de l'enveloppe nucléaire est réalisée pendant 3 minutes dans une solution de Triton X-100 à 0,4% dans le PB. Après trois rinçages dans le PB, les ovocytes sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dans le PB.

Dans certains cas, de l' $\alpha$ -amanitine (inhibiteur de l'ARN polymérase II et III ; 100  $\mu$ g/ml ; Roeder, 1976) ou de l'actinomycine D (inhibiteur de l'ARN polymérase I ; 20  $\mu$ g/ml) ont été rajoutés dans les solutions PB et TM.

#### 5. Immunocytochimie

Après un bain de saturation (dans une solution de Triton X-100 à 0,1% dans le PBS complété avec 10% de SVF) de 30 minutes à 37°C, les ovocytes ont été incubés 60 minutes à 37°C en présence d'anticorps monoclonal antiBrdU (reconnaissant aussi le BrU ; Boehringer, Roche Diagnostics, Meylan, France ; dilué au 1/100 dans une solution de PBS à 0,4% de sérumalbumine bovine (BSA fraction V ; PBS/BSA). Après trois rinçages de 15 minutes dans le PBS/BSA, les ovocytes ont été incubés 60 minutes à 37°C dans une solution d'anticorps anti-IgG de souris conjugués à un fluorochrome (Alexa Fluor 488 ; Molecular Probes, Invitrogen). Après un rinçage de 15 minutes dans le PBS/BSA, l'ADN a été marqué par l'éthidium homodimère 2 (Molecular Probes, Interchim, Asnières, France) par une incubation dans une solution au 1/250 dans le PBS/BSA 15 minutes à 37°C. Les ovocytes ont été post-fixés pendant 15 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 2% dans le PBS/BSA, rincés 15 minutes dans du PBS puis montés entre lame et lamelle (Vectashield, Vector Laboratories, Interchim, Asnières, France) et conservés à 4°C et à l'obscurité jusqu'à observation.

## 6. Quantification du signal fluorescent

La fluorescence a été détectée à l'aide d'un microscope confocal (CLSM 510 Carl Zeiss, Göttingen, Allemagne ; longueurs d'onde d'excitation à 488 nm et 543 nm). Des images ont été enregistrées en utilisant un objectif à huile à immersion de grossissement x63, en conservant toujours des réglages de gain, de temps de pose et de pinhole constants. Le pinhole était réglé à 818  $\mu\text{m}$  de manière à capter l'ensemble de la fluorescence émise par le noyau (sur les 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du noyau écrasé entre la lame et la lamelle). Certaines images ont été prises avec un pinhole de 90  $\mu\text{m}$  pour obtenir des tranches optiques plus fines (0,7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) et déterminer précisément la localisation du signal (à l'intérieur ou en périphérie du nucléole). Nous avons vérifié la stabilité du laser dans le temps, à l'aide d'un cristal de fluorescence, ainsi que la stabilité de la caméra, à l'aide d'une source fluorescente constante (Cho et Lockett, 2006). Les images étant toutes acquises dans les mêmes conditions, nous pouvons donc comparer quantitativement les signaux obtenus sur les différents ovocytes.

Le signal a été quantifié sur l'ensemble du volume du noyau et du nucléole à l'aide du logiciel Image J (Rasband, WS, National Institutes of Health, Bethesda, USA) en mesurant l'intensité totale du signal fluorescent sur l'ensemble du noyau et du nucléole. L'intensité du nucléoplasme a été déduite en soustrayant l'intensité du nucléole de l'intensité totale du noyau. L'intensité du signal non spécifique a été déterminée en omettant le BrUTP dans le milieu de transcription. Cette valeur a été retranchée de toutes les intensités mesurées. Les valeurs d'intensité sont exprimées en unités arbitraires.

## 7. Analyse statistique des données

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Des analyses de variance (ANOVA) et des tests de Student sont réalisés avec le logiciel Microcal Origin. Un test de corrélation de Pearson a été réalisé à l'aide du logiciel SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA 2002-2003). Les différences entre groupes avec  $p < 0,05$  ont été considérées comme significatives.

## B. Résultats

### 1. Détermination du temps optimal d'incorporation et de la concentration optimale en BrUTP

Les conditions d'incorporation que nous avons utilisées (présence de  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $AmSO_4$  et  $KCl$  dans la composition du milieu de transcription) permettent à la fois la transcription polymérase I et polymérase II dépendante (Masson et al., 1996). Afin de déterminer la durée optimale d'incubation dans le milieu de transcription ainsi que la concentration optimale en BrUTP de celui-ci, des ovocytes d'ovaires de chiennes en œstrus ont été incubés en présence de différentes concentrations en BrUTP (0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,6 et 3,2 mM,) ou en appliquant différents temps d'incubation dans le TM (0 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 30 et 60 mn). L'intensité de signal maximale est obtenue pour les ovocytes canins avec une incubation de 15 minutes en présence de 1,6 mM de BrUTP (Figure 19). Ces conditions ont donc été utilisées pour l'ensemble de l'étude.

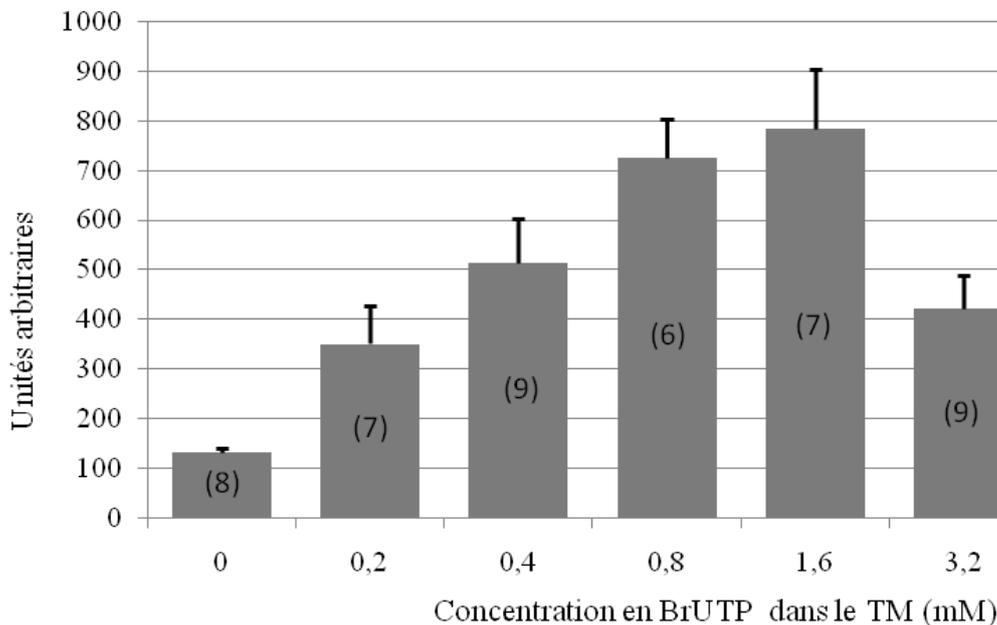
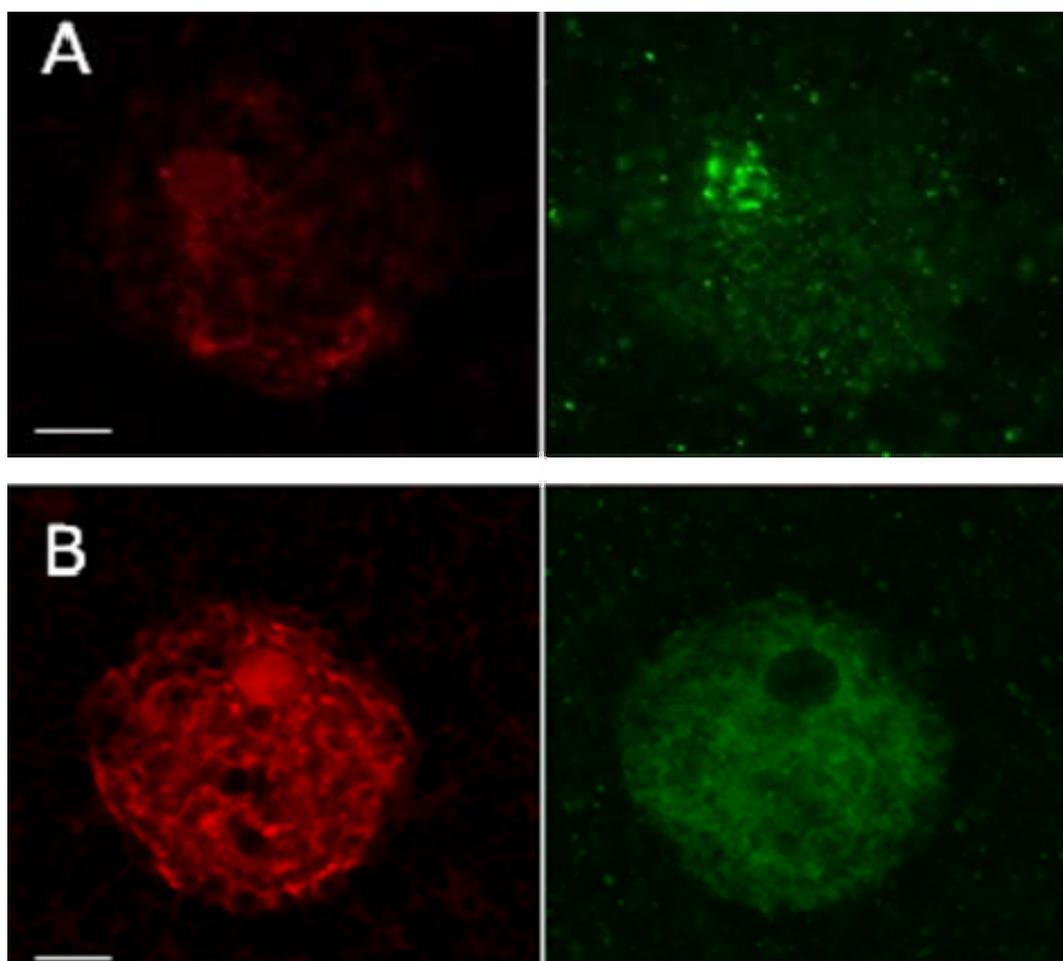


Figure 19: Variation de l'intensité du signal de transcription dans le nucléoplasme en fonction de la concentration en BrUTP. Les nombres entre parenthèses correspondent aux effectifs d'ovocytes et les barres d'erreur à l'erreur standard (SEM).

## 2. Quantification de la transcription nucléaire

### a) Transcription des ovocytes issus d'ovaires en anœstrus

La transcription dans le nucléoplasme a été observée sous la forme d'un signal de densité homogène dans l'ensemble du nucléoplasme (Figure 20). Le nucléole a présenté deux types de marquage. Le premier, observé dans 27 ovocytes, consistait en plusieurs zones très intenses et dispersées, en position intra-nucléolaire (Figure 20A). Le deuxième type de transcription nucléolaire correspondait à une absence totale d'incorporation de BrUTP à l'intérieur du nucléole, ce dernier étant entouré d'une zone fine de marquage intense (Figure 20B). Un marquage intra-nucléolaire intense était associé à la présence de chromatine montrant peu de signes de condensation alors qu'un marquage péri-nucléolaire correspondait à une chromatine plus condensée et à un nucléole montrant un aspect hétérogène au marquage à l'éthidium homodimère.



*Figure 20 : Images en microscopie confocale d'ovocytes issus de chiennes en anœstrus. L'ADN est marqué à l'éthidium homodimère (gauche) et la transcription est repérée par l'incorporation de BrUTP (droite). La transcription nucléoplasmique est intense. Le marquage nucléolaire est présent soit sous forme de gros points intranucléolaires (A), soit sous forme d'un anneau périnucléolaire (B). (barre d'échelle = 10  $\mu$ m).*

L'incorporation de BrUTP a été quantifiée dans 41 ovocytes provenant de 5 chiennes en anœstrus. Les intensités mesurées sont résumées dans la Figure 21 Figure 19.

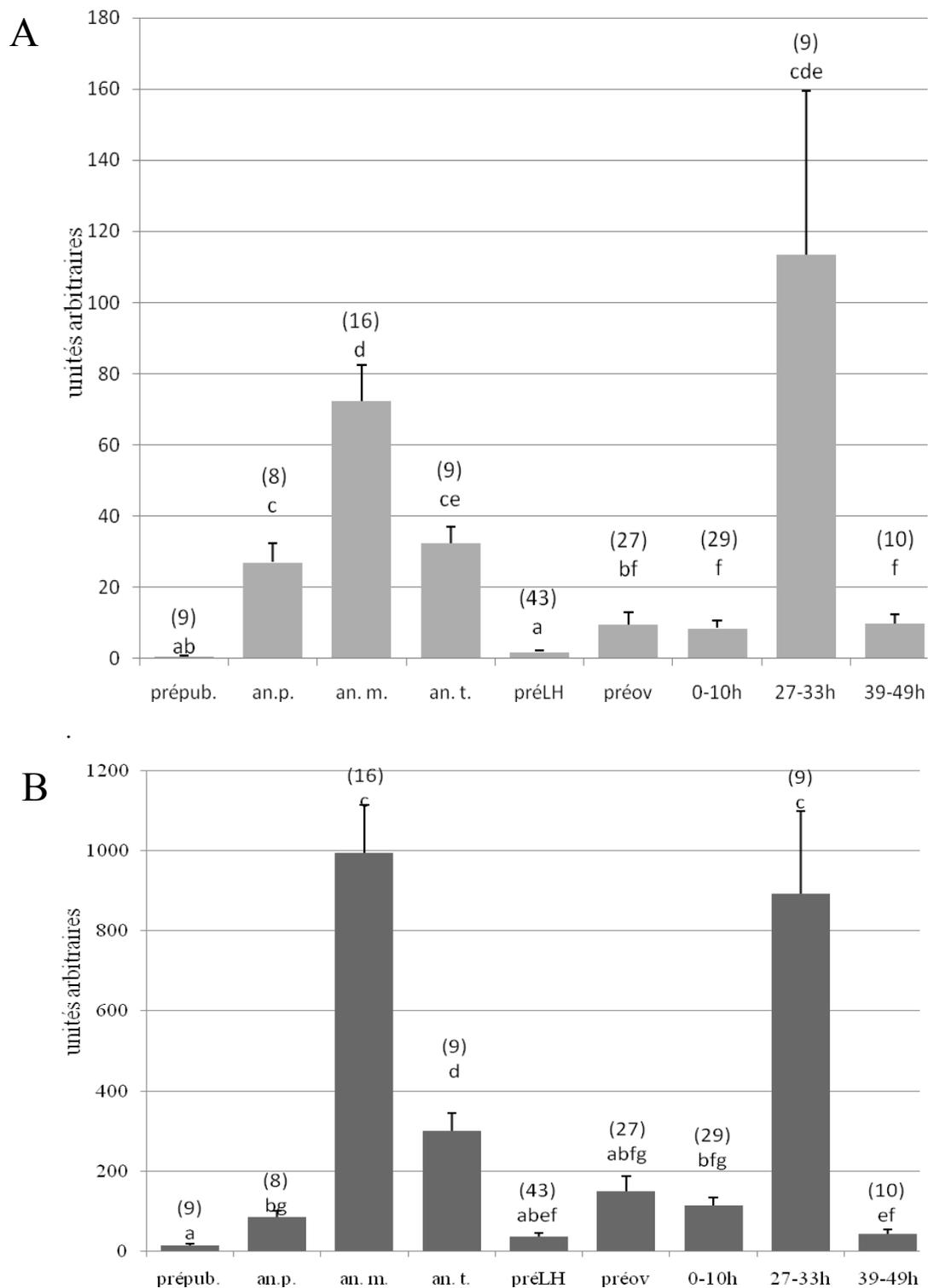


Figure 21 : Transcriptions nucléolaire (A) et nucléoplasmique (B) moyennes en fonction du stade du cycle. Stade prépubère (Prépub.), anœstrus précoce (an. p.), anœstrus moyen (an. m.), anœstrus tardif (an. t.), pré-ovulatoire (préov), et post-ovulation (0-10h, 27-33h et 39-48h). Le nombre d'ovocytes à chaque stade est inscrit entre parenthèses sur la colonne. La barre d'erreur représente l'erreur standard de la moyenne (SEM).

La transcription dans le nucléole et le nucléoplasme évoluent parallèlement. L'intensité totale mesurée dans l'ensemble du nucléoplasme est environ dix fois plus importante celle mesurée dans le nucléole ( $p < 0,0001$  ;  $r = 0,768$ ). L'intensité moyenne par unité de surface est significativement plus faible ( $p = 0,026$ ) dans le nucléoplasme que dans le nucléole (la densité moyenne dans le nucléoplasme vaut  $82 \pm 4$  % de celle du nucléole).

L' $\alpha$ -amanitine réduit la transcription dans le nucléoplasme de 65% ( $p = 0,04$ ) et augmente celle du nucléole de 155% ( $p = 3,8 \cdot 10^{-4}$  ; Figure 22), comme cela a déjà été décrit (Jackson et al., 1993 ; Wansink et al., 1993). L'actinomycine D n'a pas d'effet significatif sur la transcription dans le nucléoplasme ( $p = 0,78$ ) mais réduit la transcription dans le nucléole de 76% ( $p = 8 \cdot 10^{-4}$ ). Nous pouvons donc affirmer que le signal que nous observons est bien une combinaison de la transcription pol I dans le nucléole et pol II dépendante dans le nucléoplasme.

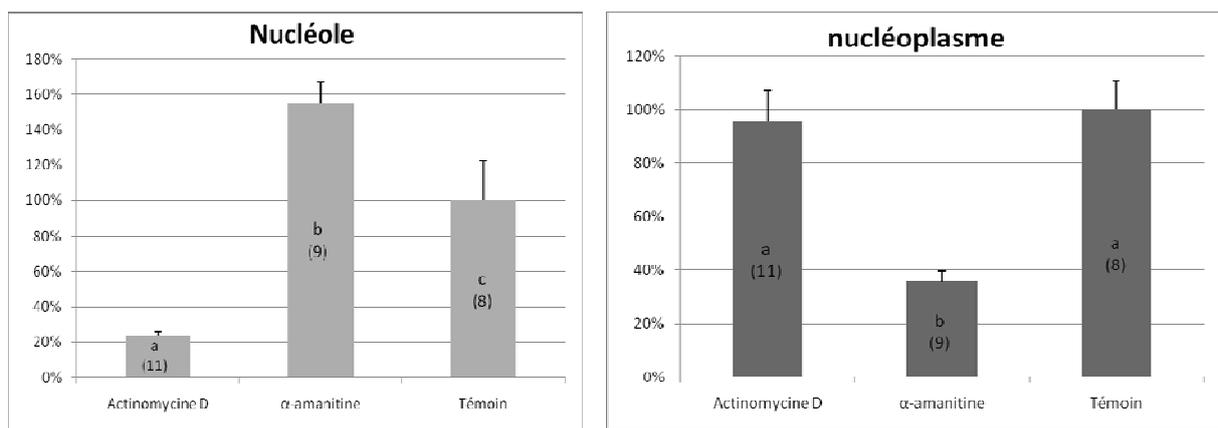


Figure 22 : Effets d'inhibiteurs sur l'activité transcriptionnelle dans le nucléole (gauche) et dans le nucléoplasme (droite) sur des ovocytes issus de chiennes en anoestrus. L'actinomycine D est un inhibiteur de l'ARN polymérase I et l' $\alpha$ -amanitine inhibe l'ARN polymérase II. Le lot témoin n'a subi aucune inhibition. Les colonnes portant des lettres différentes correspondent à des activités transcriptionnelles significativement différentes au seuil de 5%. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard (SEM) et le nombre d'ovocytes est indiqué entre parenthèses sur la colonne.

Parmi ces cinq femelles, une chienne âgée de 8 mois n'avait pas encore montré de signe de chaleurs (prépubère), une chienne était en transition metœstrus/anœstrus (anœstrus précoce), deux chiennes se trouvaient respectivement 3 et 4,5 mois après leurs dernières périodes de chaleurs (anœstrus moyen) et une dernière était 5 mois post chaleurs (anœstrus tardif). Nous avons observé une grande variation de signal entre chiennes, parallèle à leur avancement dans l'anœstrus (Figure 21). La chienne prépubère montrait une quasi inactivité transcriptionnelle. Les deux chiennes en anœstrus moyen présentaient une activité

transcriptionnelle élevée et les chiennes en anœstrus précoce et tardif présentaient un profil intermédiaire. Il existe une grande variabilité entre les ovocytes de ces chiennes (variation intra chienne), la quantité de marquage pouvant varier d'un facteur 5 entre les ovocytes issus des chiennes en anœstrus précoce et tardif (dans le nucléoplasme et dans le nucléole) et d'un facteur 15 pour les ovocytes provenant des chiennes en anœstrus moyen.

b) Transcription des ovocytes en période périovulatoire

(1) Avant le pic de LH

La transcription est globalement faible avant le pic de LH, aussi bien dans le nucléole que dans le nucléoplasme. Nous avons observé trois types d'organisations chromatiniennes sur les 43 ovocytes récoltés en période pré-LH. La majorité de ces ovocytes (n=30) présentait une chromatine décondensée et un gros nucléole sphérique réticulé (« VG décondensée » de type « nucléole non entouré » ou NSN, Figure 23.A). Les deux mêmes types de marquage nucléolaire décrits dans le groupe anœstrus ont été observés dans ce groupe pré-LH : marquage intra-nucléolaire (n=25) ou péri-nucléolaire (n=5 ; Figure 23.B). Les treize ovocytes restants présentaient une condensation chromatinienne plus poussée. Pour six ovocytes, cette condensation était limitée à une large masse irrégulière (Figure 23.C). Pour sept ovocytes, la condensation concerne l'ensemble de la chromatine qui se présentait alors sous forme de nombreux petits spots denses (Figure 23.D). Ces 13 ovocytes présentaient une incorporation de BrUTP faible, à l'exception de 3 ovocytes dont l'importante masse de chromatine condensée présentait une incorporation marquée.

Ces différents types de transcription semblent liés au stade de croissance folliculaire. Les deux chiennes ayant fourni des ovocytes au stade pré-LH présentaient un taux de progestérone sérique identique (1 ng/ml), mais l'une ne possédait que des petits follicules (2-3 mm) alors que l'autre, plus avancée dans sa croissance folliculaire, présentait des follicules de petit (< 3 mm) et de gros diamètres (3 à 5,5 mm). Les ovocytes de la chienne la plus précoce étaient tous des VG de type décondensé, 24 avec une transcription intra-nucléolaire et 2 avec une transcription péri-nucléolaire. Les ovocytes de la seconde chienne sont en majorité des VG à chromatine condensée (n=13), à faible signal, et trois des quatre VG décondensées restantes avaient une transcription péri-nucléolaire.

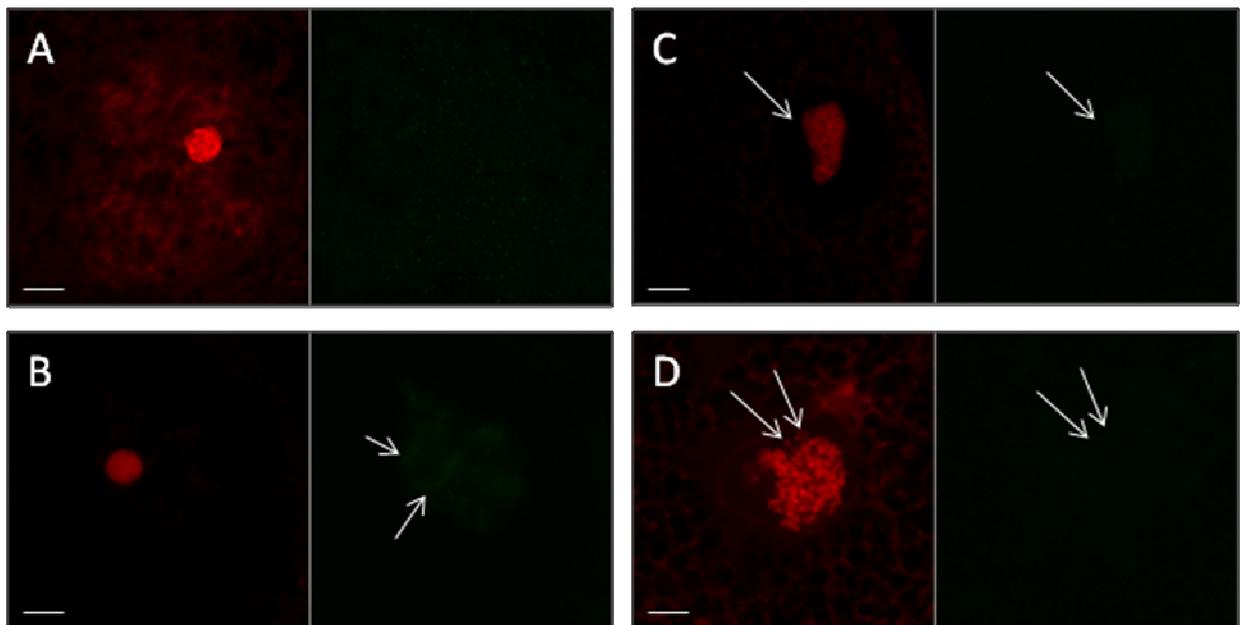
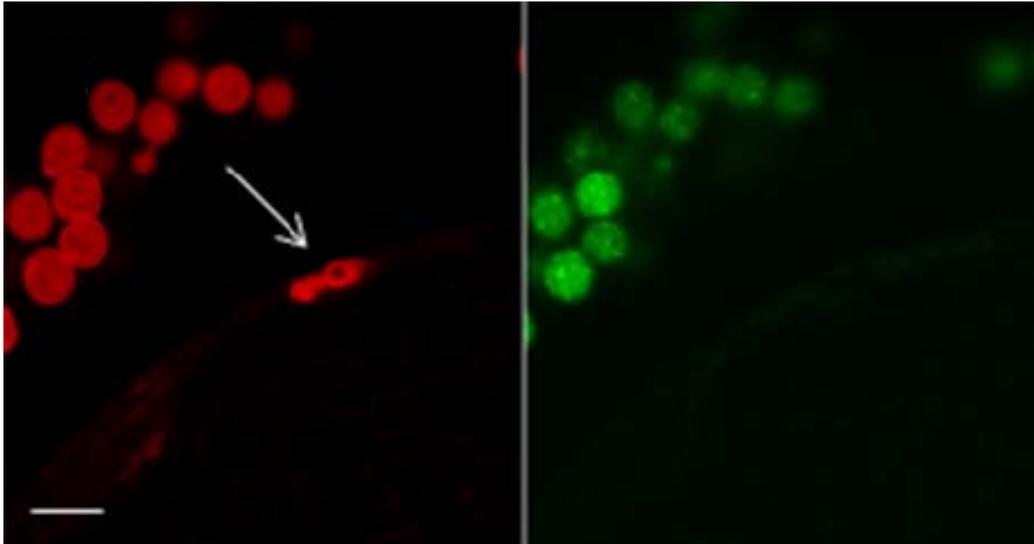


Figure 23 : Transcription (droite) dans le noyau de quatre ovocytes avant le pic de LH. Le marquage nucléoplasmique est faible. Le marquage nucléolaire est absent (A, C, D) ou périnucléolaire (B, flèches). Le marquage à l'éthidium homodimère (gauche) permet de distinguer des configurations chromatiniennes décondensées (A, B) et condensées en une large masse (C, flèche) ou en de nombreux spots (D) pouvant être associés à des nucléoles discrets (flèches). (barre d'échelle = 10 $\mu$ m)

## (2) Entre le pic de LH et l'ovulation

Nous avons observé 27 ovocytes provenant de 3 chiennes opérées respectivement 11, 26 et 48 heures après le pic de LH. Les configurations chromatiniennes sont très homogènes dans l'ensemble de ce groupe pré-ovulatoire. Les VG sont majoritairement de type nucléole entouré (Figure 24), à l'exception de deux d'entre elles dont la chromatine est condensée sous forme de nombreux petits spots répartis dans l'ensemble du noyau.

La transcription dans le nucléoplasme est moyenne pour la chienne la plus précoce du groupe et faible pour les deux autres. Aucune variation significative n'est observée entre les ovocytes issus des petits et des gros follicules. La transcription nucléolaire est faible dans l'ensemble des ovocytes pré-ovulatoires, à l'exception d'un nucléole ayant une intensité forte (81 U, soit du même ordre de grandeur qu'en anœstrus moyen ; Figure 24B) et de trois nucléoles ayant une intensité moyenne (30 à 40 U, soit du même ordre de grandeur qu'en anœstrus précoce ou tardif).



*Figure 24 : Transcription (droite) nucléaire dans des ovocytes issus de chiennes en période pré-ovulatoire. La transcription nucléoplasmique est d'intensité faible. Le marquage de l'ADN (gauche) permet de distinguer des nucléoles de type entouré (flèche) présentant une inactivité transcriptionnelle. Noter la transcription très active dans les cellules du cumulus. (barre d'échelle = 10 $\mu$ m).*

### (3) En période post-ovulatoire

Deux chiennes ont été stérilisées au cours du processus d'ovulation (l'ovulation de tous les follicules chez la chienne peut s'étendre sur 24 à 36h ; Reynaud et al., 2006). Elles ont fourni 8 ovocytes encore intrafolliculaires et 8 ovocytes ovulés. Les incorporations en BrUTP de ces deux populations (folliculaire et oviductale) sont faibles et ne sont pas significativement différentes ( $p=0,98$ ).

Deux chiennes stérilisées 7h et 10h après l'ovulation ont fourni 9 et 4 ovocytes respectivement, présentant une transcription nucléoplasmique non significativement différente de celle des deux chiennes opérées pendant l'ovulation ( $p=0,47$ ). Ces quatre chiennes comptent en tout 29 ovocytes présentant une activité transcriptionnelle assez faible.

Les chiennes opérées à 27 et 33 heures post ovulation ont fourni 9 ovocytes présentant une transcription très intense (Figure 25A). Leur transcription nucléoplasmique est identique à celle des ovocytes en anœstrus moyen et est significativement supérieure à tous les autres groupes de l'étude. La transcription nucléolaire pour les deux chiennes à ce stade est identique à celle des ovocytes en anœstrus précoce, moyen et tardif. Si on considère uniquement les ovocytes de la chienne à 27 heures post-ovulation, la transcription nucléolaire y est significativement supérieure à celle de tous les groupes de l'étude, y compris pour l'anœstrus. La transcription nucléolaire lors de cette phase de réactivation post ovulatoire est quantitativement deux fois supérieure à l'activité mesurée en anœstrus moyen.

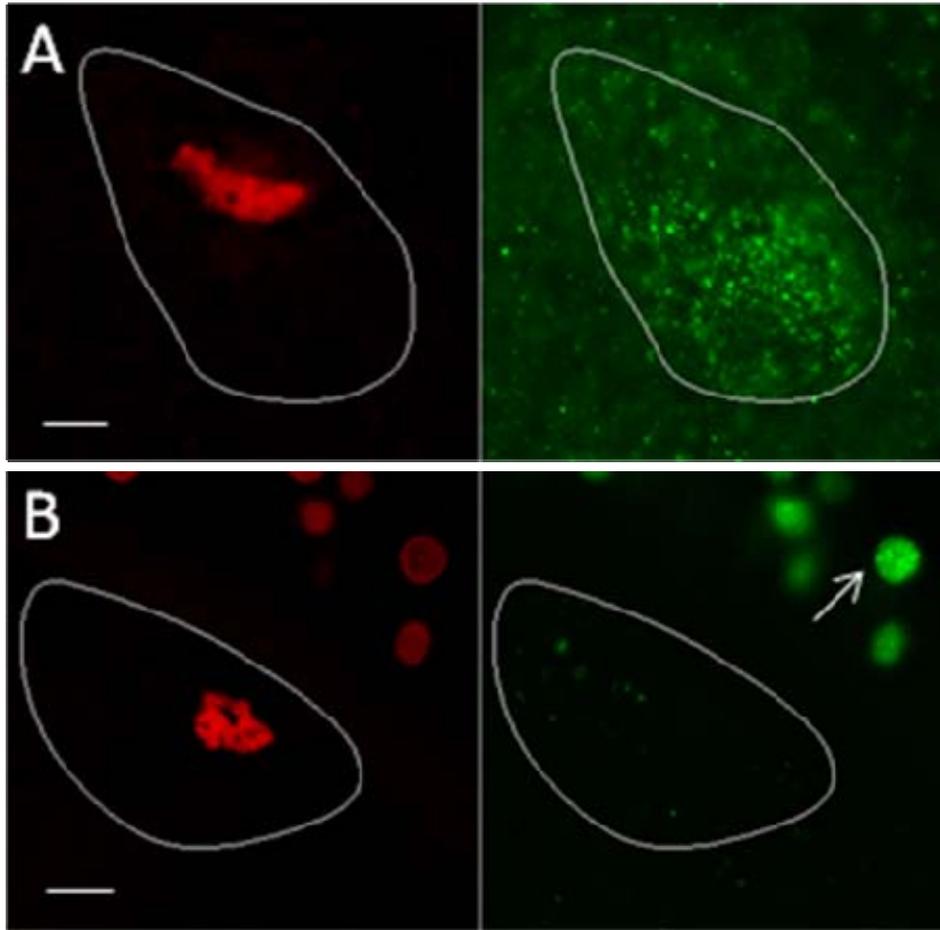


Figure 25 : Transcription (droite) intense dans un ovocyte issu d'une chienne 27 heures post ovulation (A) et assez faible dans un ovocyte issu d'une chienne 39 heures post ovulation (B). L'ADN est faiblement marqué (gauche) dans l'ensemble du noyau (ligne blanche) à l'exception d'une masse dense. (barre d'échelle = 10  $\mu$ m)

Douze ovocytes provenant de quatre chiennes stérilisées entre 39 et 48h post ovulation présentaient une transcription assez faible (Figure 25B), significativement inférieure à celles observées en œstrus précoce et tardif ainsi que pendant les 10 premières heures post ovulation.

### C. Discussion

Notre étude a pour la première fois montré et quantifié la transcription dans l'ovocyte de chienne au cours de la maturation in vivo. Toutes espèces confondues, seules trois études d'incorporation de BrUTP ont été menées sur des ovocytes ou des embryons de mammifères : Bouniol-Baly et al. (1999) ont employé cette technique sur des ovocytes de souris par microinjection et seuls Aoki et al. (1997 et 2003) l'ont mise en œuvre sans microinjection mais avec perméabilisation des membranes. Leur objectif était l'étude de la mise en route de

la transcription zygotique, également chez la souris. Les autres travaux basés sur l'incorporation du BrUTP par perméabilisation des membranes portaient sur des cellules somatiques (Jackson et al., 1993 ; Wansink et al., 1993 ; Hozak et al., 1994 ; Pombo et Cook, 1996). Cette technique qui permet une quantification globale de la transcription endogène, représente un outil puissant en biologie du développement, qui mériterait d'être appliquée à de nombreuses situations et adaptée à d'autres espèces animales que la souris et le chien.

Même si la technique est particulièrement intéressante, notre étude n'a finalement porté que sur un nombre relativement limité d'ovocytes, puisque menée *in vivo*. Nous avons pu recruter 20 chiennes, permettant la collecte de 160 ovocytes, pour couvrir les différents stades du cycle, de l'anœstrus jusqu'à la phase post-ovulatoire. Cet effectif, même s'il mériterait d'être augmenté, est supérieur à celui de beaucoup des rares études portant sur l'ovocyte *in vivo* chez la chienne (17 chiennes en période péri-ovulatoire ; Lee et al., 2006 ; 5 chiennes 72 heures post ovulation, Kim et al., 2007).

Nous pouvons comparer quantitativement la transcription entre les chiennes grâce à notre effort de standardisation de la prise de mesure et nous nous sommes assurés de la stabilité de l'ensemble laser, microscope et caméra. Le fait d'avoir pu quantifier la totalité du signal émis dans le noyau (au lieu de sa densité par unité de surface) nous a permis de nous affranchir des variations de volume du noyau liées à des variations inter-ovocytaires, à la différence de maturation et à la variabilité de l'écrasement de l'ovocyte entre lame et lamelle.

La chienne prépubère de notre étude a montré une transcription nucléoplasmique quasi nulle. Au cours de l'anœstrus, nous avons observé une augmentation de la transcription entre le début et le milieu de l'anœstrus. La transcription diminue ensuite en se rapprochant de la période de début des chaleurs (pré-LH). Le profil transcriptionnel ainsi tracé au cours de l'anœstrus mériterait d'être enrichi d'autres chiennes à dates de chaleurs connues ; il suggère cependant, comme cela a déjà été décrit lors d'études endocrinologiques (Okkens et Kooistra, 2006), que toutes les périodes de l'anœstrus ne sont pas équivalentes et que l'anœstrus n'est pas une période d'inactivité ovarienne. Nos résultats, bien que nécessitant d'être complétés par une étude plus poussée sur les différentes périodes de l'anœstrus, suggère qu'il existe une reprise de maturation ovocytaire en anœstrus moyen, et donc probablement une reprise de croissance folliculaire parallèle, pendant laquelle la transcription est intense. La transcription diminue durant l'anœstrus tardif en se rapprochant de la période des chaleurs et de la phase de croissance folliculaire terminale. Deux conclusions s'offrent alors à nous. Tout d'abord, la transcription des ovocytes durant l'anœstrus étant intense, le stock d'ARN n'est donc alors pas complet et est signe d'immaturité cytoplasmique. Cette population ovocytaire

correspondant à la source d'ovocytes majoritairement utilisés en maturation *in vitro*, cela pourrait expliquer, au moins partiellement, les résultats médiocres de maturation *in vitro*, de fécondation *in vitro* et de développement embryonnaire. D'autre part, nos résultats suggèrent l'existence d'une maturation ovocytaire, et donc probablement d'une croissance folliculaire, en anœstrus chez la chienne. Ce phénomène pourrait être rapproché des vagues folliculaires observées durant l'anœstrus saisonnier de la jument ou de la brebis (Evans, 2003). Une étude histologique précise du diamètre folliculaire au cours de l'anœstrus pourrait répondre à la question de l'existence de vagues folliculaires chez la chienne.

L'activité transcriptionnelle des ovocytes reste ensuite très faible tout au long de la période des chaleurs jusqu'à 27 et 33 heures post ovulation où un pic majeur de réactivation transcriptionnelle est observé. Ce pic s'étale peu dans le temps puisque dès 39 à 48h post ovulation, la transcription est redevenue basse. Bien que nous n'ayons pas assez d'ovocytes pendant la période de réactivation pour conclure, il semblerait que la transcription nucléolaire s'arrête avant celle du nucléoplasme. Notre étude a donc permis de confirmer que les modifications ultrastructurales des nucléoles observées entre 32 et 68h post-ovulation (Viaris de Iesegno et al., 2008) correspondent en effet à une modification fonctionnelle. Cette reprise de transcription est intense, d'une durée maximale de 24 heures (elle commencerait vers 24h post ovulation et est terminée dès 39 à 48h post ovulation) et concerne les ARN ribosomiaux et les ARN messagers. Une réactivation si nette et longue n'a été décrite chez aucune autre espèce mammifère. Il a cependant été prouvé que la transcription pouvait être indispensable à la reprise de méiose *in vitro* chez le bovin (Kastrop et al., 1991). L'inhibition par l' $\alpha$ -amanitine a prouvé que la transcription d'ARNm est indispensable à la rupture de la vésicule germinale (GVBD) dans 75% des ovocytes provenant de follicules antraux de 4 à 8 mm de diamètre. La synthèse protéique étant elle aussi, dans les mêmes conditions (Kastrop et al., 1991), nécessaire au passage au stade GVBD, une transcription nucléolaire (ARN ribosomiaux) parallèle est tout à fait concevable aussi. L'étude de l'équipe de Kastrop ne parvient cependant pas à conclure si cette transcription a lieu dans l'ovocyte ou dans le cumulus. Une étude a en effet montré que l'action de l' $\alpha$ -amanitine est à peine discernable sur des ovocytes dénudés de leur cumulus (Hunter et Moor, 1987). Le cumulus pourrait donc jouer un rôle soit dans la transcription, soit dans le transport de l' $\alpha$ -amanitine vers l'ovocyte. Notre étude prouve que, dans le cas de la reprise de transcription post-ovulatoire chez la chienne, il s'agit bien de transcription ovocytaire. La transcription dans le cumulus n'a pas été quantifiée dans notre étude, mais elle était présente et intense, et pourrait donc participer de façon non négligeable à la formation du stock d'ARN ovocytaire.

Notre étude montre qu'il existe chez la chienne une corrélation forte entre le niveau des transcriptions nucléaire et nucléolaire qui varient dans le même sens au cours de la maturation ovocytaire *in vivo*. D'autre part, d'un point de vue structural, l'intensité de la transcription de l'ovocyte est liée à la configuration de la chromatine dans la vésicule germinale. Cette observation a déjà été réalisée chez d'autres espèces comme la souris (Bouniol-Baly et al., 1999) ou l'homme (Miyara et al., 2003). Les ovocytes à nucléole non entouré de chromatine dense (NSN) restent transcriptionnellement actifs et synthétisent toutes les classes d'ARN, alors que les ovocytes à nucléole entouré de chromatine dense (SN) sont transcriptionnellement inactifs. Les nucléoles de type NSN sont associés à une plus grande immaturité ovocytaire et les nucléoles de type SN à une maturation terminale de l'ovocyte *in vivo*. Une transcription active est donc le signe d'une immaturité cytoplasmique, le stock d'ARN ovocytaire étant incomplet.

Nous n'avons aucune information sur les gènes concernés par cette transcription post-ovulatoire ni sur l'importance, qualitative et quantitative, à lui attribuer. Cette question demanderait à être approfondie en comparant le transcriptome de l'ovocyte avant et après cette réactivation. Le développement récent des techniques de puces à ADN a permis d'étudier le transcriptome de l'ovocyte chez la femme (Kocabas et al., 2006 ; Assou et al., 2006), la souris (Cui et al., 2006) et la vache (Misirioglu et al., 2006 ; Fair et al., 2007) et la réalisation d'une telle étude sur l'ovocyte canin pourrait présenter un intérêt plus que certain. Le fait que cette réactivation ait lieu dans l'oviducte suggère l'existence possible d'un signal d'induction de reprise de la transcription présent dans le fluide oviductal un peu avant 24h post ovulation. Il faudrait vérifier cette hypothèse en étudiant la composition du fluide oviductal au cours des jours suivant l'ovulation. Afin de déterminer s'il existe un signal extérieur induisant la réactivation de la transcription post-ovulatoire, ou si seul le passage du milieu folliculaire au milieu oviductal suffit à cette induction. Nous pourrions ainsi étudier l'effet de la culture d'ovocytes préovulatoires dans du fluide oviductal (naturel ou synthétique comme le SOF).

L'existence d'une composante nucléolaire du pic de transcription post-ovulatoire pose une question sur l'utilisation des ARNr synthétisés pendant cette période. Ils pourraient être stockés en vue d'une utilisation ultérieure ou immédiatement processés pour former des ribosomes et aboutir à des synthèses protéiques. L'étude du protéome autour du pic de réactivation transcriptionnelle pourrait permettre de vérifier cette hypothèse et d'identifier d'éventuelles protéines indispensables à la maturation ovocytaire terminale.

Si notre étude met en évidence l'existence d'une réactivation transcriptionnelle post-ovulatoire, nous n'avons pas d'information sur l'importance qualitative qu'elle revêt. Les premières métaphase I sont décrites à partir de 48h post ovulation (Tsutsui, 1975a ; Reynaud et al., 2005), la réactivation que nous décrivons a donc lieu peu de temps avant la reprise de la méiose. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de cette phase de réactivation transcriptionnelle sur le taux de reprise de méiose d'ovocytes préovulatoires mis en culture in vitro. L'effet de l'inhibition sélective de la transcription ARN polymérase I et II dépendante ainsi que de l'inhibition de la synthèse protéique pourraient être réalisées en parallèle.

## **IV. Approche ultrastructurale de la maturation ovocytaire canine in vitro**

Les conditions de maturation in vitro actuellement utilisées sont loin d'être adaptées au modèle physiologique de reproduction si particulier que présente la chienne. En effet, chez cette dernière, plusieurs ovocytes immatures sont ovulés alors que la progestérone est déjà élevée et la méiose ne reprend qu'après deux ou trois jours passés dans l'oviducte (Tsutsui et Shimizu, 1975 ; Reynaud et al., 2005). Malgré l'existence de ces spécificités, les conditions de culture utilisées pour l'ovocyte canin sont calquées sur celles utilisées chez les autres mammifères. Les nombreuses conditions physiques ou chimiques testées jusqu'à présent n'ont pas apporté d'améliorations notables (voir partie I.B) et les taux de métaphase II obtenus tournent autour de 10 à 20%, ce qui est très loin des 80 à 90% obtenus en routine chez la vache et la souris.

Si les conditions de culture sont loin d'être optimales pour la maturation nucléaire, elles ne le sont a priori pas plus pour la maturation cytoplasmique puisque les quelques ovocytes ayant repris leur méiose in vitro n'autorisent pas une fécondation in vitro (FIV) normale ni un développement embryonnaire (Luvoni et al., 2006) : le taux de pénétration des spermatozoïdes est faible (environ 10% des ovocytes au stade métaphase II) et le taux de polyspermie est élevé (Saint-Dizier et al., 2001). Reste à déterminer si les problèmes rencontrés en FIV sont uniquement dus à une réaction corticale anormale (défauts quantitatifs et/ou qualitatifs des granules corticaux) ou s'ils sont dus à une immaturité globale du cytoplasme ovocytaire.

La source principale d'ovocytes canins pour la MIV correspond à des follicules antraux d'ovaires provenant d'ovariectomies de routine effectuées sur des chiennes en anœstrus. Dans une étude précédente (Viari de lesegno et al., 2008), nous avons suggéré qu'à la vue de l'immaturité marquée des ovocytes récoltés dans des gros follicules antraux (2-3 mm de diamètre) au cours des chaleurs, autour du pic de LH, les follicules antraux d'ovaires en anœstrus devaient contenir des ovocytes encore plus immatures. Les ovocytes canins utilisés en MIV seraient alors en retard en terme de maturation par rapport à ceux des autres mammifères.

L'évaluation de la qualité de la MIV comporte deux volets : la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique. Cette dernière a été très peu étudiée et utilisée chez la chienne.

En effet, la FIV, critère d'évaluation cytoplasmique utilisé chez les autres espèces, reste toujours infructueuse chez cette espèce. Nous disposons uniquement de données limitées et peu précises sur l'ultrastructure des ovocytes canins avant culture (Robertson et al., 1992 ; Lopez et al., 2006), et d'aucune après culture. La seule évaluation actuellement utilisée pour la MIV canine concerne donc la maturation nucléaire et consiste à évaluer le stade nucléaire de l'ovocyte et encore celui-ci n'est-il pas évalué toujours de façon fiable, avec parfois de forts taux d'ovocytes restant « non déterminés » (voir I.C).

Le but de notre étude est donc, dans un premier temps, d'évaluer précisément, à l'aide de la microscopie électronique à transmission, la qualité nucléaire et cytoplasmique des ovocytes provenant de follicules antraux d'ovaires en anœstrus. Nous nous intéresserons ensuite à la qualité de la maturation in vitro, ce qui nous permettra d'une part de déterminer si les ovocytes qui n'ont pas repris leur méiose ont subi une maturation anormale ou seulement incomplète. Enfin, nous évaluerons la maturation cytoplasmique des ovocytes ayant achevé leur méiose.

## A. Matériel et méthodes

Sauf précision, tous les produits proviennent de Sigma (St Quentin-Fallavier, France). Les milieux de dissection et de culture sont stérilisés à l'aide d'un filtre Minisart (0,2 µm).

### 1. Récolte des ovocytes

Les ovaires de 15 chiennes de races variées, pubères, de moins de 8 ans ont été collectés à l'issue d'ovariectomies ou d'ovariohystérectomies de convenance pratiquées par l'Unité de Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Les chiennes étaient toutes au stade anœstrus : ovaire d'aspect lisse sans follicules ni corps jaune visibles, dernières chaleurs datant de plus de trois mois et absence de signes physiques de chaleurs. Les ovaires sont disséqués afin de libérer les ovocytes (voir III.A.3.a).

### 2. Mise en culture

Les ovocytes sont rincés deux fois dans du milieu de culture M199 additionné de 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté et de 1 % de pénicilline/streptomycine dans du M199) puis mis en maturation par groupes de 20 pendant 72h dans 500 µl de milieu de culture à 38,5°C en atmosphère modifiée (5% CO<sub>2</sub>) et saturée en eau.

### 3. Préparation des échantillons et observation en microscopie électronique à transmission

Les COCs sont fixés, immédiatement après récolte ou après 72h de culture puis inclus en résine époxy. Les COCs sont entièrement coupés en semi-fines et les coupes d'intérêt sont réincluses et observées en microscopie électronique (voir II.B.4).

### 4. Analyse statistique des données

L'analyse des données a été réalisée par analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Student-Neuman Keuls à l'aide du programme SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA 2002-2003). Les différences ont été considérées comme significatives quand la valeur de p était inférieure à 0,05. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM.

## B. Résultats

### 1. Classification des stades et mesures

#### a) Ovocytes témoins (non maturés)

Des ovocytes de huit chiennes en anœstrus ont été observés sur coupes semi-fines immédiatement après collecte. Sur 39 ovocytes, seuls 5 % étaient dégénérés (n=2). Tous les ovocytes étaient au stade de vésicule germinative (VG ; prophase I). Parmi les ovocytes non dégénérés, 73 % avaient un noyau central (n=27) et 27% avaient un noyau périphérique ou excentré (n=10). Ces deux classes seront nommées dans la suite du texte VG centrales (VGc) et VG périphériques (VGp) respectivement. Cinq ovocytes de chacune de ces deux classes ont été mesurés et observés en microscopie électronique à transmission après réinclusion.

La quantité et la proportion de chacun des types d'ovocytes sont résumées dans la Figure 26.

#### b) Ovocytes après maturation in vitro

##### (1) Classification des ovocytes

Sur quinze chiennes en anœstrus, 157 ovocytes mis en maturation pendant 72h ont été observés sur coupes semi-fines. Les 29 ovocytes (19%) ne présentant pas de matériel génétique, ayant une répartition très irrégulière des lipides ou avec de très grosses vésicules,

ont été considérés comme dégénérés. Seuls cinq ovocytes avaient atteint le stade métaphase I (3%) et cinq autres le stade métaphase II (3%). Sur les 118 ovocytes restants, l'observation en microscopie optique nous a permis de distinguer trois types de VG. Les VG à noyau central sont classées comme VG<sub>1</sub> et sont au nombre de 38 (29%). Les ovocytes à noyau périphérique sont divisés en deux catégories. La première catégorie présente un noyau plutôt sphérique, avec peu de replis de l'enveloppe et un gros nucléole rond (10 µm de diamètre) non attaché à un nuage de chromatine condensée (nucléole non entouré). Ces ovocytes sont dénommés VG<sub>2</sub> et sont au nombre de 65 (41%). La seconde catégorie présente un noyau plus aplati, avec des replis importants de l'enveloppe et un nucléole plus petit (5-7 µm) accolé à un nuage de chromatine condensée (nucléole entouré). Cette dernière catégorie est dénommée VG<sub>3</sub> et regroupe 15 ovocytes (10%).

La quantité et la proportion de chacun des types d'ovocytes sont résumées dans la Figure 26.

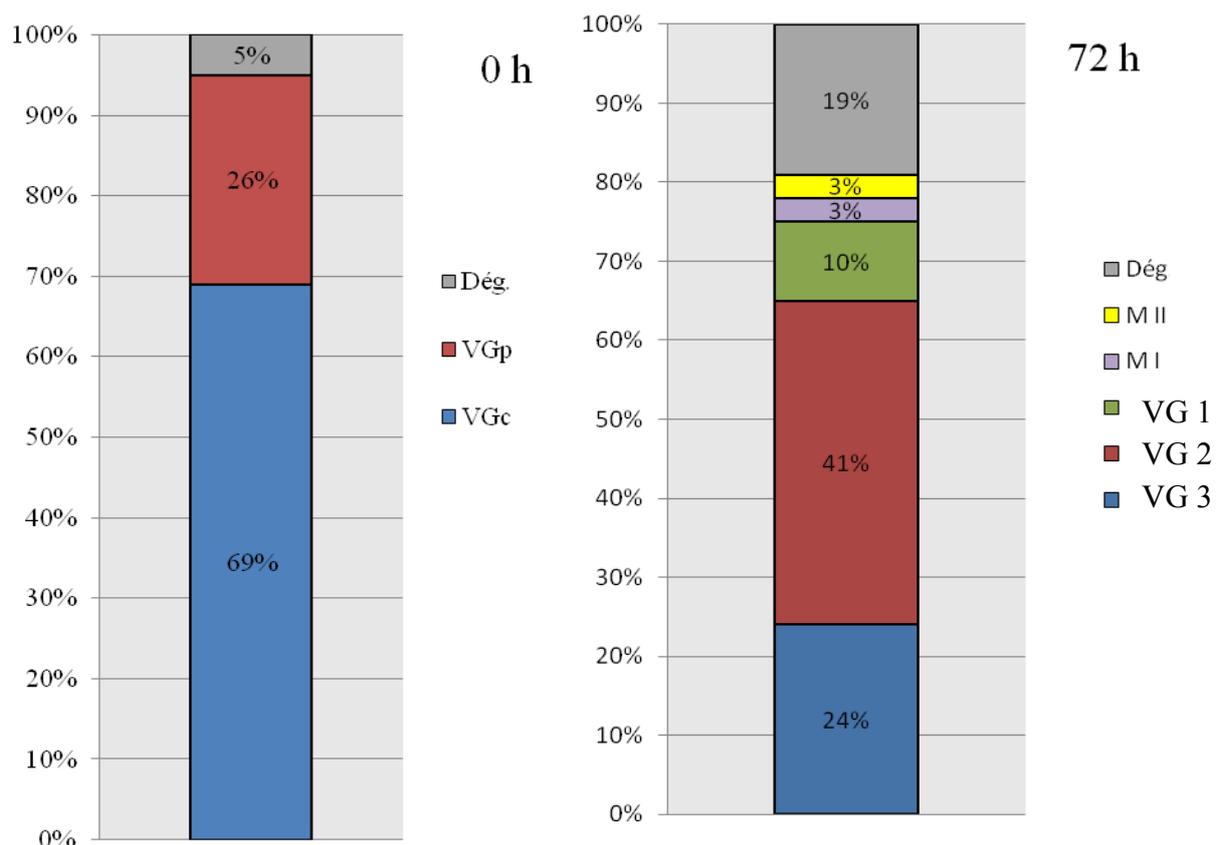


Figure 26 : Trois types d'ovocytes sont présents avant culture (n=39 ; gauche) : ovocyte à noyau central (VGc, n=27), à noyau périphérique (VGp, n=10) et montrant des signes de dégénérescence (dég., n=2). Après 72 heures de culture (n=157 ; droite), en plus des ovocytes dégénérés (dég., n=29) et des ovocytes aux stades métaphase I (MI, n=5) et II (MII, n=5), trois types d'ovocytes au stade de la vésicule germinative sont distinguables d'après des critères morphologiques : les ovocytes à noyau central (VG1, n=38) et les

ovocytes à noyau périphérique avec un nucléole non entouré (VG2, n=65) ou non entouré (VG3, n=15).

## 2. Mesures

Le diamètre cytoplasmique de l'ovocyte est de  $121,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$  en moyenne pour les cinq types de VG (avant et après culture). Il est par contre significativement différent de celui des ovocytes au stade métaphase I et II, qui atteint  $131,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$  ( $p=0,013$ ).

La zone pellucide est significativement plus fine chez les ovocytes au stade métaphase I et II ( $7,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) que chez les ovocytes au stade VG ( $9,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) ( $p=0,012$ ). Cette différence est compatible avec l'augmentation de diamètre de l'ovocyte sans augmentation du volume de la zone pellucide.

## 3. Ultrastructure des ovocytes non maturés

### a) L'ovocyte non mûré à noyau central (VGc)

Le noyau est sphérique ( $30 \mu\text{m}$  de diamètre environ) et renferme un nucléole en position excentrée, mesurant environ  $10 \mu\text{m}$  (Figure 27A). Seuls de très rares signes de condensation chromatinienne sont notés. Le nucléole est bien sphérique (Figure 27C) dans trois des cinq ovocytes et son organisation est de type fibrillo-granulaire (Figure 27D).

L'ovocyte est assez pauvre en mitochondries. Elles sont présentes en densité importante dans la région corticale (Figure 27F) et sous forme de petits clusters épars dans le reste du cytoplasme (Figure 27E,F). On observe quelques nuages mitochondriaux (Figure 27G). Ces rassemblements de mitochondries autour d'une sphère granuleuse dense (le ciment intermitochondrial) correspondent à des zones de multiplication rapide des mitochondries. Le cytoplasme est assez pauvre en appareil de Golgi et en réticulum endoplasmique. Ces deux organites sont retrouvés dans les régions corticale et péri-nucléaire. Les granules corticaux sont peu nombreux et présents sous forme soit de petits groupes à côté de la membrane plasmique, soit isolés en profondeur dans le cytoplasme (Figure 27F).

Le cumulus est composé de nombreuses petites cellules rondes arrangées en deux ou trois rangs. Deux des cinq cumulus présentaient quelques rares cellules dégénérées. Il est intéressant de noter que les deux ovocytes correspondant sont ceux qui présentaient un nucléole de forme irrégulière.

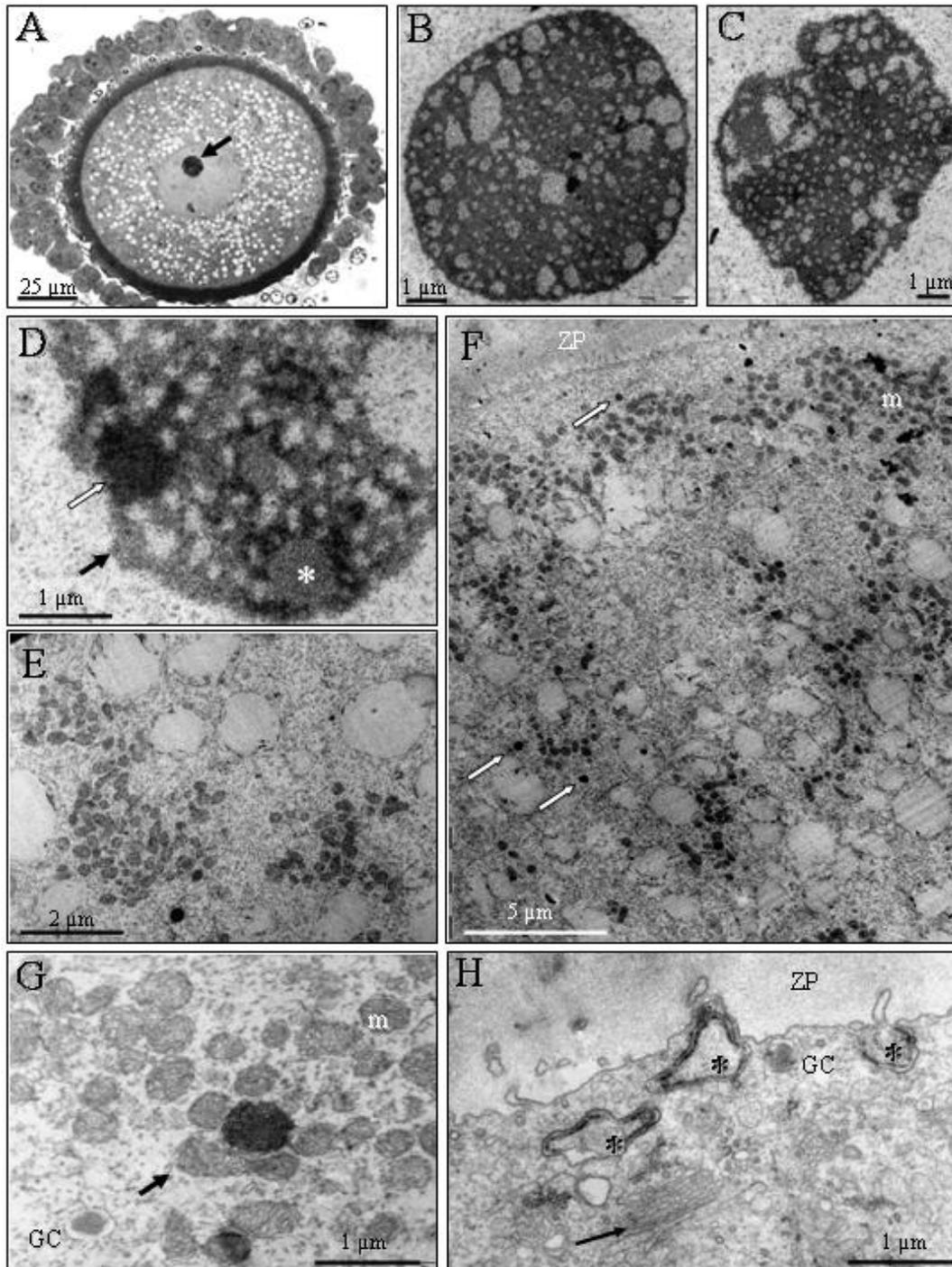


Figure 27 : Ovocyte à noyau central avant culture (VGc). **A** : Coupe semi-fine d'une VGc. Le noyau central renferme un gros nucléole (flèche). **B** : Coupe ultra-fine d'un nucléole réticulé arrondi. **C** : Nucléole réticulé difforme. **D** : Détail des trois compartiments d'un nucléole réticulé : centres fibrillaires (flèche noire), composé granulaire (astérisque) et composé fibrillaire dense (flèche blanche). **E** : Petits clusters de mitochondries répartis dans le cytoplasme. **F** : Mitochondries (m) concentrées dans la zone corticale. Quelques rares granules corticaux (flèches, confirmés à plus fort grossissement) sont présents dans la zone corticale ou en profondeur dans le cytoplasme. **G** : Les nuages mitochondriaux (flèches) sont fréquents. **H** : De nombreuses projections transzonales (astérisque) traversent la zone pellucide (ZP) et forment des jonctions avec la membrane plasmique. L'appareil de Golgi (flèche) et les granules corticaux (GC) sont localisés à proximité de ces jonctions.

La zone pellucide est d'aspect homogène et régulièrement traversée par les nombreuses projections transzonales (TZP) émises par le cumulus. Les terminaisons des TZP entrent en contact avec la membrane plasmique et forment des jonctions (Figure 27H). Les terminaisons s'arrêtent soit en surface de l'ovocyte en formant un bulbe, soit elles pénètrent jusqu'à 1 µm de profondeur sous forme d'une mince formation tortueuse. On retrouve généralement dans le cytoplasme de l'ovocyte, autour des contacts formés par la TZP, une zone riche en appareil de Golgi, en réticulum endoplasmique et en granules corticaux (Figure 27H). Les terminaisons dégénérées des TZP sont très rares et n'ont été observées que sur un des deux ovocytes présentant des signes de dégénérescence dans le cumulus.

b) L'ovocyte non mûré à noyau périphérique (VGp)

Ce groupe est beaucoup plus hétérogène que celui des VGc. Les noyaux sont périphériques ou nettement excentrés et soit bien sphériques, soit aplatis contre la membrane (Figure 28A). Un des cinq noyaux présente un nucléole sphérique fibrillo-granulaire avec une structure réticulée parsemée régulièrement de petites vacuoles (Figure 28B). Trois noyaux présentent des nucléoles de forme irrégulière avec une réticulation plus lâche (Figure 28C, D). Le cinquième noyau présente un nucléole non réticulé, formé d'une sphère dense surmontée d'un centre fibrillaire (Figure 28E). Ces trois types d'organisation nucléolaire sont des signes ultrastructuraux correspondant respectivement au passage d'un état d'activité transcriptionnelle vers une désactivation progressive de plus en plus poussée (sous réserve de validation fonctionnelle). A noter que parallèlement à cette désactivation nucléolaire s'observe une ondulation de l'enveloppe nucléaire de plus en plus marquée.

Les mitochondries sont plus nombreuses que dans les VGc. Le déséquilibre de densité de la région corticale et du reste du cytoplasme tend à diminuer et les clusters observés sont plus gros, voire fusionnés en grandes traverses (Figure 28F). Les nuages mitochondriaux sont rares. Le réticulum endoplasmique est présent en grande quantité, sous formes de vésicules éparses localisées soit au sein des clusters de mitochondries, soit dans la région corticale (Figure 28G). Les régions corticale et péri-nucléaire sont riches en appareil de Golgi bien développé (Figure 28G). Les granules corticaux sont assez nombreux et présents exclusivement sous la membrane plasmique, régulièrement dispersés sur sa surface. Ils se concentrent entre le noyau et la membrane plasmique (Figure 28G).

Plus l'inactivation nucléolaire est poussée, plus les signes de dégénérescence dans le cumulus et au niveau des terminaisons des TZP sont visibles. Aucun des cinq ovocytes du groupe n'a développé d'espace périvitellin.

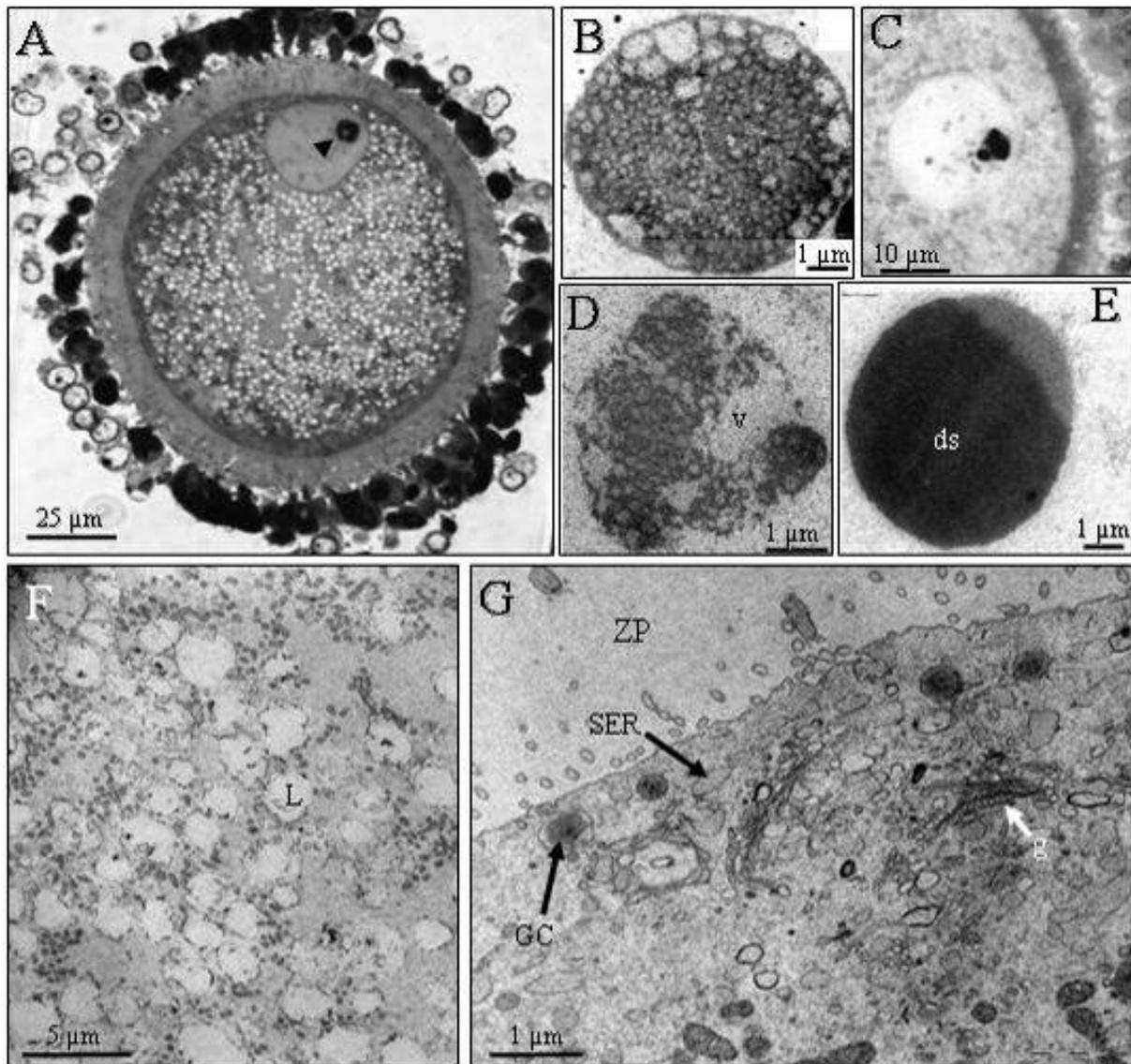


Figure 28 : Ovocyte à noyau périphérique avant culture (VGp). **A** : Coupe semi-fine d'une VGp présentant un gros nucléole (flèche). **B** : Coupe ultra-fine d'un nucléole sphérique présentant de petites vacuoles régulières. **C** : Aspect en microscopie optique sur coupe semi-fine d'un nucléole réticulé difforme. **D** : Aspect du même nucléole en microscopie électronique. Une grosse vésicule s'ouvre sur le nucléoplasme (flèche). **E** : Un nucléole condensé composé d'une sphère dense accolée à une zone de centre fibrillaire. **F** : Les mitochondries sont nombreuses et organisées en grand cluster ou en travées entre les gouttelettes lipidiques (L). **G** : La zone corticale est riche en granules corticaux (GC) accolés à la membrane plasmique, ainsi qu'en réticulum endoplasmique lisse (SER) et en appareil de Golgi (g).

#### 4. Ultrastructure des ovocytes après maturation in vitro

##### a) Ovocyte à noyau central après maturation (VG<sub>1</sub>)

Le noyau est similaire à celui des VGc (enveloppe lisse, nucléole sphérique et réticulé et condensation chromatinienne peu marquée ; Figure 29A, B). Le cytoplasme a, lui aussi, une organisation assez similaire à celle des VGc mais il est cependant plus riche en réticulum endoplasmique et en appareil de Golgi dans les régions corticale et péri-nucléaire. Ces deux types d'organites sont aussi présents ailleurs dans le cytoplasme sous forme d'agrégats dans quelques grandes zones de 10 à 30 µm de diamètre (Figure 29C, D). Ces zones sont visibles sur coupes semi-fines en microscopie optique (Figure 29A). On observe parfois une organisation concentrique des vésicules de réticulum endoplasmique autour d'une ou plusieurs gouttelettes lipidiques (Figure 29E). Les granules corticaux sont eux aussi plus nombreux que chez les VGc et présents soit à proximité de la membrane plasmique, soit en profondeur dans le cytoplasme, voire contre le noyau.

Les cellules du cumulus ont une forme plus anguleuse et allongée que celles entourant les ovocytes de type VGc. Les signes de dégénérescence sont rares. La zone pellucide est toujours adhérente à la membrane plasmique mais beaucoup plus lâche du côté des cellules du cumulus qui ne sont plus engluées dedans. Les TZP sont tout à fait similaires à celles des VGc, tant quantitativement que morphologiquement.

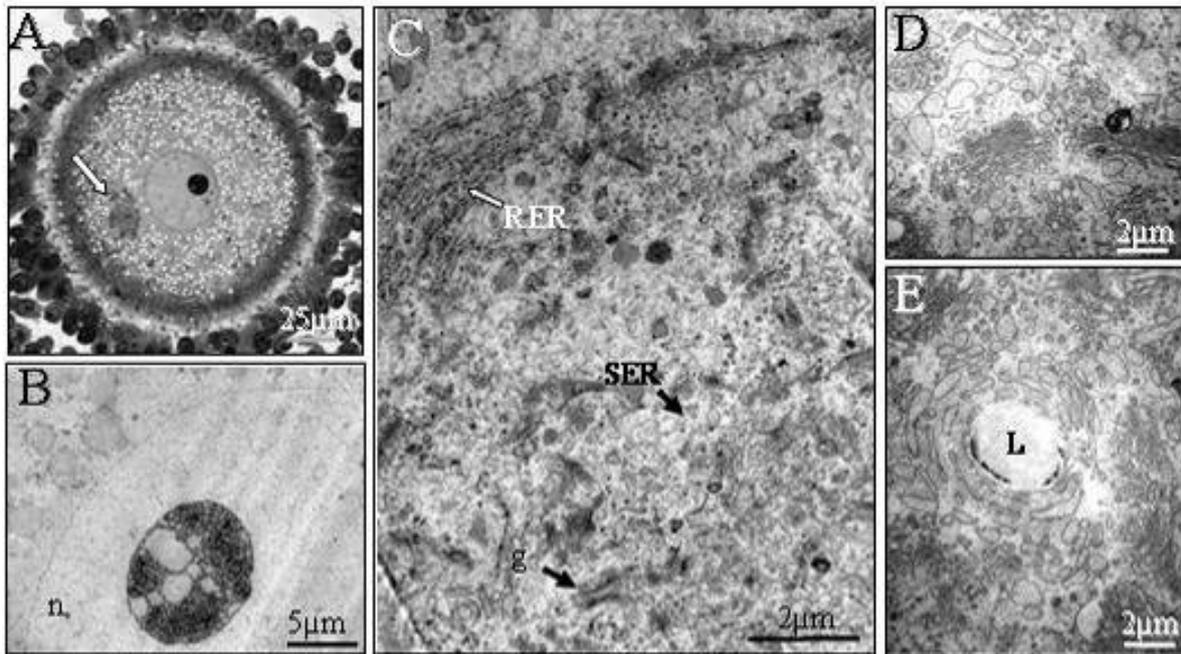


Figure 29 : Ovocyte à noyau central après culture (VG<sub>1</sub>). **A** : Coupe semi-fine d'un VG<sub>1</sub> présentant un gros agrégat formé d'appareil de Golgi et de réticulum endoplasmique (flèche, composition confirmée en microscopie électronique). **B** : Coupe ultra-fine d'un noyau avec un nucléole réticulé à vacuoles de tailles hétérogènes. **C** : Gros agrégat d'appareil de Golgi (g) et de réticulum endoplasmique lisse (SER) et rugueux (RER). **D** : Détail d'un agrégat montrant l'association d'appareil de Golgi et de SER. **E** : Arrangement concentrique de vésicules de SER autour d'une vésicule lipidique.

b) Ovocyte à noyau périphérique et nucléole non entouré après maturation (VG<sub>2</sub>)

Le noyau est sphérique ou légèrement aplati contre la membrane plasmique (Figure 30A). L'enveloppe nucléaire est soit lisse, soit légèrement ondulée (sur moins de 1 μm d'amplitude). Une légère condensation chromatiniennne est visible, sous forme de masses de 1 à 2 μm de diamètre. Les nucléoles sont réticulés et fibrillo-granulaires, mais leurs différents composés (centres fibrillaires, composants fibrillaires denses et composants granulaires) sont plus séparés que chez les VGc et VG<sub>1</sub> et forment de grandes zones (Figure 30B, C). Les nucléoles n'étaient jamais accolés à un nuage de chromatine condensée.

Les mitochondries sont plus nombreuses chez les VGc et VG<sub>1</sub>, mais moins que chez les VGp. Leur densité est importante dans la région corticale. Ailleurs on retrouve des clusters de mitochondries de taille petite à moyenne. Les grandes zones d'agrégats de réticulum endoplasmique et d'appareil de Golgi déjà observées chez les VG<sub>1</sub> sont aussi présentes, avec en plus, accolées d'un côté de sa surface, des lignes parallèles de réticulum endoplasmique

rugueux (RER). Le RER est aussi présent dans la zone corticale du cytoplasme (Figure 30D). Les granules corticaux sont plus nombreux que chez les VGc et VG<sub>1</sub>. La grande majorité est localisée sous la membrane (Figure 30E) et ils ne sont observés que rarement plus en profondeur.

Le cumulus est très similaire à ceux des VG<sub>1</sub>, avec cependant quelques vésicules cytoplasmiques sombres. Les terminaisons transzonales profondes sont toujours présentes alors que les superficielles sont pour la plupart soit absentes soit montrent des signes marqués de dégénérescence. On observe assez fréquemment de grosses terminaisons dégénérées de TZP, partiellement rétractées, à mi-hauteur de la zone pellucide. Les microvillosités émises par l'ovocyte sont couchées le long de la membrane plasmique et des quelques terminaisons transzonales persistantes.

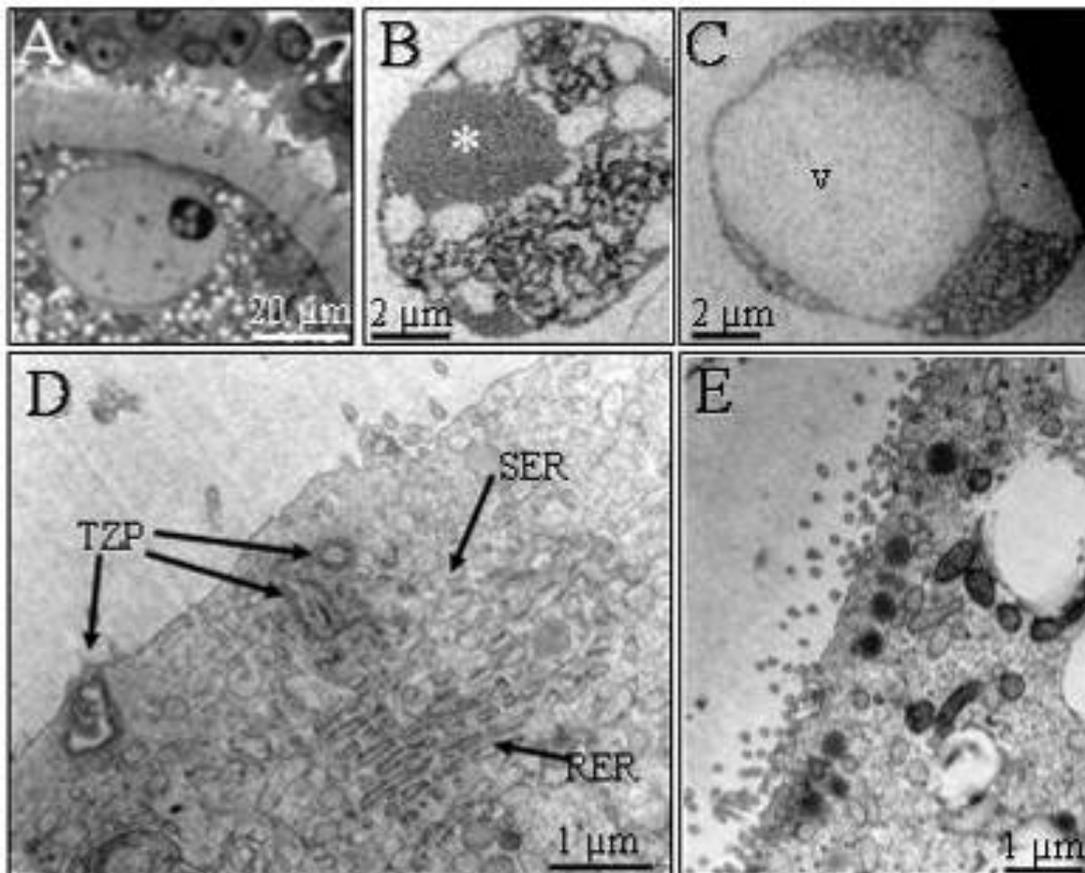


Figure 30 : Ovocyte à noyau périphérique et nucléole non entouré après culture (VG<sub>2</sub>). **A** : Coupe semi-fine d'un noyau de VG<sub>2</sub>. De grosses vacuoles intra-nucléolaires sont visibles en microscopie optique. **B** : Coupe ultra-fine d'un nucléole réticulé présentant une grosse zone de composé granulaire (astérisque). **C** : Grosse vacuole (V) dans un nucléole réticulé. **D** : Détail d'une zone corticale avec de nombreuses vésicules de réticulum endoplasmique lisse (SER), des rangées parallèles de réticulum endoplasmique rugueux (RER) et des terminaisons transzonales profondes (TZP). **E** : Granules corticaux alignés contre la membrane plasmique.

c) Ovocyte à noyau périphérique et nucléole entouré après maturation (VG<sub>3</sub>)

Le noyau est aplati contre la membrane plasmique et son enveloppe forme des invaginations pouvant atteindre 15 µm de long face à la membrane plasmique (figure 32 A, B, C) et des ondulations nettes sur les faces perpendiculaires. Les nucléoles sont plus petits que dans les autres stades (ils mesurent de 6 à 8 µm de diamètre) et montrent des signes d'inactivation partielle, comme observé chez les VGp (figure 32 B-E). La condensation chromatinienne est plus marquée que dans tous les autres types de VG.

Le cytoplasme montre une organisation très homogène : on ne distingue plus de clusters d'organites ni de différence de densité entre la région corticale et le reste du cytoplasme. Les espaces ménagés entre les gouttelettes lipidiques sont remplis par des mitochondries entremêlées à de nombreuses vésicules de réticulum endoplasmique (figure 32 F). Les nuages mitochondriaux sont rares et présentent des vacuoles plus ou moins importantes au niveau du ciment intermitochondrial (figure 32 G). L'appareil de Golgi est présent en quantité plus faible que chez les VG<sub>2</sub> et est limité à la région corticale de trois des cinq ovocytes observés. Les deux derniers ovocytes présentent de gros agrégats d'appareil de Golgi et de réticulum endoplasmique, déjà décrits dans les deux autres types de VG après maturation. Les granules corticaux présentent la même répartition que celle des VGp : répartition régulière tout le long de la membrane et concentration en un gros cluster entre le noyau et la membrane plasmique.

Les cellules dégénérées dans le cumulus sont peu nombreuses. De rares zones peu étendues sont dépourvues de cellules. Seule la couche la plus interne de cellules est encore présente, à l'exception d'un ovocyte qui possède une seconde couche de cellules mais très majoritairement dégénérées. Comme pour les VG<sub>1</sub> et VG<sub>2</sub> les cellules du cumulus sont assez allongées, mais elles ont en plus des noyaux de forme très irrégulière. Comme dans le cas des VG<sub>2</sub>, les terminaisons superficielles des TZP sont rarement encore en contact avec l'ovocyte et sont majoritairement dégénérées et partiellement rétractées (figure 32 H). Les terminaisons profondes sont beaucoup moins nombreuses qu'aux stades précédents et on ne les observe plus en contact avec une portion proximale de TZP (figure 32 J). Sur certaines coupes, on s'aperçoit que la membrane plasmique s'invagine et que des jonctions se forment alors entre les portions de membranes accolées (figure 32 K). Les rares terminaisons profondes observées pourraient donc correspondre à un repli de la membrane sur elle-même, mais observé sous un angle de coupe différent.

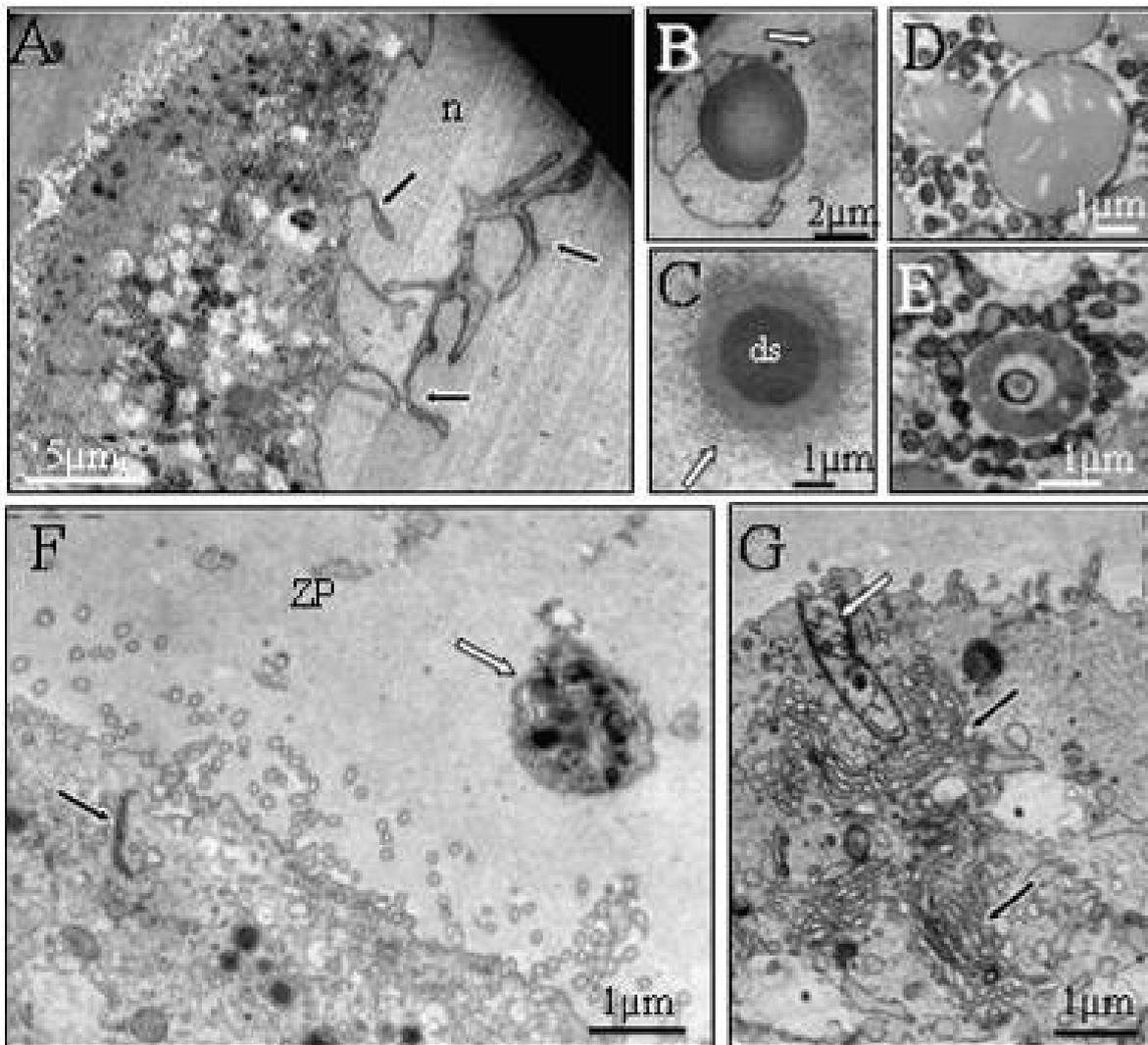


Figure 31 : Ovocyte à noyau périphérique et nucléole entouré après culture (VG<sub>3</sub>). **A** : Coupe ultra-fine d'une portion de noyau (n) montrant des invaginations importantes de son enveloppe. **B** : Nucléole partiellement inactivé entouré d'une masse de chromatine dense. **C** : Nucléole condensé composé d'une sphère dense (ds) entourée d'un anneau de centre fibrillaire et de chromatine condensée (flèche). **D** : Portion de cytoplasme. Les mitochondries et les vésicules de réticulum endoplasmique lisse occupent tous les espaces ménagés entre les gouttelettes lipidiques. **E** : Nuage mitochondrial présentant une grosse vacuole en son centre. **F** : Terminaison de projection transzonale partiellement rétractée dans la zone pellucide (flèche blanche). Une portion de membrane plasmique est repliée sur elle-même et les portions juxtaposées forment une jonction (flèche noire). **G** : Jonction membranaire (flèche blanche) correspondant plus probablement à une section de repli membranaire qu'à une terminaison de projection cytoplasmique. Plusieurs saccules de l'appareil de Golgi sont rassemblés autour de la zone de jonction membranaire (flèche noire).

#### d) Ovocytes au stade métaphase I

Les chromosomes sont alignés en une plaque métaphasique parallèle à la membrane plasmique (Figure 32A). Ils sont soit séparés sous forme de patch de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre soit accolés en une grande masse informe (Figure 32B). Des filaments forment un fuseau autour des chromosomes, délimitant une région de 15  $\mu\text{m}$  de large sur 12  $\mu\text{m}$  de haut sans organites.

Les cinq ovocytes au stade métaphase I de notre étude présentent tous une pauvreté en appareil de Golgi, une forte quantité de réticulum endoplasmique lisse et la présence d'une densité en organites supérieure dans la région corticale. Quatre des ovocytes étaient très riches en mitochondries réparties en forte densité dans la région corticale et sous forme de grandes travées ailleurs. Le cinquième ovocyte était nettement plus pauvre en mitochondries, avec une répartition similaire à celle des VGc (forte densité corticale et petits clusters peu nombreux ailleurs). Des nuages mitochondriaux n'ont été observés que très rarement et uniquement sur un des quatre ovocytes riches en mitochondries.

Les granules corticaux sont répartis régulièrement le long de la membrane plasmique dans les ovocytes au stade métaphase I riches en mitochondries et en quantité plus faible que dans l'ovocyte pauvre en mitochondries. Dans les deux cas, les granules corticaux ne sont présents que sous la membrane plasmique et jamais plus en profondeur.

Deux modèles de distribution du réticulum endoplasmique lisse sont observés. Dans trois des métaphases I riches en mitochondries, il est présent sous forme de nombreuses vésicules éparses dans l'ensemble du cytoplasme. Dans les deux dernières métaphases I, les vésicules de réticulum se regroupent les unes contre les autres pour former des structures très denses, en lignes parallèles ou concentriques (Figure 32C, D). Ces structures sont présentes en périphérie du cytoplasme et la densité en réticulum est faible en dehors de ces agrégats.

Il est intéressant de noter que, parmi les deux ovocytes de ce second modèle d'organisation, l'ovocyte pauvre en mitochondries était totalement dénudé et le riche était faiblement dénudé (sur moins d'un quart de sa surface). Les trois autres ovocytes, possédant à la fois une quantité importante de mitochondries et une répartition homogène du réticulum endoplasmique ont un cumulus intact. Les cellules du cumulus sont petites, anguleuses, et ne montrent que rarement des signes de dégénérescence. Elles développent souvent des bourgeonnements cytoplasmiques à leur base (Figure 32E), ce qui n'a jamais été observé sur aucun des ovocytes au stade VG de notre étude, avant ou après maturation. Les rares terminaisons transzonales observées sont dégénérées ou rétractées. Un fin espace périvitellin est visible.

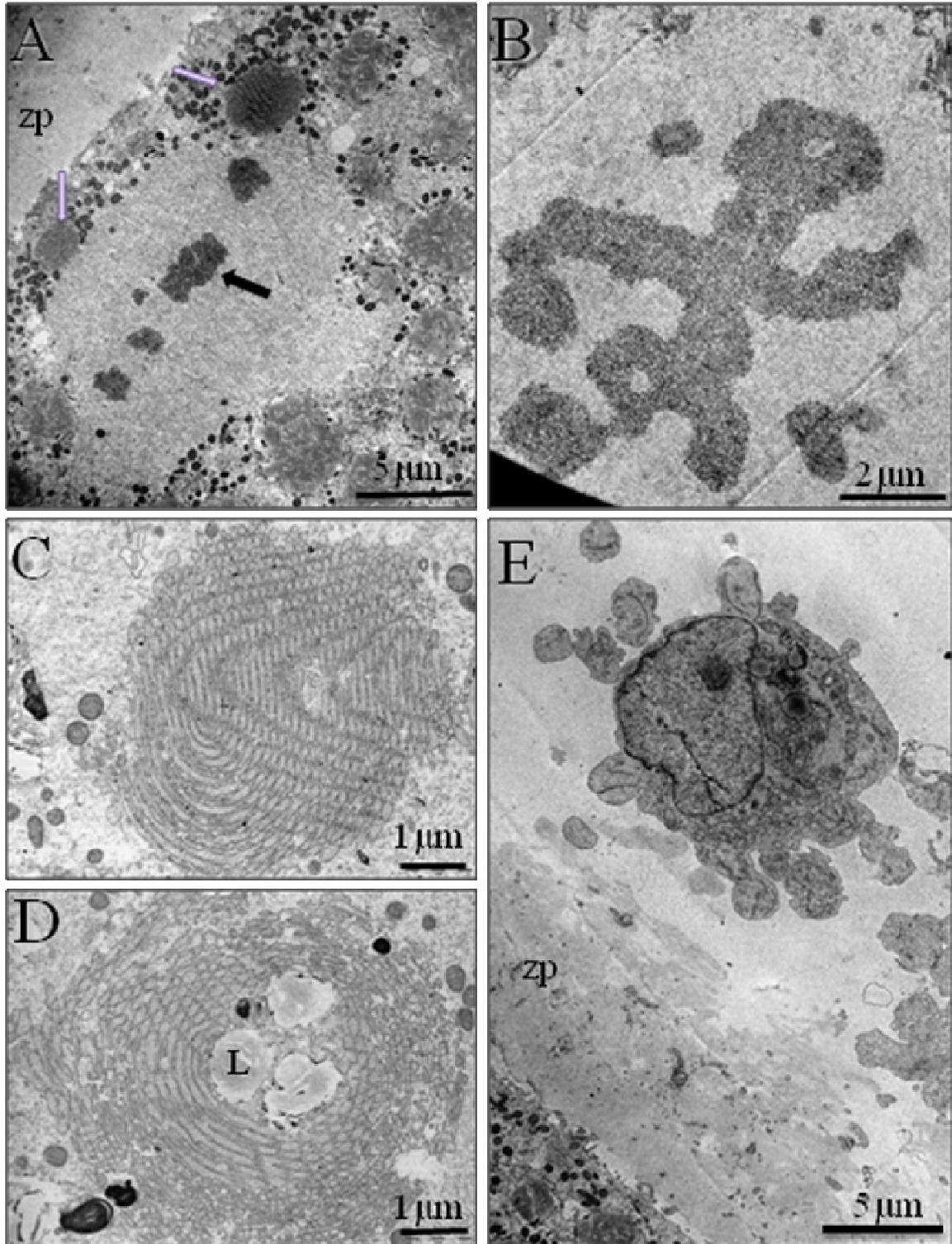


Figure 32 : Ovocyte au stade métaphase I. **A** : Chromosomes (flèche noire) alignés sur une plaque métaphasique parallèle à la membrane plasmique. Deux agrégats de vésicules de réticulum endoplasmique lisse sont visibles (flèche blanche, confirmé à plus fort grossissement). **B** : Chromosomes agrégés sur une plaque métaphasique. **C** : Détail d'un agrégat de réticulum endoplasmique lisse. **D** : Arrangement concentrique de réticulum endoplasmique lisse autour de trois vésicules lipidiques (L). **E** : Bourgeonnements sur des cellules du cumulus (zp = zone pellucide).

#### e) Ovocytes au stade métaphase II

Parmi les cinq ovocytes intégrés dans ce dernier groupe, un seul n'avait pas complètement expulsé son globule polaire qui restait en communication avec le cytoplasme de l'ovocyte par une zone d'étranglement de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 33A). Cet ovocyte, bien qu'en fait au stade anaphase I sera traité parmi les métaphases II. Deux masses de chromosomes étaient présentes, une dans le cytoplasme et l'autre dans le globule polaire, ce dernier contenant aussi un centre organisateur des microtubules. Il n'y avait pas de filaments organisés autour de la masse chromosomique dans le cytoplasme. Les quatre autres ovocytes du groupe présentaient une expulsion complète de leur globule polaire et les chromosomes avaient reformé une plaque métaphasique dans le cytoplasme, tout à fait similaire à celle observée en métaphase I. De très nombreuses et très longues microvillosités recouvrent le globule polaire dans les cinq ovocytes.

L'ovocyte au stade anaphase I présentait une très haute densité en mitochondries, jamais atteinte sur aucun autre ovocyte de l'étude. Les mitochondries étaient concentrées dans les 10  $\mu\text{m}$  les plus périphériques du cytoplasme. Ailleurs, les mitochondries sont très rares. Les quatre métaphases II montrent une répartition des mitochondries tout à fait similaire à celle observées dans les VGp (densité moyenne dans la région corticale et clusters de taille moyenne à grandes travées ailleurs).

Pour les cinq ovocytes du groupe, les nuages mitochondriaux étaient absents et l'appareil de Golgi était présent en faible quantité et peu développé. Le cytoplasme est riche en SER, présent sous forme de vésicules éparses entremêlées aux mitochondries. Sur deux métaphases II, le SER formait en plus de gros rassemblements concentriques.

Les cinq ovocytes du groupe ont des granules corticaux nombreux et dispersés régulièrement le long de la membrane plasmique.

Seule la couche la plus interne de cellules du cumulus est encore présente, plus ou moins complète (un COC intact, trois à moitié dénudés et un totalement dénudé). Les cellules du cumulus encore présentes sont petites, de forme arrondie, avec un noyau rond ou irrégulier. Elles peuvent présenter des signes de dégénérescence ou former des bourgeonnements comme ceux observés sur les métaphases I de notre étude. Les terminaisons transzonales sont très rares et toujours dégénérées. Un fin espace périvitellin est formé tout autour des cinq ovocytes. Sur deux des quatre ovocytes au stade métaphase II, quelques cellules du cumulus sont présentes entre la zone pellucide et la membrane plasmique de l'ovocyte (Figure 33C, D).

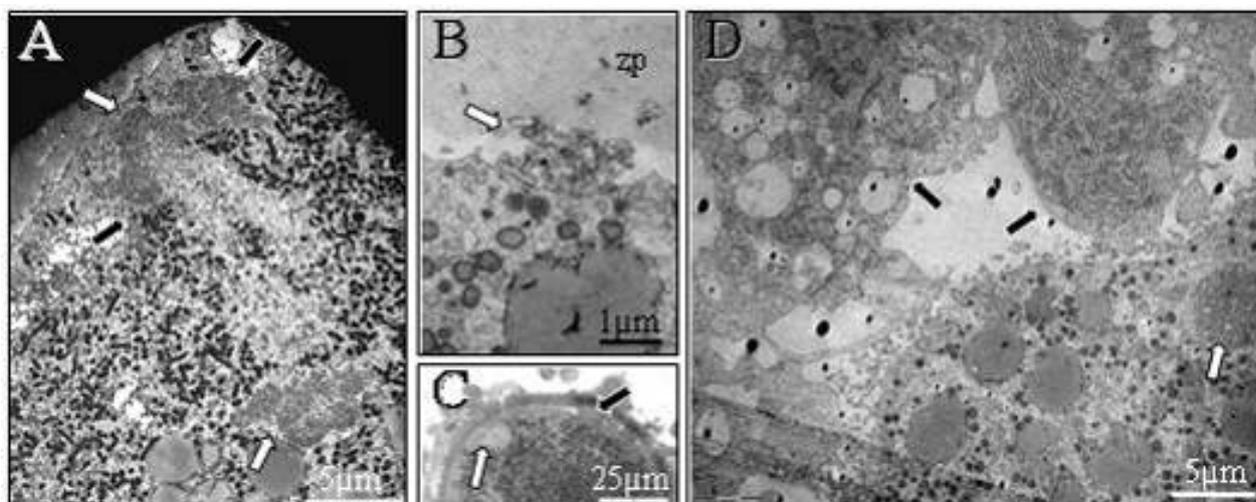


Figure 33 : Ovocyte en métaphase II. **A** : Télaphase I montrant un globule polaire encore rattaché à l'ovocyte par une zone d'étranglement (flèches noires). Deux masses de chromatine condensée sont présentes (flèches blanches). **B** : Terminaison transzonale dégénérée (flèche). **C** : Coupe semi-fine montrant une métaphase II (globule polaire vu sur une autre coupe) et trois cellules du cumulus sous la zone pellucide (confirmé en microscopie électronique). **D** : Cellules du cumulus (flèche noire) sous la zone pellucide contre la membrane plasmique ovocytaire. Un centre organisateur des microtubules est présent (flèche blanche).

### C. Discussion

Quelque soit l'espèce concernée, l'une des grandes questions soulevées par la MIV est la définition et l'évaluation de la qualité de l'ovocyte. La qualité nucléaire est évaluée en routine chez la chienne (taux de métaphase II en fin de culture). Etant donné que nous ne disposons pas d'outils d'évaluation de la qualité cytoplasmique utilisables en routine chez la chienne (les essais de FIV ainsi que les essais de culture embryonnaire ont donné de très mauvais résultats, Luvoni et al., 2006). De plus, cette dernière est généralement négligée. L'étude de l'ultrastructure de l'ovocyte, bien que ne donnant aucune donnée fonctionnelle, permet un approche du degré de maturation, à la fois cytoplasmique et nucléaire, des ovocytes canins dans nos conditions de culture.

La maturation cytoplasmique de l'ovocyte au cours de la MIV a été décrite chez plusieurs espèces mammifères, dont la brebis (Cran et al., 1980), la jument (Grondahl et al., 1995) et la vache (Hyttel et al., 1986b). Différents signes d'immatunité ressortent de ces études dont la pauvreté du cytoplasme en organites, plus spécialement en mitochondries, réticulum endoplasmique et en appareil de Golgi. La distribution asymétrique de ces organites

au profit de la région corticale est aussi systématiquement retrouvée dans toutes ces espèces. Cette localisation corticale préférentielle, ainsi que le rassemblement du Golgi autour des terminaisons transzonales, sont le signe d'une période de couplage entre l'ovocyte et son cumulus. Elle est décrite, tant *in vivo* qu'*in vitro*, et est suivie par une période de découplage puis d'indépendance entre des deux compartiments (brebis, Moor et al., 1980 ; vache, Kruijff et al., 1983) ; jument, Grondahl et al., 1995). Des signes de couplage ovocyte/cumulus sont donc synonymes d'immatunité. Des granules corticaux peu nombreux et qui n'ont pas tous atteint leur localisation sous-membranaire définitive sont aussi un signe d'immatunité. Nous avons donc interprété nos observations en tenant compte de ces critères et de la description de l'ultrastructure de l'ovocyte canin au cours de la maturation *in vivo* précédemment définie (Viaris de Lesegno et al., 2007).

### 1. Qualité des ovocytes avant maturation *in vitro*

Les ovocytes provenant de follicules antraux d'ovaires de chienne en anœstrus constituent une population très hétérogène, à différents stades de maturation ou même en cours d'atresie. Les diamètres ovocytaires varient de 92 à 142  $\mu\text{m}$  (Fujii et al., 2000). La dilacération d'un ovaire canin permet d'obtenir 75 ovocytes par chienne en moyenne après une élimination des ovocytes de mauvaise qualité d'après des critères morphologiques (60% ; Fujii et al., 2000). En étudiant cette population d'ovocytes sélectionnés, nous avons constaté qu'ils représentaient encore une population hétérogène. Deux principaux types d'organisation sont facilement distinguables d'après la position du noyau. Les ovocytes à noyau central présentent des signes d'immatunité importants, tant au niveau nucléaire (nucléole d'aspect transcriptionnellement actif, noyau non encore délocalisé) que cytoplasmique (organites peu nombreux et à localisation asymétrique, granules corticaux en faible quantité et présents aussi en profondeur dans le cytoplasme). Les ovocytes à noyau périphérique ont un profil beaucoup plus mature, tant du point de vue nucléaire (noyau délocalisé en périphérie, nucléole présentant un aspect d'inactivation partielle ou complet) que cytoplasmique (organites assez nombreux, asymétrie de localisation moins marquée, granules corticaux plus nombreux et bien localisés sous la membrane plasmique). D'un point de vue uniquement ultrastructural, la maturation cytoplasmique est corrélée à la localisation du noyau (centrale ou périphérique).

Comparativement aux ovocytes issus de follicules en maturation finale pendant la période péri-ovulatoire, les VGc présentent une organisation similaire à celle des ovocytes récoltés juste avant le pic de LH (pré-LH). Ces VG sont cependant légèrement plus immatures, puisque les VG pré-LH ont une maturation nucléaire un peu plus poussée

(délocalisation du noyau et inactivation nucléolaire plus ou moins avancées, Figure 34). Les VGp sont quant à elles nettement plus avancées dans leur processus de maturation que les ovocytes pré-LH et sont comparables aux ovocytes récoltés après l'ovulation. Nous pouvons, d'après ces comparaisons, émettre l'hypothèse que les follicules renfermant des VGp en anœstrus n'entreront pas en maturation finale menant à l'ovulation, mais qu'ils seraient plutôt voués à l'atrésie. Il est plus probable que les ovocytes qui mèneront à bien leur maturation finale proviennent de la population des VGc. La présence d'une proportion non négligeable de VGp en anœstrus (27%) pourrait être le signe de l'existence de vagues folliculaires durant l'anœstrus de la chienne, comme cela a déjà été décrit chez la brebis et la jument (Evans, 2003). Cette observation conforte donc les résultats obtenus sur l'activité transcriptionnelle des ovocytes au cours de l'anœstrus.

*Figure 34 : Comparaison théorique de l'avancement de la maturation ovocytaire des ovocytes avant culture (VGc et VGp) aux VG maturés in vivo avant le pic de LH (pré LH) et après l'ovulation (post ov).*

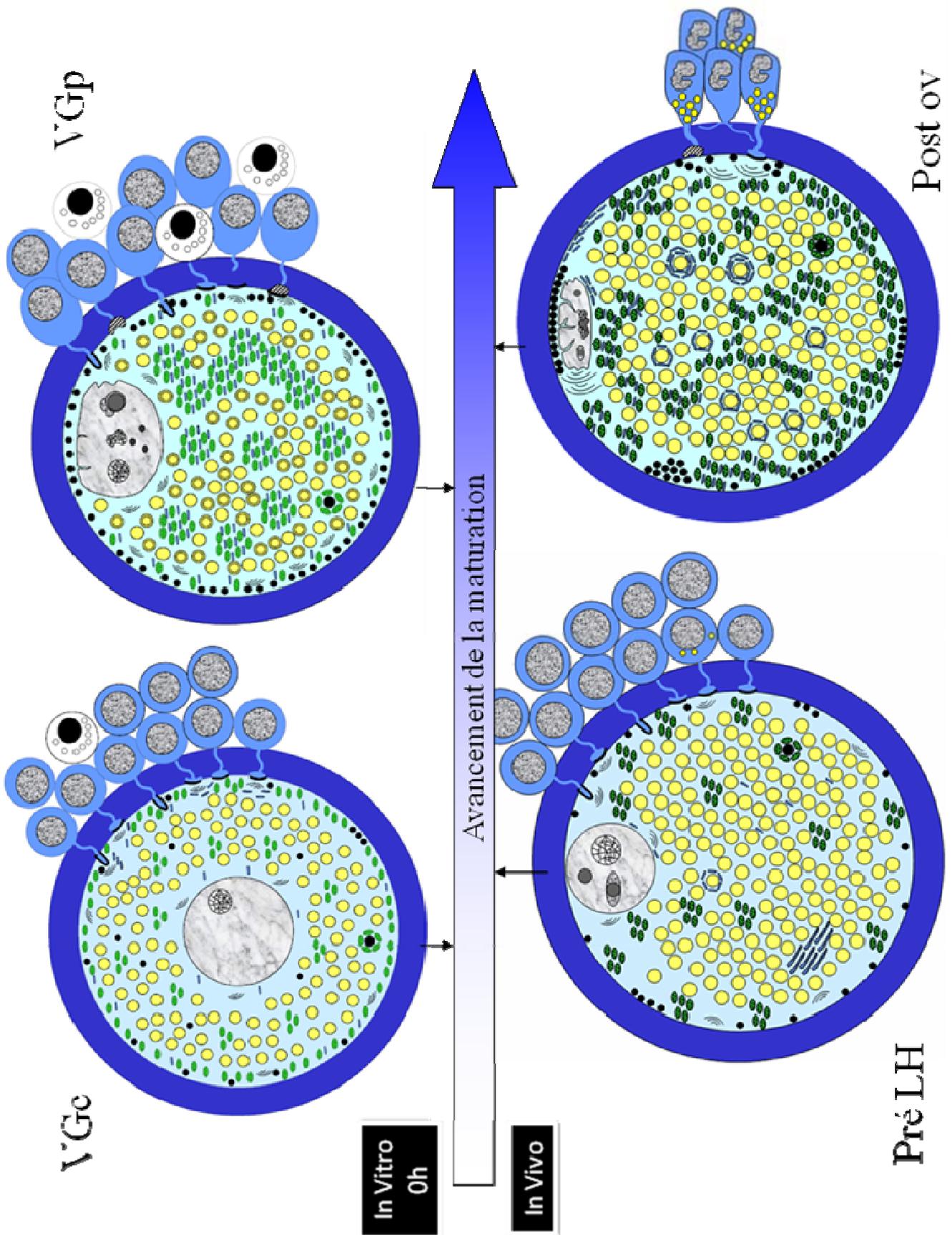


Figure 36

## 2. Devenir des ovocytes pendant la maturation in vitro

Parmi les ovocytes maturés in vitro, les 24% de VG<sub>1</sub> et les 41% de VG<sub>2</sub> ont une maturation moins avancée que celles des VGp (figure 37). Ces 65% de VG<sub>1</sub> et <sub>2</sub> proviennent donc très probablement des 69% de VGc mis en culture. Il semblerait donc qu'une grande majorité des 10% de VG<sub>3</sub>, des 3% de métaphase I et des 3% de métaphase II (soit 16% pour ces 3 groupes rassemblés) proviennent des 26% de VGp mis en culture. Bien que nos pourcentages portent sur une population réduite (39 ovocytes avant culture et 157 après culture), il semble probable que le taux de dégénérescence des VGc soit assez faible et que la majorité des ovocytes ayant dégénéré pendant la culture provienne des VGp. Il serait intéressant pour vérifier ces hypothèses de mettre en culture séparément les ovocytes en fonction de la localisation de leur noyau. Cela serait tout à fait faisable en utilisant un colorant vital de l'ADN tel que le Hoechst, avec une observation sous caméra ultrasensible permettant de diviser par 100 la quantité d'UV reçue par l'ovocyte (modalités utilisées pour vérifier l'énucléation de l'ovocyte receveur dans les opérations de transfert nucléaire).

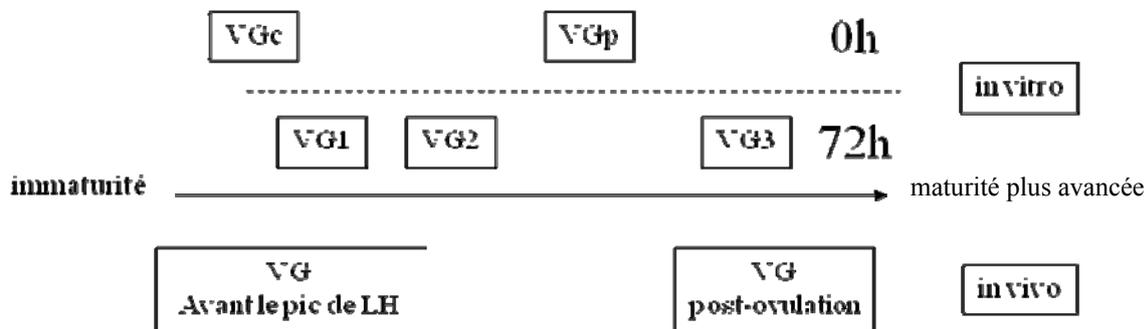


Figure 35 : Comparaison de l'état de maturation des ovocytes au stade vésicule germinale (VG) issus de la maturation in vitro (en haut, 0h ou 72h de culture) et de VG maturés in vivo avant le pic de LH et après l'ovulation (en bas).

Des études menées dans d'autres espèces mammifères ont montré que les ovocytes présentant des nucléoles non entourés de chromatine dense sont moins avancés en maturation et donnent de moins bons résultats en MIV que les ovocytes présentant des nucléoles entourés de chromatine condensée (souris, Bouniol-Baly et al., 1999 ; femme, Combelles et al., 2002 ; Miyara et al., 2003). Les nucléoles non entourés sont encore actifs transcriptionnellement. L'utilisation en MIV de tels ovocytes pourrait donc causer une reprise de méiose, alors que leur réserve de transcrits maternels est encore incomplète et donc insuffisante pour supporter

la maturation ou le développement embryonnaire précoce (Gilchrist et Thompson, 2007). Cette hypothèse pourrait expliquer le probable faible succès des VGc en MIV.

### 3. Evaluation de la maturation des ovocytes en métaphase II

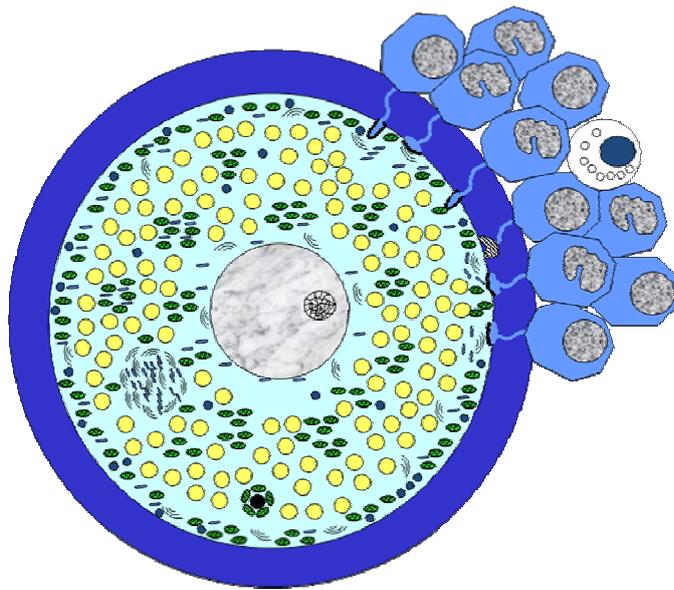
Nos conditions de culture ne permettent qu'un faible degré de maturation cytoplasmique même chez les ovocytes atteignant finalement le stade métaphase II. Comparées aux métaphases II obtenus après maturation in vivo (Viaris de Iesegno et al., 2008), les mitochondries et le réticulum endoplasmique sont moins nombreux et présentent encore une distribution cytoplasmique hétérogène. Qu'elles soient produites in vivo ou in vitro, les métaphases II ont cependant des points communs : absence d'appareil de Golgi et de réticulum endoplasmique granuleux, projections transzonales absentes ou dégénérées et des granules corticaux nombreux régulièrement répartis. Les métaphases II obtenus in vitro présentent donc un retard de maturation cytoplasmique. De plus, la présence de cellules du cumulus sous la zone pellucide dans ces ovocytes a déjà été décrite chez la femme et associée à de l'atrésie folliculaire (Hyttel et al., 1986a). Les ovocytes au stade métaphase II obtenues in vitro ont donc une maturation cytoplasmique anormale, ce qui pourrait être suffisant pour expliquer les anomalies observées en FIV (Luvoni et al., 2006) et en culture embryonnaire in vitro. La quantité et la localisation des granules corticaux ne montrent pas d'anomalie. Les taux élevés de polyspermie observés en FIV (Saint-Dizier et al., 2001) seraient donc probablement davantage imputables à une immaturité moléculaire des granules corticaux, comme cela a été suggéré chez la brebis prépubère (O'Brien, 1996). Il faudrait pour répondre à cette question s'intéresser de plus près à la réaction corticale lors de la fécondation in vitro canine, par exemple en étudiant son ultrastructure.

### 4. Evaluation de la maturation des oocytes n'ayant pas atteint le stade métaphase II en fin de culture

Les trois types de VG après culture montrent une bonne synchronisation des maturations nucléaire et cytoplasmique : la VG<sub>1</sub> a un faible degré de maturation globale, la VG<sub>3</sub> un degré assez élevé et la VG<sub>2</sub> correspond à un stade intermédiaire (Figure 36). Les VG<sub>3</sub> sont proches des VG récoltées in vivo après ovulation. Les ovocytes qui n'ont pas repris leur méiose en culture ne présentent donc pas des organisations erratiques, mais seulement des maturations incomplètes. Si en effet, les VGc ont donné les VG<sub>1</sub> et <sub>2</sub> et si les VGp ont donné les VG<sub>3</sub> et la majorité des ovocytes en métaphase I et II, alors plusieurs stratégies sont

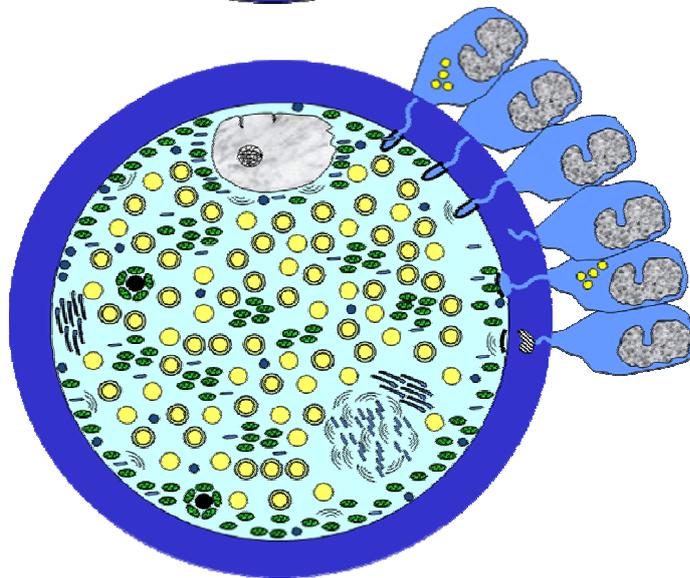
envisageables pour améliorer la MIV canine. Dans un premier temps, l'utilisation uniquement des VGp, ayant subi une « pré-maturation » in vivo par rapport aux VGc serait envisageable. Elles sont cependant minoritaires, cela implique de diminuer de 75% le potentiel des chiennes utilisées. Etudier l'évolution de la population des ovocytes au cours de l'anœstrus pourrait nous indiquer si certaines périodes de l'anœstrus sont plus favorables à la récolte d'ovocytes de qualité pour la MIV. Autrement, une pré-maturation in vitro des ovocytes, par exemple dans du liquide folliculaire pré-ovulatoire, pourrait permettre de resynchroniser la population de départ.

Cette étude permet également d'aborder le rôle des cellules du cumulus. Les trois ovocytes en métaphase I entourés par un cumulus intact montrent une organisation tant cytoplasmique que nucléaire tout à fait similaire à celle des ovocytes en métaphase I maturés in vivo. Les deux autres ovocytes en métaphase I de notre étude, s'étant spontanément totalement ou partiellement dénudés lors de la culture, montrent une maturation cytoplasmique moins avancée et de nombreux gros agrégats de SER répartis régulièrement dans la région corticale. Ce type d'agrégat n'a jamais été observé dans une autre catégorie d'ovocyte, que ce soit in vitro ou in vivo et peut donc être interprété comme une anomalie induite par la maturation in vitro. Nos observations suggèrent donc que l'avancement de la maturation cytoplasmique des ovocytes en métaphase I est corrélé à l'état du cumulus. La présence d'un cumulus intact à la fin de la culture serait donc un facteur important de qualité, intéressant en MIV puisqu'il peut être aisément évalué en microscopie optique sans coloration préalable. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'une étude récente a montré que la dénudation spontanée des ovocytes en culture était associée à une maturation nucléaire plus avancée (Otoi et al., 2007).



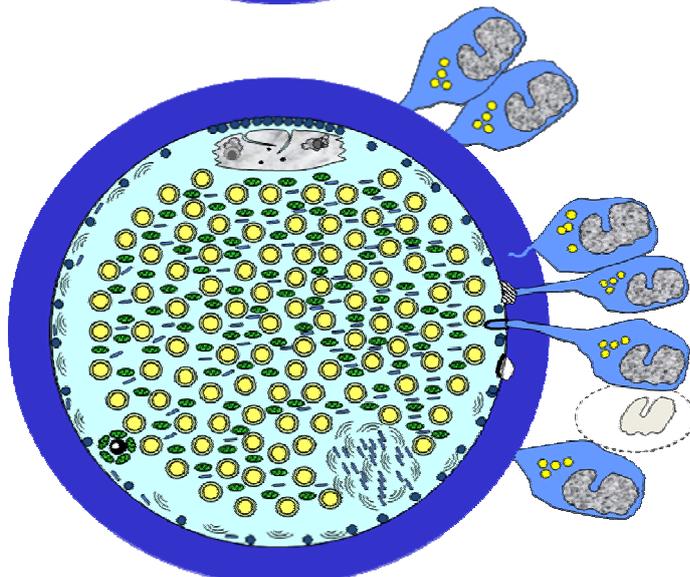
**VG<sub>1</sub>**

Noyau central  
 Nucléole d'aspect  
 transcriptionnellement actif  
 Organites peu nombreux  
 Nombreux signes de couplage  
 ovocyte-cumulus



**VG<sub>2</sub>**

Noyau périphérique  
 Nucléole d'aspect  
 transcriptionnellement actif  
 Organites en quantité moyenne  
 Nombreux signes de couplage  
 ovocyte-cumulus



**VG<sub>3</sub>**

Noyau périphérique  
 Nucléole d'aspect en cours  
 d'inactivation  
 Organites nombreux  
 Absence de signes de couplage  
 ovocyte-cumulus

Figure 36 : Représentation schématique de l'organisation et principales caractéristiques des trois types de vésicules germinales (VG) après culture.

Mais que faut-il penser des ovocytes en métaphase I et à cumulus intact ? De nombreuses études définissent le succès de la MIV canine comme le taux de métaphase I et II obtenu. Les ovocytes en métaphase I ont réussi à reprendre leur méiose mais pas à la terminer. Et comme l'augmentation du temps de culture au-delà de 72h n'augmente pas les taux de métaphase II (Otoi et al., 2004), il semble donc que ces ovocytes soient bel et bien bloqués en métaphase I à cause d'une incapacité à dépasser ce stade et non pas à un manque de temps. Chez la souris, le blocage en métaphase I d'ovocytes partiellement compétents est attribué à une dégradation insuffisante de la cycline B entraînant le maintien de l'activité MPF (Meiosis Promoting Factor) et par conséquent l'inhibition du passage en métaphase II (Eppig, 1996). L'activité MPF canine a été mesurée sur des ovocytes en fonction du stade nucléaire atteint après culture (Saint-Dizier et al., 2004). Elle suit le modèle mammifère général : activité faible en VG et élevée en métaphase I et II. Puisque les ovocytes bloqués au stade métaphase I ont une activité MPF élevée, il est donc envisageable que la maturation in vitro entraîne des anomalies de régulation de l'activité MPF. Des études plus poussées des protéines phosphatases qui régulent cette dernière permettraient de vérifier cette hypothèse.

Sur l'ensemble des ovocytes en fin de culture, nos observations indiquent que d'une part les ovocytes ayant complété leur méiose l'ont fait trop précocement et que d'autre part ceux qui n'ont pas repris leur méiose ont suivi un cheminement correct mais qu'ils n'ont pas réussi avec les conditions que nous leur avons fournies à le mener à terme. Les conditions de culture utilisées actuellement à travers le monde toutes espèces confondues visent à recréer les conditions intrafolliculaires de la maturation in vivo. Chez la chienne, toutes les conditions testées s'en inspirent plus ou moins, et même celles s'en rapprochant le plus comme l'addition de sérum de chienne en chaleurs, se sont avérées être inadaptées (Hewitt et al., 1998 ; Luvoni et al., 2000). Cela n'est en fait pas étonnant si l'on considère qu'in vivo, la maturation ovocytaire finale se déroule en deux étapes, l'une folliculaire et l'autre oviductale. L'environnement oviductal canin est inconnu et nous ignorons donc s'il diffère beaucoup de celui du follicule. Tout semble donc indiquer l'importance d'adapter nos conditions de culture pour se rapprocher de la physiologie de la reproduction de la chienne, ce qui devra donc notamment passer par l'utilisation de milieux de culture séquentiels. Une meilleure compréhension de la maturation in vivo semble donc être prioritaire.

D'autre part, l'ensemble de nos résultats suggère que la simple détermination du taux de métaphase II n'est pas du tout adaptée à la MIV canine actuelle. La détermination du stade nucléaire est nécessaire mais insuffisante pour évaluer des conditions de culture. Il est capital d'évaluer en parallèle la maturation cytoplasmique des ovocytes, soit par des tests

fonctionnels comme la FIV, soit par une évaluation de critères tels que la présence d'un cumulus complet ou la quantification et la localisation des mitochondries. Des études ultérieures seraient nécessaires pour valider l'intérêt d'une double coloration fluorescente et d'une observation en microscopie confocale ou à illumination structurée de l'ADN (localisation du noyau, présence de nucléole entouré, plaque métaphasique et globule polaire) et des mitochondries (quantification et répartition) comme indicateur de qualité globale de la maturation in vitro.

## V. Bilan général et perspectives

Les travaux expérimentaux réalisés dans cette thèse ont permis de mieux connaître la maturation ovocytaire canine *in vivo*. Nous avons ainsi pu non seulement générer des connaissances fondamentales sur la maturation *in vivo* chez cette espèce si particulière, mais aussi fournir un standard ultrastructural chronologique que nous avons pu confronter à la maturation *in vitro*. Si nous avons pu répondre à certaines questions, nos résultats en soulèvent de nombreuses autres et ouvrent autant de perspectives.

L'étude ultrastructurale des ovocytes issus de chiennes en anœstrus a permis de mettre en évidence une hétérogénéité de la population avant culture. Cette dernière présente une majorité d'ovocytes très immatures (VGc), à côté desquels quelques ovocytes (VGp) ont déjà subi une maturation plus ou moins poussée. Cette hétérogénéité soulève plusieurs questions. Tout d'abord, l'existence d'ovocytes plus avancés dans la maturation suggère l'existence d'une croissance folliculaire en anœstrus. Cette croissance pourrait même correspondre à des vagues folliculaires successives, comme celles observées pendant l'anœstrus de la jument et de la brebis (Evans, 2003). En effet, les vésicules germinales issues de follicule en croissance terminale avant le pic de LH sont plus immatures que certains ovocytes d'anoestrus. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse afin de mieux comprendre la folliculogenèse précoce canine. La mise en évidence de vagues folliculaires sera plus difficile à réaliser que chez la jument et la brebis. Une étude dynamique de la croissance folliculaire par échographie est impossible. En effet, dans l'ovaire de chienne en anœstrus, le diamètre folliculaire maximal est inférieur à 1 mm et les follicles ne peuvent donc pas être visualisés par échographie. Une étude histologique après ovariectomie serait envisageable mais serait sans doute difficile à interpréter et demanderait un grand nombre de chiennes. En effet, vu l'importance de la durée de l'anœstrus et sa grande variabilité entre chiennes, si des vagues folliculaires existaient en effet, elles ne suivraient probablement pas une cinétique précise. Chez la vache, la croissance folliculaire a été suivie par injection *in vivo* de charbon dans un follicule donné afin de le repérer et de pouvoir déterminer s'il a augmenté de diamètre lors d'une observation ultérieure (Cook et al., 1990). L'application d'un tel protocole chez la chienne semble illusoire encore une fois pour des questions de diamètre folliculaire pendant l'anœstrus. Une démonstration directe de l'existence de vagues folliculaires semblant difficile, l'étude cinétique de l'endocrinologie de l'anœstrus serait sans doute plus prometteuse. Le dosage des œstrogènes

circulants au cours de l'ensemble de la période d'anœstrus pourrait sans doute donner des éléments de réponse à cette problématique et sera réalisé prochainement par notre équipe.

L'hétérogénéité de la population d'ovocytes pendant l'anœstrus soulève une autre question, sur la stratégie à utiliser en maturation in vitro. En confrontant les descriptions ultrastructurales de la maturation in vivo et in vitro, nous avons pu émettre l'hypothèse que la culture de VGc donnerait principalement des stades de maturation incomplète alors que celle des VGp donnerait des ovocytes à stade nucléaire avancé mais erratique (mauvaise qualité cytoplasmique des métaphases II et méiose incomplète chez les métaphase I). Cette hypothèse devra être confirmée par la mise en culture séparée des deux populations ovocytaires en anœstrus. Face à l'insuccès actuel de la maturation in vitro canine, une telle étude pourrait permettre d'évaluer les parts de responsabilités respectives de l'inadaptation des conditions de culture et de la qualité de l'ovocyte avant culture.

Si les conditions actuelles de culture semblent en effet être mises en cause, leur amélioration passera par une caractérisation précise des milieux de maturation in vivo, à savoir le liquide folliculaire et le liquide oviductal. Cette caractérisation passera entre autre par des dosages de stéroïdes, de facteurs de croissance et de protéines. Le travail demandé par une telle étude est très lourd à cause de la difficulté de récolte du matériel biologique. De plus, le volume de liquide oviductal est très faible et sa récolte est difficile. Des essais de culture d'oviducte in vitro pourront être tentés afin d'identifier les molécules sécrétées par les cellules oviductales. La connaissance de la composition exacte des liquides folliculaire et oviductal permettra d'adapter les milieux de maturation in vitro pour se rapprocher des conditions in vivo. Si les environnements folliculaire et oviductal s'avèrent être très différents, la réalisation de milieux séquentiels sera alors indispensable. L'ovocyte en culture sera donc soumis à des conditions variables au cours du temps.

La caractérisation exacte des compositions de ces milieux de culture in vivo est quasi impossible, et on ne pourra donc qu'essayer de s'en rapprocher le plus possible. Pour prédire l'intérêt de tels milieux de culture in vitro, des essais de culture dans du liquide folliculaire et/ou oviductal pourront être réalisés. Les taux de maturation obtenus seront le maximum que nous pouvons espérer grâce à cette stratégie. La culture ex vivo pourrait aussi être intéressante à essayer, après mise au point de la culture d'oviducte in vitro. Il serait possible d'utiliser en parallèle des oviductes prélevés sur des chiennes en chaleurs et à différents moment du cycle dont la période préovulatoire et la période post-ovulatoire avant période de réactivation transcriptionnelle (24-48h post ovulation). La culture in vitro d'oviducte canin est prometteuse (de 12,5 à 32% de stade métaphase I et II) et a été tentée mais elle n'a pas permis

de dépasser 48 heures de culture (Luvoni et al., 2003), ce qui est probablement trop court. Pour passer outre cette difficulté, ces cultures d'ovocytes pourraient être réalisées dans un follicule ou dans un oviducte laissés en place dans la chienne. L'injection intrafolliculaire d'ovocytes immatures, ou GRAFT (Gamete Recovery And Follicular Transfer) a déjà été réalisée avec succès chez le porc (Flemming et al., 1985), la vache (Bergfelt et al., 1998) et la jument (Goudet et al., 1997). La truie et la jument présentent eux aussi une maturation in vitro peu efficace comparée à celle des ruminants (mais meilleure que celle de la chienne). Chez la jument, cette technique offre les mêmes taux de maturation que l'in vitro, suggérant ainsi que dans cette espèce, la qualité de l'ovocyte avant culture est plus à remettre en cause que la qualité du milieu de culture. Une telle technique pourrait être tentée chez la chienne. Il faudra confirmer la faisabilité de cette technique chez la chienne et valider le passage des ovocytes injectés dans l'oviducte lors de l'ovulation. De même, l'injection d'ovocytes immatures dans l'oviducte ou GIFT (Gamete IntraFallopian Transfer) a déjà été réalisée et permet chez la vache d'obtenir des meilleurs taux d'implantation embryonnaire (Wetscher et al., 2005). Une prématuration réalisée in vitro devra sans doute être réalisée pour compenser la phase de maturation intrafolliculaire terminale qui est alors shuntée. La technique de GIFT peut aussi être tentée avec des ovocytes transférés dans l'oviducte d'une autre espèce. Dans notre cas, nous pourrions envisager de transférer des ovocytes immatures canins dans des oviductes de brebis. Ceci permettrait d'évaluer la spécificité de l'environnement oviductal canin.

Notre étude de l'ultrastructure de l'ovocyte en fin de maturation a soulevé un autre problème, celui de l'évaluation de la qualité de la maturation cytoplasmique. En effet, le taux de métaphase II, utilisé très largement pour évaluer les conditions de culture, est un mauvais indicateur puisqu'il est associé à une maturation cytoplasmique de mauvaise qualité. Bien que la microscopie électronique apporte de nombreuses informations, il n'est pas envisageable de l'utiliser en routine sur un nombre significatif d'ovocytes. L'indicateur optimal de qualité de maturation cytoplasmique correspond au taux de fécondation in vitro (FIV) et de développement embryonnaire précoce, au moins jusqu'à l'activation du génome zygotique (stade 8-cellules chez la chienne ; Bysted et Greve, 2000). Or, la fécondation in vitro donne de très mauvais résultats chez la chienne. Cet échec peut s'expliquer soit par des conditions de FIV inadaptées à l'ovocyte canin, soit par la mauvaise qualité de la maturation qui ne permettrait pas à l'ovocyte de réaliser une fécondation normale, soit une combinaison des deux. Etant donné que les ovocytes en fin de culture ont une maturation soit incomplète (VG et métaphase I) soit anormale (métaphase II), l'échec de la FIV n'est guère étonnant. En ce qui concerne l'adaptation des protocoles de FIV chez la chienne, nous ne pouvons pas

conclure pour l'instant. En considérant que la fécondation *in vivo* chez la chienne ne montre pas de différence majeure en comparaison des autres mammifères, les conditions usuelles de FIV pourraient donc convenir à la chienne. Pour confirmer cette hypothèse, deux possibilités s'offrent à nous. D'une part, l'étude de la fécondation *in vitro* d'ovocytes en métaphase II récoltés *in vivo* apporterait des éléments de réponses. La fécondation *in vitro* d'ovocytes issus de follicules préovulatoires après culture (MIV) n'a pas permis d'améliorer les taux de FIV (Yamada et al., 1992), mais cette étude ne s'affranchit pas des anomalies induites par la culture sur les ovocytes.

D'autre part, la polyspermie étant un problème majeur lors de la FIV, l'utilisation de l'Injection IntraCytoplasmique de Spermatozoïdes (ICSI) permettrait de s'affranchir des défauts de blocage de la polyspermie pour évaluer les autres étapes de la fécondation. Une seule étude utilisant l'ICSI est disponible chez la chienne (Fulton et al., 1998) mais elle n'a porté que sur 38 ovocytes et s'est limitée à l'observation des stades 2 pronoyaux. Un protocole de fécondation par ICSI de plus grande ampleur serait donc intéressant à mener.

Un dernier axe de recherche suggéré par les résultats de notre étude concerne le cumulus. La chienne représente encore une fois une exception parmi les mammifères puisque les cellules du cumulus restent solidement attachées à l'ovocyte lors de la maturation *in vivo*, et ce aussi au cours du développement embryonnaire précoce. Or nous avons constaté qu'en ce qui concerne l'ultrastructure, la communication directe entre l'ovocyte et son cumulus, via les projections transzonales diminue progressivement lors de la maturation *in vivo*. La question du rôle exact des cellules du cumulus dans la maturation ovocytaire se pose donc. Si la dénudation spontanée des ovocytes en fin de culture a été rapportée être associée à des taux de reprise de méiose supérieurs (Otoi et al., 2007 ; Chebrou, données non publiées), notre étude montre que cette dénudation est associée à des anomalies de maturation cytoplasmique. Le cumulus joue donc très certainement un rôle important dans la maturation ovocytaire. Or, la communication intercellulaire par les jonctions est loin d'être la seule à exister. De nombreux autres mécanismes existent (pinocytose, puits à clathrine, transduction du signal par des récepteurs membranaires, ...) et des facteurs sécrétés par le cumulus dans l'espace périvitellin pourraient ainsi agir sur l'ovocyte. L'espace périvitellin constitue en effet une zone d'échange de petit volume, favorable à la concentration de molécules. Reste à déterminer si l'intervention des cellules du cumulus correspond à un signal activateur ou à la levée d'un signal inhibiteur. Au regard de l'intensité de la transcription que nous avons constatée par incorporation de BrUTP dans les cellules du cumulus au cours de la maturation *in vivo*, l'étude du transcriptome et du protéome du cumulus prend tout son sens et pourrait

fournir des candidats de régulation de la maturation ovocytaire et de la reprise de la méiose. Les produits de la réactivation transcriptionnelle post ovulation, intervenant quelques heures avant la reprise de la méiose sont aussi de bons candidats de régulation de la méiose. La technique qui permettra d'explorer ces deux pistes devra nécessairement pouvoir être mise en œuvre sur un nombre restreint d'ovocytes, de l'ordre de quelques dizaines.

## VI. Références bibliographiques

- Amor M, Ramon M, Durfort M. 2004. Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* (Gastropoda :Muricidae). *Sci. Mar.* 68:343-353.
- Andersen A, Simpson M. 1973. *The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*. Eds Geron-X, Inc., Los Altos, California, U.S.A., 1973.
- Aoki F, Hara K, Schultz, R. 2003. Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Mol.Reprod.Dev.* 64(3):270-274.
- Aoki F, Worrad D, Schultz, R. 1997. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev.Biol.* 181(2):296-307.
- Archbald L, Baker B, Clooney L, Godke R. 1990. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim. Clin.* 75:228-238.
- Assey R, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 37:335-344.
- Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrouer T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. 2006. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Hum.Reprod.* 21(7):1705-1719.
- Bergfelt D, Brogliatti G, Adams G. 1998. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology* 50(1): 15-25.
- Betteridge J. 1995. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 44:1061-1098.
- Bjerregaard B, Wrenzycki C, Philimonenko V, Hozak P, Laurincik J, Niemann H, Motlik J, Maddox-Hyttel P. 2004. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phases of porcine oocyte growth. *Biol Reprod* 70:925-935.
- Bloom A, Mukherjee B. 1972. RNA synthesis in maturing mouse oocytes. *Exp.Cell Res.* 74(2):577-582.
- Bogliolo L, Zedda M, Ledda S, Leoni G, Naitana S, Pau S. 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Nutr.Dev* 42(3):265-273.
- Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szollosi M, and Debey P. 1999. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol.Reprod.* 60(3):580-587.
- Boyd J, Renton J, Harvey M, Nickson D, Eckersall P, Ferguson J. 1993. Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 47:101-105.
- Bysted B, Greve T. 2000. Activation of the embryonic genome in the dog. *Theriogenology* 53:269.
- Bysted B. 2001. *Perioovulatory events and early embryonic development in the dog*. PhD Thesis, Royal Veterinary Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Cho E, Lockett S. 2006. Calibration and standardization of the emission light path of confocal microscopes. *J.Microsc.* 223:15-25.

- Clérot J. 1979. Les Groupements Mitochondriaux des Cellules Germinales des Poissons Téléostéens Cyprinidés. *Exp. Cell. Res.* 120:237-244.
- Concannon P, Hansel W, McEntee K. 1977. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol. Reprod.* 17:604-613.
- Concannon P, Tsutsui T, Shille V. 2001. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57:169-179.
- Concannon P, Hansel W, McEntee K. 1977 Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol. Reprod.* 17:604-613.
- Concannon P, McCann J, Temple M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39:3-25.
- Cook D, Smith C, Parfet J, Youngquist R, Brown E, Garverick H. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cyst in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 90:37-46.
- Cran D, Moor R, Hay M. 1980. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J. Reprod. Fertil.* 59(1):125-132.
- Cui X, Li X, Yin X, Kong I, Kang J, Kim N. 2007. Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 53(2):405-418.
- de Gier J, Kooistra S, Djajadiningrat-Laanen S, Dieleman S, Okkens A. 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* 65:1346-1359.
- Doak R, Hall A, Dale H. 1967. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J. Reprod. Fertil.* 13(1):51-58.
- Driancourt M-A, Gougeon A, Monniaux D, Royère D, Thibault C. 2001. Folliculogenèse et ovulation. In *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. Ed Ch Thibault, M.C. Levasseur, pp 316-347. Ellipses editions marketing, Paris.
- England G, Yeager A. 1993. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47:107-117.
- England G, Verstegen J, Hewitt D. 2001. Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. *Vet. Rec.* 148(1):20-22.
- Eppig J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8(4):485-489.
- Evans H, Cole H. 1931. An introduction to the study of the oestrous cycle in the dog. *Mem. Univ. of Calif. University of California press, Berkeley, California, USA*,
- Evans, A. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Domest. Anim* 38(4):240-246.
- Fair T, Carter F, Park S, Evans A, Lonergan P. 2007. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. *Theriogenology* 68 Suppl 1:S91-S97.
- Farstad W, Mondain-Monval M, Hyttel P, Smith A, Markeng D. 1989. Perioovulatory endocrinology and oocyte maturation in unmated mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). *Acta Vet. Scand.* 30:313-319.

- Farstad W, Hyttel P, Grondahl C, Mondain-Monval, M, and Smith, AJ. 1993. Fertilization and early embryonic development in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Mol.Reprod.Dev.* 36(3):331-337.
- Fleming A, Kuehl T, Armstrong D. 1985. Maturation of pig and rat oocytes transplanted into surrogate pig follicles in vitro. *Gamete Res.* 11:107-119.
- Fleming W, Saacke R. 1972. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. *J Reprod Fertil* 29:203-213.
- Fontbonne A, Rault D, Malandain E, Boschiero S, Truelle N, Dumasy M, et al. 2004. Ovulation diagnosis attempt using ovarian ultrasonography. In :Proceedings of the Fourth EVSSAR congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction; 2004. p. 153–5.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T. 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J.Vet.Med.Sci.* 62(3):305-307.
- Fulton R, Keskinetepe L, Durrant B et al. 1998. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for the treatment of canine infertility. *Theriogenology* 48:366.
- Gibbons J, Beal W, Krisher R, Faber E, Pearson R, and Gwazdauskas F. 1994. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42(3):405-419.
- Gier H. 1950. Early embryology of the dog. *Anat. Rec.* 108:561-562.
- Gilchrist R et Thompson JG. 2007. Oocyte maturation :emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67(1):6-15.
- Gjorret J, Crichton EG, Loskutoff NM, Armstrong DL, Hyttel P. 2002. Ultrastructure of oocyte maturation, fertilization, and early embryo development in vitro in the Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Mol. Reprod. Dev.* 63:79-88.
- Goudet G, Bézard J, Duchamp G, Palmer E. 1997. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to in vitro maturation in the mare? *Equine Vet J Suppl.* 1997 Dec;(25):54-9.
- Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates :facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17(2):121-55
- Griffiths W.F.B., Amoroso E.G. 1939. Proestrus, estrus, ovulation and mating in the greyhound bitches. *Vet. Rec.* 51:1279-1284
- Grondahl C, Hyttel P, Grondahl ML, Eriksen T, Gottfredsen P, Greve T. 1995. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 42:94-105.
- Guerin C, Maurel MC, Launais M, Deletang F, Badinand F. 1997 Use of an immunoenzymatic assay to detect the luteinizing hormone peak in bitches. *J Reprod Fertil Suppl.*; 51:277-281.
- Guraya SS. 1965 A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. *J. Exp. Zool.* 160 :123-136.
- Haenisch-Woehl A, Kolle S, Neumuller C, Sinowatz F, Braun J. 2003. Morphology of canine cumulus-oocyte complexes in pre-pubertal bitches. *Anat. Histol. Embryol.* 32:373-377.
- Hase, M, Hori, T, Kawakami, E, and Tsutsui, T. 2000. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J.Vet.Med.Sci.* 62(3):243-248.

- Hatoya, S, Torii, R, Kondo, Y, Okuno, T, Kobayashi, K, Wijewardana, V, Kawate, N, Tamada, H, Sawada, T, Kumagai, D, Sugiura, K, and Inaba, T. 2006. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol.Reprod.Dev.* 73(3):298-305.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Goodrowe KL. 1994. Influence of spermatozoa on in vitro nuclear maturation of canine ova. *Biol. Reprod. Suppl.* 50:145.
- Hayer, P, Gunzel-Apel, AR, Luerssen, D, and Hoppen, HO. 1993. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 47:93-100.
- 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 and England, GC. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod.Sci.* 55(1):63-75.
- Hewitt, DA, Watson, PF, and England, GC. 1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 49(6):1083-1101.
- Holst PA, Phemister RD. 1971. The prenatal development of the dog :preimplantation events. *Biol. Reprod.* 5:194-206.
- Holst, PA and Phemister, RD. 1971. The prenatal development of the dog:preimplantation events. *Biol.Reprod.* 5(2):194-206.
- Hossein, MS, Kim, MK, Jang, G, Fibrianto, HY, Oh, HJ, Kim, HJ, Kang, SK, and Lee, BC. 2007. Influence of season and parity on the recovery of in vivo canine oocytes by flushing fallopian tubes. *Anim Reprod.Sci.* 99(3-4):330-341.
- Hozak, P, Cook, PR, Schofer, C, Mosgoller, W, and Wachtler, F. (1994). Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J.Cell Sci.* 107:639-648.
- Hunter, AG, Moor, RM. 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J.Dairy Sci.* 70(8):1646-1651.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T. 1986b. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.* 76:645-656.
- Hyttel P, Farstad W, Mondain-Monval M, Bakke LK, Smith AJ. 1990. Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Anat. Embryol. (Berl)* 181:325-331.
- Hyttel P, Madsen I. 1987. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. *Acta Anat. (Basel)* 129:12-14.
- Hyttel P, Westergaard L, Byskov AG. 1986a. Ultrastructure of human cumulus-oocyte complexes from healthy and atretic follicles. *Hum. Reprod.* 1(3):153-157.
- Hyttel, P, Farstad, W, Mondain-Monval, M, Bakke, LK, and Smith, AJ. 1990. Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Anat.Embryol.(Berl)* 181(4):325-331.
- Ishijima, T, Kobayashi, Y, Lee, DS, Ueta, YY, Matsui, M, Lee, JY, Suwa, Y, Miyahara, K, and Suzuki, H. 2006. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J.Reprod.Dev.* 52(2):293-299.
- Jackson, DA, Hassan, AB, Errington, RJ, and Cook, PR. 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* 12(3):1059-1065.

- Jaffré N. Expression des récepteurs aux gonadotropines (FSH et LH) et des enzymes de la stéroïdogénèse au cours de la maturation folliculaire chez la chienne. 2006. Mémoire de Master 2, Spécialité Reproduction et Développement, Université Denis Diderot Paris 7.
- Jang, G, Kim, MK, Oh, HJ, Hossein, MS, Fibrianto, YH, Hong, SG, Park, JE, Kim, JJ, Kim, HJ, Kang, SK, Kim, DY, and Lee, BC. 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 67(5):941-947.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PN. 2001. Canine and feline theriogenology. Eds WB Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Kastrop, PM, Hulshof, SC, Bevers, mm, Destree, OH, and Kruip, TA. 1991. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. *Mol.Reprod.Dev.* 28(3):249-254.
- Kim, MK, Hossein, MS, Oh, HJ, Fibrianto, HY, Jang, G, Kim, HJ, Hong, SG, Park, JE, Kang, SK, and Lee, BC. 2007. Glutathione content of in vivo and in vitro matured canine oocytes collected from different reproductive stages. *J.Vet.Med.Sci.* 69(6):627-632.
- Kim, MK, Jang, G, Oh, HJ, Yuda, F, Kim, HJ, Hwang, WS, Hossein, MS, Kim, JJ, Shin, NS, Kang, SK, and Lee, BC. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9(1):130-137.
- Kocabas, AM, Crosby, J, Ross, PJ, Otu, HH, Beyhan, Z, Can, H, Tam, WL, Rosa, GJ, Halgren, RG, Lim, B, Fernandez, E, and Cibelli, JB. 2006. The transcriptome of human oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103(38):14027-14032.
- Kruip T, Cran D, van Beneden T, Dieleman S. 1983. Structural Changes in Bovine Oocytes During Final Maturation In Vivo. *Gamete Res.* 8:29-47.
- Kutzler, MA. 2005. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64(3):766-775.
- Laurincik, J, Thomsen, PD, Hay-Schmidt, A, Avery, B, Greve, T, Ochs, RL, and Hyttel, P. 2000. Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biol.Reprod.* 62(4):1024-1032.
- Lee, BC, Kim, MK, Jang, G, Oh, HJ, Yuda, F, Kim, HJ, Hossein, MS, Kim, JJ, Kang, SK, Schatten, G, and Hwang, WS. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436(7051):641.
- Lee, HS, Yin, XJ, Jin, YX, Kim, NH, Cho, SG, Bae, IH, and Kong, IK. 2006. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. *Anim Reprod.Sci.*
- Lemon M, Pelletier J, Saumande J, Signoret JP. 1975. Peripheral plasma concentrations of progesterone, oestradiol-17beta and luteinizing hormone around oestrus in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 42:137-140.
- Lopez G, Sousa M, Oliveira E, Luvoni GC, Rocha A. 2006. Ultrastructural characterization of Canine Diestrous Grade 1 Cumulus-Oocyte Complexes. Proceedings of the 5th Biannual Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR). 7-9 april 2006, Budapest, Hungary. p306.
- Luvoni, GC, Chigioni, S, Allievi, E, and Macis, D. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod.Domest.Anim* 38(5):410-414.

- Luvoni, GC, Chigioni, S, Allievi, E, and Macis, D. 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63(1):41-59.
- Luvoni, GC, Chigioni, S, and Beccaglia, M. 2006. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reprod Domest. Anim* 41(4):286-290.
- Luvoni, GC, Luciano, AM, Modina, S, and Gandolfi, F. 2001. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 57:141-146.
- Luvoni, GC. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod Nutr. Dev* 40(5):505-512.
- Mahi, CA and Yanagimachi, R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 196(2):189-196.
- Marseloo N, Fontbonne A, Bassu G., Rivière 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. *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. 4-6 august 2004, Sao Paulo, Brazil. pp 75-77.
- Marseloo N. 2005. Micro-environnement ovocytaire au cours de la maturation terminale chez la chienne : analyse du liquide folliculaire et des caractéristiques fonctionnelles du follicule. Mémoire de Master 2, Spécialité Reproduction et Développement, Université Denis Diderot Paris 7.
- Marseloo, N., Fontbonne, A., Bassu, G., Rivière, 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 *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Sao Paulo, Brésil. 4-6 août 2004, 75-77.
- McDougall, K, Hay, MA, Goodrowe, KL, Gartley, CJ, and King, WA. 1997. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 51:25-31.
- McNeil, J., Constandy, E. 2006. Addressing the problem of pet overpopulation : the experience of New Hanover County Animal Control Services. *J. Public. Health Manag. Pract.* 12 :452-455.
- Metcalf S. 1999. Assisted reproduction in the bitch. MSc Thesis, University of Monash, Australia.
- Metcalf, SS, Shaw, JM, and Gunn, IM. 2001. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 57:323-329.
- Misirlioglu, M, Page, GP, Sagirkaya, H, Kaya, A, Parrish, JJ, First, NL, and Memili, E. 2006. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103(50):18905-18910.
- Miyano, T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *J. Reprod. Dev.* 51 :169-176.
- Miyara, F, Migne, C, Dumont-Hassan, M, Le Meur, A, Cohen-Bacrie, P, Aubriot, FX, Glissant, A, Nathan, C, Douard, S, Stanovici, A, and Debey, P. 2003. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 64(4):458-470.

- Mizushima, S and Fukui, Y. 2001. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology* 55(7):1431-1445.
- Moor RM, Smith MW, Dawson RM. 1980. Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp. Cell. Res.* 126:15-29.
- Moore, GP, Lintern-Moore, S, Peters, H, and Faber, M. 1974. RNA synthesis in the mouse oocyte. *J.Cell Biol.* 60(2):416-422.
- Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. 2000. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum. Reprod.* 15 Suppl 2:129-147.
- Murakami, M, Otoi, T, Wongsrikeao, P, Agung, B, Sambuu, R, and Suzuki, T. 2005. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. *Cloning Stem Cells* 7(2):77-81.
- Nothling, JO, De Cramer, KG, Gerber, D, and Kammer, VR. 2006. Luteal and follicular count in bitches:assessment by means of magnetic resonance imaging. *Theriogenology* 66(5):1343-1354.
- O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G. 1996. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 8(7):1029-1037.
- Okkens, AC and Kooistra, HS. 2006. Anoestrus in the dog:a fascinating story. *Reprod.Domest.Anim* 41(4):291-296.
- Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME. 2007. Role of cumulus cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod.Domest.Anim* 42(2):184-189.
- Otoi, T, Fujii, M, Tanaka, M, Ooka, A, and Suzuki, T. 2000. Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54(4):535-542.
- Otoi, T, Ooka, A, Murakami, M, Karja, NW, and Suzuki, T. 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod.Fertil.Dev.* 13(2-3):151-155.
- Otoi, T, Shin, T, Kraemer, DC, and Westhusin, ME. 2004. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reprod Nutr.Dev* 44(6):631-637.
- Otoi, T, Shin, T, Kraemer, DC, and Westhusin, ME. 2007. Role of cumulus cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Domest.Anim* 42(2):184-189.
- Otoi, T, Willingham, L, Shin, T, Kraemer, DC, and Westhusin, M. 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124(6):775-781.
- Parker, HG, Kruglyak, L, and Ostrander, EA. 2006. Molecular genetics:DNA analysis of a putative dog clone. *Nature* 440(7081):E1-E2.
- Pearson OP, Enders RK. 1943. Ovulation, maturation and fertilization in the fox. *Anatomical Record* 85:69-83.
- Phemister RD, Holst PA, Spano JS, Hopwood ML. 1973. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* 8:74-82.
- Phemister, RD, Holst, PA, Spano, JS, and Hopwood, ML. 1973. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol.Reprod.* 8(1):74-82.

- Pieterse, MC, Kappen, KA, Kruip, TA, and Taverne, MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30(4):751-762.
- Pombo, A and Cook, PR. 1996. The localization of sites containing nascent RNA and splicing factors. *Exp.Cell Res.* 229(2):201-203.
- Purswell, B.J. & Kolster, K.A. 2006. Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology.* 66 :510-513.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007.
- Renard, J.P. et Chavatte-Palmer, P. 2004. Le clonage de l'animal et son apport en recherche vétérinaire. *Bull Acad Vét France.* 157 :5-15.
- Renton, JP, Boyd, JS, Eckersall, PD, Ferguson, JM, Harvey, MJ, Mullaney, J, and Perry, B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J.Reprod.Fertil.* 93(1):221-231.
- Reynaud K, Chebrou M, Tanguy-Dezaux C, Viaris de Lesegno C, and Chastant-Maillard S. 2006b. Roles of cAMP and cumulus cells during *in vitro* meiotic resumption of canine oocyte. Proceedings of the 5th Biannual Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR).7-9 april 2006, Budapest, Hungary. p286.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard S. 2005. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130:193-201.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Viaris de Lesegno C, Saint-Dizier, M, and Chastant-Maillard S. 2006. *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology* 66(6-7):1685-1693.
- Reynaud, K, Saint-Dizier, M, and Chastant-Maillard, S. 2004. *In vitro* maturation and fertilization of canine oocytes. *Methods Mol Biol* 253:255-272.
- Robertson J.B., Srsen V., King W.A. 1992. Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. The 12th International Congress in Animal Reproduction. The Hague, The Netherland, pp. 1808–1810.
- Roeder, R.G. 1976. Eukaryotic nuclear RNA polymerases. In :RNA Polymerase, ed. R. Losick, and M. Chamberlin, Cold Spring Harbor, NY :Cold Spring Harbor Laboratory, 285-329.
- Saint-Dizier, M, Reynaud, K, and Chastant-Maillard, S. 2004. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol Reprod Dev* 68(2):205-212.
- Saint-Dizier, M, Salomon, JF, Petit, C, Renard, JP, and Chastant-Maillard, S. 2001. *In vitro* maturation of bitch oocytes:effect of sperm penetration. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 57:147-150.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.L., Galvez, B.G., Barthelemy, I. *et al.* 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* 444: 574-579.
- Sathananthan AH. 1997. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 10:21-38.
- Shimazu Y, Naito K. 1996. Both male and female pronuclei formation in canine oocytes inseminated at germinal vesicle stage. *J. Mamm. Ova Res.* 13:122-124.

- Shimizu T, Tsutsui T, Murao I, Orima H. 1990. Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jpn J Vet Sci.* 52:1273-1275.
- Songsasen, N and Apimeteetumrong, M. 2002. Effects of beta-mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. *Anim Reprod Sci.* 71(3-4):193-202.
- Songsasen, N, Spindler, RE, and Wildt, DE. 2007. Requirement for, and patterns of, pyruvate and glutamine metabolism in the domestic dog oocyte in vitro. *Mol Reprod Dev* 74(7):870-877.
- Songsasen, N, Yu, I, and Leibo, SP. 2002. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol Reprod Dev* 62(3):407-415.
- Sirivaidyapong, S, Bevers, mm, and Colenbrander, B. 1999. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *J.Androl.* G(4): 537-544.
- Telfer, E and Gosden, RG. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J.Reprod.Fertil.* 81(1):137-147.
- Tesoriero JV. 1981. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J Morphol* 168:171-179.
- Tsutsui T et Ejima H. 1988. Experimental induction of superfecundation in the dog. *Jpn J Vet Sci.* 50:581-583.
- Tsutsui T et Shimizu T. 1975. Studies on the reproduction of the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. *Jpn J Anim Reprod* 21:65-69.
- Tsutsui T, Hori T, Endo S, Hayama A, Kawakami E. 2004. Intrauterine transplantation of the early canine embryos. *Proc. 5<sup>th</sup> International Symposium on Canine and Feline Reproduction.* Sao Paulo, 2004. p271-273.
- Tsutsui T, Shimada K, Nishi M, Kubo N, Murao I, Shimizu T, Ogasa A. 1989. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn J Vet Sci;*51:797-800.
- Tsutsui T. 1975a 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. 1975b Ovulation rate and transuterine migration of the fertilized ova. *Jpn J Anim Reprod.* 21:98-101.
- Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 39:269-275.
- Tsutsui, T., Hori, T., Kawakami, E. 2001a. Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fert. Suppl* 57:309-314.
- Tsutsui, T., Hori, T., Okazaki, H., Tanaka, A., Shiono, M., Yokosuka, M., Kawakami, E. 2001b. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci.* 63 :401-405.
- Van der Stricht O. 1908. La structure de l'oeuf de la chienne et la genèse du corps jaune. *Compt.rend.Soc.des Anatomistes à Marseille, Dixième réunion:*1-9.
- Van der Stricht O. 1923. Etude comparée des ovules de mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse. *Arch Biol* 33:229-300.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A.M. 2006. Ovum Pick-Up and in vitro production in the bovine after use in several generations :a 2005 status. *Theriogenology.* 65:914-925.

- Vannucchi, CI, de Oliveira, CM, Marques, MG, Assumpcao, ME, and Visintin, JA. 2006. In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology* 66(6-7):1677-1681.
- Viaris de Lesegno, C, Reynaud, K, Pechoux, C, Thoumire, S, and Chastant-Maillard, S. 2007. Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. *Mol.Reprod.Dev.*
- Wachtler, F, Stahl A. 1993. The nucleolus :A structural and functional interpretation. *Micron* 24:473-505.
- Wallace, SS, Mahaffey, MB, Miller, DM, Thompson, FN, and Chakraborty, PK. 1992. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am.J.Vet.Res.* 53(2):209-215.
- Wansink, DG, Schul, W, van, dK, I, van Steensel, B, van Driel, R, and de Jong, L. 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J.Cell Biol.* 122(2):283-293.
- Wassarman, P M. 1988. The mammalian ovum. In "The Physiology of Reproduction" (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 69–102. Raven Press, New York.
- Wassarman, PM and Letourneau, GE. 1976. RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature* 261(5555):73-74.
- Weakley BS. 1976. Variations in mitochondrial size and ultrastructure during germ cell development. *Cell Tissue Res* 169:531-550.
- Westhusin, M, Burghardt, R, Ruglia, J, Willingham, L, Liu, L, Shin, T, Howe, LM, and Kraemer, D. 2001. Potential for cloning dogs. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 57:287-293.
- Westhusin, M, Hinrichs, K, Choi, YH, Shin, T, Liu, L, and Kraemer, D. 2003. Cloning companion animals (horses, cats, and dogs). *Cloning Stem Cells* 5(4):301-317.
- Wetscher, F, Havlicek, V, Huber, T, Gilles, M, Tesfaye, D, Griese, J, Wimmers, K, Schellander, K, Muller, M, Brem, G, and Besenfelder, U. (2005). Intrafallopian transfer of gametes and early stage embryos for in vivo culture in cattle. *Theriogenology* 64(1): 30-40.
- Wildt, DE, Chakraborty, PK, Panko, WB, and Seager, SW. 1978. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol.Reprod.* 18(4):561-570.
- Wildt, DE, Levinson, CJ, and Seager, SW. 1977. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *Anat.Rec.* 189(3):443-449.
- Yamada, S, Shimazu, Y, Kawaji, H, Nakazawa, M, Naito, K, and Toyoda, Y. (1992). Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol.Reprod.* 46(5):853-858.
- Zawistowski, S., Morris, J., Salman, M.D., Ruch-Gallie, R. 1998. Population dynamics, overpopulation, and the welfare of companion animals: new insights on old and new data. *J Appl Anim Welf Sci.* 1:193-206.

## Annexe : Liste de publications

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- **Viaris de Lesegno C.**, Reynaud K., Thoumire S., Pechoux C., Chastant-Maillard S. (2008) Ultrastructure of canine oocyte during in vivo maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 75(1), 115-125.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., **Viaris de Lesegno C.**, Saint-Dizier M., Chastant-Maillard S. (2005) In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology*. 66:1685-1693.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., Thoumire S., Chebrou M., **Viaris de Lesegno C.**, Chastant-Maillard S. (2005) In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130, 193-201.
- **Viaris de Lesegno C.**, Reynaud K., Chebrou M., Longin C., Chastant-Maillard S. Ultrastructure of canine oocyte during in vitro maturation. (soumis à *Molecular Reproduction and Development*, novembre 2007)

### Publications en cours

- Reynaud K., **Viaris de Lesegno C.**, Chebrou M., Thoumire S., Chastant-Maillard S. Follicular population, cumulus mucification and oocyte chromatine configuration during the peri-ovulatory period in the bitch (soumis à *Theriogenology*)
- **Viaris de Lesegno C.**, Reynaud K., Chebrou M., Thoumire S., Adenot P., Chastant-Maillard S. Nucleolar reactivation during canine meiosis in vivo : quantitative evaluation of transcriptional activity. (soumission prévue début novembre)
- **Viaris de Lesegno C.**, Reynaud K., Chebrou M., Thoumire S., Adenot P., Chastant-Maillard S. Quantitative evaluation of transcription in canine embryo.
- Chebrou M., **Viaris de Lesegno C.**, Reynaud K., Chastant-Maillard S. Spontaneous denudation and in vitro meiosis resumption in canine oocyte (soumission prévue à *Animal Reproduction Science*)

### Publications dans des revues françaises à comité de lecture

- Chastant-Maillard S., Saint-Dizier M., **Viaris de Lesegno C.**, Chebrou M., Thoumire S., Reynaud K., Fontbonne A., (2007) Biotechnologies de l'embryon dans l'espèce canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, tome 160, n°2, 153-161.
- **Viaris de Lesegno C.**, Tanguy-Dezaux C., Chebrou M., Reynaud K., Chastant-Maillard S. (2005). Maturation ovocytaire in vitro chez la chienne. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, tome 158, n°2, 173-180.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., **Viaris de Lesegno C.**, Thoumire S., Chastant-Maillard S. (2005). Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire in vivo chez la chienne. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, tome 158, n°2, 167-172.
- Chastant-Maillard S., Fontbonne A., Marseloo N., **Viaris de Lesegno C.**, Thoumire S., Reynaud K. (2005) Reproduction assistée dans l'espèce canine : état des lieux. *Le Point Vétérinaire*, 259, 46-49.

## Communications

- Chastant-Maillard S., Fontbonne A., Saint-Dizier M., **Viaris De Lesegno C.**, Chebrou M., Reynaud K. 2006. Canine oocyte maturation. Annual meeting of the FNRS group "Competence to development of the mammalian oocyte and embryo quality", Louvain-la-Neuve, 2 juin 2006. (Conférence invitée)
- Chastant-Maillard S., Fontbonne A., Saint-Dizier M., **Viaris De Lesegno C.**, Chebrou M., Reynaud K. 2006. In vitro and in vivo maturation of canine oocytes. 5<sup>th</sup> biannual congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), Budapest, Hungary 7-9 avril 2006. (Conférence invitée)
- Reynaud K., Chebrou M., Tanguy-Dezaux C., **Viaris de Lesegno C.**, Chastant-Maillard S. (2006). Roles of cAMP and cumulus cells during in vitro meiotic resumption of canine oocyte. 5<sup>th</sup> biannual congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), Budapest, Hungary 7-9 avril 2006. (communication orale)
- **Viaris de Lesegno C.**, Reynaud K., Thoumire S., Longin C., Chastant-Maillard S. (2006). Ultrastructure of canine oocytes during peri-ovulatory maturation. 5<sup>th</sup> biannual congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), Budapest, Hungary 7-9 avril 2006. (communication orale)
- **Viaris de Lesegno C.** Maturation ovocytaire in vitro chez la chienne. Académie Vétérinaire de France. 17 février 2005. (communication orale)

## Résumé

La biologie de l'ovocyte canin est très différente de celle des autres espèces mammifères : en particulier, la fin de la maturation ovocytaire dans le follicule se déroule en présence d'une forte concentration en progestérone (lutéinisation préovulatoire) et l'ovulation libère un ovocyte en prophase I, qui n'atteindra le stade métaphase II qu'au bout de 48 à 60 heures de transit oviductal. Parallèlement, les taux de maturation obtenus *in vitro* chez la chienne sont très faibles. Le but de ce travail était de fournir une description ultrastructurale de la maturation ovocytaire canine *in vivo* (avant le pic de LH jusqu'à 105 heures post ovulation) et d'y comparer l'évolution des ovocytes mis en maturation *in vitro*.

*In vivo*, nos résultats en microscopie électronique à transmission montrent que l'ovocyte canin suit globalement le modèle de maturation ovocytaire des mammifères, à l'exception de l'existence d'une période de réactivation transcriptionnelle entre 24 et 48 heures post ovulation. Nous avons mis en évidence, grâce à une étude quantitative de l'incorporation de BrUTP, une activité transcriptionnelle très intense pendant cette période, activité à la fois nucléoplasmique et nucléolaire. Ni le pic de LH ni l'ovulation ne se révèlent suivis de modifications ultrastructurales importantes. Ils ne sont associés respectivement qu'à l'expansion et à la recompaction du cumulus. Les signaux de régulation de la méiose chez la chienne restent donc inconnus.

*In vitro*, l'examen ultrastructural montre que les ovocytes issus d'ovaires d'anoestrus sont très immatures. La comparaison avec les formes observées *in vivo* indique que les ovocytes qui n'achèvent pas leur méiose *in vitro* (VG et métaphase I) sont simplement interrompus dans leur maturation et ne présentent pas de formes aberrantes. Quant aux ovocytes ayant atteint le stade métaphase II *in vitro*, ils montrent un très faible degré de maturation cytoplasmique.

## Summary

The biology of the oocyte in the dog differs considerably from that in other mammalian species. In particular, the final intrafollicular maturation of the oocyte occurs in the presence of a high progesterone concentration (pre-ovulatory luteinisation) and the ovulation releases an oocyte in prophase I that will reach the metaphase II stage only after 48-60 hours spent in the oviduct. This may explain why the *in vitro* maturation rates of canine oocytes are very low. The purpose of our work was to describe the ultrastructural changes occurring in the oocyte during *in vivo* maturation (prior to the LH peak and until 105 hr after ovulation) and, in a second step, to compare those changes with those occurring in oocytes maturing *in vitro*.

Transmission electron microscopy showed that *in vivo* the canine oocyte follows the typical maturation pattern of mammalian oocytes, with the addition of a period of transcriptional reactivation between 24 and 48 hr after ovulation. A very intense transcriptional activity, both nucleoplasmic and nucleolar, was demonstrated during this phase by way of a quantitative study of BrUTP incorporation. Neither the LH peak, nor the ovulation are followed by significant ultrastructural changes. These events are only associated respectively with the expansion and some recompaction of cumulus cells. The signals responsible for the induction of meiosis resumption in the canine oocyte remain unknown.

*In vitro*, judging from their ultrastructure, oocytes collected from ovaries in anestrus are quite immature. Compared with *in vivo* oocytes, those that do not complete their meiosis *in vitro* (GV and metaphase I) are only stopped in the maturation process but do not show any aberrant pattern. The oocytes that reach the metaphase II stage demonstrate a very low degree of cytoplasmic maturation.