

Maturation ovocytaire *in vitro* chez la chienne

In vitro maturation of canine oocyte

Par Christine VIARIS DE LESEGNO⁽¹⁾, Cécile TANGUY-DEZAUX⁽¹⁾, Martine CHEBROUT⁽¹⁾,
Karine REYNAUD⁽¹⁾ et Sylvie CHASTANT-MAILLARD⁽¹⁾⁽²⁾
(communication présentée le 17 février 2005)

RÉSUMÉ

L'ovocyte de chienne constitue un modèle de méiose très particulier parmi les mammifères. Sa maturation *in vitro*, étudiée depuis une dizaine d'années seulement, reste très mal maîtrisée : faible taux de métaphase II (10 à 20 % contre plus de 90 % chez les bovins) et fort taux de dégénérescence en culture (20 à 60 %) malgré les essais d'amélioration des milieux de culture. Or la maturation *in vitro* est une étape indispensable pour avoir accès, tant chez le chien que chez les Canidés en voie de disparition, aux biotechnologies de la reproduction (fécondation et production d'embryons *in vitro* notamment). Il est indispensable de mieux comprendre la biologie de l'ovocyte chez la chienne pour améliorer les taux de maturation. Nous nous sommes intéressées, en premier lieu, au rôle de l'AMPc dans la reprise de la méiose *in vitro*. Nous avons modulé la concentration intraovocytaire d'AMPc en soumettant les ovocytes à des molécules qui la diminuent (Rp-AMPc) ou l'augmentent (dbAMPc et forskoline), ou en dénudant l'ovocyte pour arrêter tout apport par les cellules du cumulus. Nous avons ainsi montré que l'AMPc jouerait un rôle dans la poursuite de la méiose dont la reprise serait également contrôlée par une autre voie, peut-être calcique. En parallèle, nous explorons l'évolution de l'ultrastructure de l'ovocyte au cours de la maturation *in vivo* et *in vitro*, pour détecter les anomalies cytoplasmiques qui peuvent apparaître au cours de la maturation.

Mots clés : ovocyte, chienne, maturation *in vitro*, AMPc, ultrastructure.

SUMMARY

Compared to other mammals, the canine oocyte offers a very unusual model of meiosis. Its maturation *in vitro*, studied only over the past ten years, is still poorly controlled: low rate of metaphase II (10 to 20% vs. over 90% in cattle), and high rate of degeneration in cultures (20 to 60%) despite attempts to improve culture media. However, in dogs as well as in canidae threatened by extinction, *in vitro* maturation is a key step for reproductive biotechnologies, such as *in vitro* fertilization and embryo production. It is therefore urgent to improve our understanding of the canine oocyte to improve maturation rates. We initiated studies on oocyte maturation in bitches. We examined the role of cAMP in the resumption of meiosis *in vitro* in bitches, using substances which reduce (Rp-cAMP) or increase (dbcAMP and forskolin) its level inside the oocyte. We also used denuded oocytes to prevent any cAMP supply from the granulosa cells. With this model, we showed that cAMP might play a role in maintaining meiosis, and that the resumption of meiosis may also be controlled by another pathway, possibly involving calcium. Another of our research projects explores changes in the oocyte ultrastructure during *in vivo* and *in vitro* maturation. Transmission electron microscopy may provide precise information on possible cytoplasmic anomalies induced by maturation.

*This fundamental work will eventually help us improve *in vitro* maturation of canine oocytes.*

Key-words: oocyte, bitch, *in vitro* maturation, cAMP, ultrastructure.

* Correspondance : S. CHASTANT-MAILLARD, UMR 1198 INRA / ENVA / CNRS Biologie du Développement et Reproduction, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort CEDEX, France. Tel : 01 43 96 71 28, Fax: 01 43 96 71 30, E-mail: schastant@vet-alfort.fr

(1) UMR 1198 INRA / ENVA / CNRS Biologie du Développement et Reproduction,

(2) Unité de Reproduction, CERCA (Centre d'Études en Reproduction des Carnivores)

• INTRODUCTION

Les techniques de biotechnologies de la reproduction se sont développées durant les vingt dernières années, tant chez l'humain que chez l'animal. Chez la femme, la stimulation ovarienne, la fécondation *in vitro* (FIV) et le développement embryonnaire *in vitro* jusqu'au stade blastocyste sont relativement bien maîtrisés. Par contre, la maturation *in vitro* (MIV) d'ovocytes immatures fait encore l'objet de recherches (TROUNSON, ANDERIESZ et JONES, 2001) car elle aurait pour avantage d'éviter les risques liés à l'hyperstimulation.

Chez l'animal, la MIV a été décrite dès les années 60 (EDWARDS, 1965) et la naissance de jeunes issus de MIV, de FIV et de développement embryonnaire *in vitro* a été obtenue dans les années 60 à 80. Du point de vue zootechnique, la technique de MIV permet non seulement d'obtenir un grand nombre de descendants d'une femelle et de diffuser plus largement son potentiel génétique, mais aussi de raccourcir l'intervalle entre générations, les ovocytes pouvant être ponctionnés sur l'animal prépubère. Si la technique de la MIV a été mise au point dans de nombreuses espèces animales, la chienne fait exception. L'intérêt pour l'ovocyte et sa maturation, dans cette espèce, ne s'est développé que depuis une dizaine d'années et ce modèle montre de nombreuses particularités qui ne permettent pas de calquer les solutions trouvées chez les autres mammifères.

Contrairement aux autres mammifères dont l'ovocyte est expulsé du follicule préovulatoire au stade métaphase II de la méiose, celui de la chienne l'est au stade immature de vésicule germinative (VG), en prophase I, dans un environnement hormonal particulier de lutéinisation préovulatoire (REYNAUD *et al.*, 2005) ; il ne complète sa méiose qu'après 48 à 72 heures passées dans l'oviducte (TSUTSUI, 1975 ; MARSELOO *et al.*, 2004). Les taux de MIV, de 10 à 20 % en moyenne, sont beaucoup plus faibles (YAMADA *et al.*, 1992 ; HEWITT, WATSON et ENGLAND, 1998 ; SAINT DIZIER *et al.*, 2001) que ceux de 80 à 90 % obtenus chez les bovins et les murins. La maturation *in vitro*, plus lente, est obtenue en 48 à 96 heures de culture au lieu de 24 heures chez les bovins (YAMADA *et al.*, 1992 ; HEWITT, WATSON et ENGLAND, 1998).

Les raisons de ce faible taux de maturation et les facteurs responsables du délai de la reprise de méiose sont encore inconnus. La mise au point de la MIV chez la chienne permettrait pourtant d'accroître les connaissances fondamentales et d'approfondir les connaissances cliniques ; elle est le point de passage obligé pour le développement d'autres biotechnologies de la reproduction, telles que la production d'embryons *in vitro*. Les applications qui en découlent peuvent intéresser les éleveurs (diffusion du potentiel génétique des femelles d'élite, sexage des embryons, éradication de tares génétiques à l'aide du diagnostic préimplantatoire) et les généticiens (obtention d'embryons d'animaux de génotype intéressant mais hypofertiles ou infertiles) ; elles possèdent également un intérêt zoologique (préservation des Canidés en voie de disparition).

Dans cet article, nous allons faire le point de nos connaissances sur la MIV chez la chienne, à partir des données de la littérature et des travaux réalisés dans notre laboratoire.

Nous aborderons ensuite deux aspects de recherche de façon plus détaillée (rôles de l'AMPC dans la maturation et analyse de l'ultrastructure de l'ovocyte).

• MISE EN ŒUVRE DE LA MATURATION *IN VITRO* CHEZ LA CHIENNE

Pour plus de détails, on pourra se reporter aux synthèses de REYNAUD, SAINT-DIZIER et CHASTANT-MAILLARD (2004) et de LUVONI *et al.*, (2005).

Origine des ovocytes canins utilisés pour la maturation *in vitro*

Sélection des ovaires

Le stade physiologique des ovaires (anœstrus, proœstrus, œstrus ou diœstrus) a un rôle discuté selon les études (HEWITT et ENGLAND, 1997 ; OTOI *et al.*, 2001) mais ne semble pas primordial. La plupart des études sont réalisées sur des ovaires en anœstrus collectés lors d'ovariectomies de convenance. Par contre, un effet de l'âge existe car une baisse importante du taux de maturation *in vitro* apparaît lorsque les ovocytes sont prélevés à partir d'ovaires de femelles de plus de 7 ans (HEWITT et ENGLAND, 1997). Enfin, une étude a montré qu'il est possible d'utiliser des ovaires de chiennes présentant un pyomètre (HISHINUMA *et al.*, 2004) mais l'étude a été réalisée sur un faible nombre d'ovocytes et dans nos mains, ces ovaires n'ont pas autorisé la récolte d'un grand nombre d'ovocytes.

Origine des follicules

Les ovaires en anœstrus ne présentent pas de follicules visibles à l'œil nu. Une dilacération de l'ovaire est donc nécessaire et permet de récolter d'une vingtaine à une centaine d'ovocytes provenant de follicules préantraux et antraux de moins d'un millimètre de diamètre.

Par contre, les ovaires de chiennes en œstrus présentent des follicules de 3 à 8 mm de diamètre environ. Le recueil de ces ovocytes demande un travail lourd puisqu'il faut suivre régulièrement les chiennes pour détecter le début des chaleurs, puis doser la progestéronémie et si possible, faire un suivi échographique de la croissance folliculaire. La ponction des follicules préovulatoires ne permet d'obtenir au maximum qu'une dizaine d'ovocytes par ovaire, qui sont de qualité optimale pour la maturation. Les résultats de la MIV restent cependant décevants, puisque le pourcentage d'ovocytes en métaphase II est en moyenne de 32 % (YAMADA *et al.*, 1992), au lieu des 10 à 20 % obtenus lorsque les ovocytes proviennent d'ovaires en anœstrus. Les ovocytes utilisés dans les recherches de mise au point de la MIV sont donc en grande majorité issus d'ovaires en anœstrus.

Sélection des ovocytes

Les ovocytes récoltés par dilacération d'ovaires en anœstrus sont très hétérogènes. Ils sont sélectionnés selon des critères morphologiques et seuls les ovocytes de grade 1, c'est-à-dire de forme bien ronde, dont le cytoplasme est sombre et homogène et qui sont entourés d'au moins deux

couches de cellules de cumulus (figure 1 A et B) ont la capacité de poursuivre leur maturation *in vitro* (HEWITT et ENGLAND, 1997). Le diamètre ovocytaire est un critère fondamental dans la sélection des ovocytes : ils doivent mesurer plus de 100 µm de diamètre pour pouvoir atteindre les stades métaphase I ou II (HEWITT et ENGLAND, 1998).

Milieux de maturation

Plusieurs milieux et temps (24, 48, 72 et 96 heures) de culture ont été évalués. Les principaux résultats sont rassemblés dans le tableau 1. Malgré l'ajout de différents composants (sérum, substances énergétiques, protéines, hormones, facteurs de croissance...), les taux de maturation restent très faibles, même pour des ovocytes provenant de follicules préovulatoires ; la qualité du milieu de maturation nous apparaît donc, pour l'instant, comme le facteur limitant. Le temps de maturation optimal est de 72 heures (YAMADA *et al.*, 1992 ; OTOI *et al.*, 2001), ce qui est proche de la durée nécessaire *in vivo* pour la reprise de la méiose. Enfin, les taux de dégénérescence observés sont importants et varient de 20 à 60 % en moyenne (LUVONI *et al.*, 2005).

La maturation *in vivo* de l'ovocyte ayant lieu dans le liquide folliculaire, puis contrairement aux autres espèces, dans l'oviducte, il n'est pas étonnant de constater que les milieux de culture actuels, calqués sur ceux utilisés dans les espèces bovine, murine ou humaine, ne soient pas adaptés. L'utilisation séquentielle de deux milieux de culture, mimant les conditions des milieux intrafolliculaire, puis tubaire, pourrait permettre d'améliorer les rendements de la MIV de l'ovocyte de chienne. Nous manquons aussi de données fondamentales sur ces processus de maturation ainsi que sur la composition du fluide tubaire.

Conditions de maturation

Plusieurs conditions de maturation ont été explorées, telles que la culture en groupe d'ovocytes dans une gouttelette sous huile ou la culture en puits. Aucune de ces techniques n'a augmenté significativement les taux d'ovocytes en métaphase II. Un système de culture dans un oviducte ligaturé a été décrit (LUVONI *et al.*, 2003) et semble donner une augmentation significative des rendements, mais reste difficilement répé-

Auteurs	Technique de coloration de l'ADN	Technique d'observation	% d'ovocytes non identifiés
HEWITT <i>et al.</i> , 1998	Acéto-orcéine	Microscopie optique	10 à 40 %
SAINT-DIZIER <i>et al.</i> , 2004	Hoechst 33342	Microscopie optique à fluorescence	30,5 %
	Propidium iodide	Microscopie confocale	< 1,4 %

Tableau 2 : Comparaison de deux méthodes de détermination du stade nucléaire d'un ovocyte chez la chienne.

table. D'autres conditions de culture restent encore à évaluer, en particulier en faisant varier la composition de l'atmosphère gazeuse par exemple, ce qui a donné de bons résultats chez les murins (EPPIG et WIGGLESWORTH, 1995).

• ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE LA MATURATION

Deux aspects de la maturation de l'ovocyte doivent être étudiés afin d'évaluer la qualité de la culture : la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique.

Maturation nucléaire

La maturation nucléaire correspond à la reprise de la méiose caractérisée par la rupture de la vésicule germinative (stade GVBD pour Germinal Vesicle BreakDown), puis à sa poursuite jusqu'au stade métaphase II. Il faut donc déterminer précisément le stade nucléaire de l'ovocyte. Cette étape est difficile avec l'ovocyte de chienne car le cytoplasme est très riche en lipides, ce qui lui donne un aspect noir très opaque, ne permettant pas l'observation du noyau par les techniques classiquement employées dans les autres espèces. Pour environ 40 % des ovocytes, les techniques habituelles de coloration, telles celle utilisant le Hoechst associé à la microscopie optique, ne permettent pas de déterminer leur stade nucléaire (SAINT-DIZIER, REYNAUD et CHASTANT-MAILLARD, 2004). Les différentes méthodes de coloration de l'ADN et d'observation, actuellement utilisées chez la chienne, sont décrites dans le tableau 2. La microscopie confocale est la méthode qui assure une détermination précise dans 99 % des ovocytes (SAINT DIZIER *et al.*, 2004).

D'autres aspects de la maturation tels que l'évolution de la chromatine, des microtubules et des activités MPF et MAP kinase⁽¹⁾ au cours de la méiose, ont été étudiés dans notre laboratoire et ont révélé des profils tout à fait similaires à ceux des ovocytes des autres espèces (SAINT DIZIER *et al.*, 2004).

Maturation cytoplasmique

La maturation cytoplasmique est définie comme la capacité de l'ovocyte à permettre une fécondation monospermique normale, puis un développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

Chez la chienne, la fécondation *in vitro* n'est pas encore au point ; on observe un taux de polyspermie très important de 47 %, avec 2 à 12 spermatozoïdes par ovocyte (SAINT DIZIER *et al.*, 2001) et le développement embryonnaire s'interrompt très tôt en culture (YAMADA *et al.*, 1992). Il est donc intéressant d'analyser l'évolution de l'ovocyte lui-même (ultrastructure, paramètres biochimiques) au cours de la maturation *in vivo* et *in vitro*.

• LES TRAVAUX MENÉS À L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

En 1999, nous avons commencé des études centrées sur la physiologie de la reproduction de la chienne et, plus particulièrement, sur les aspects nucléaire et cytoplasmique de

(1) MPF : Maturation Promoting Factor, MAP-Kinase : Mitogen-Activated Protein kinase, deux molécules intervenant dans la régulation du cycle cellulaire.

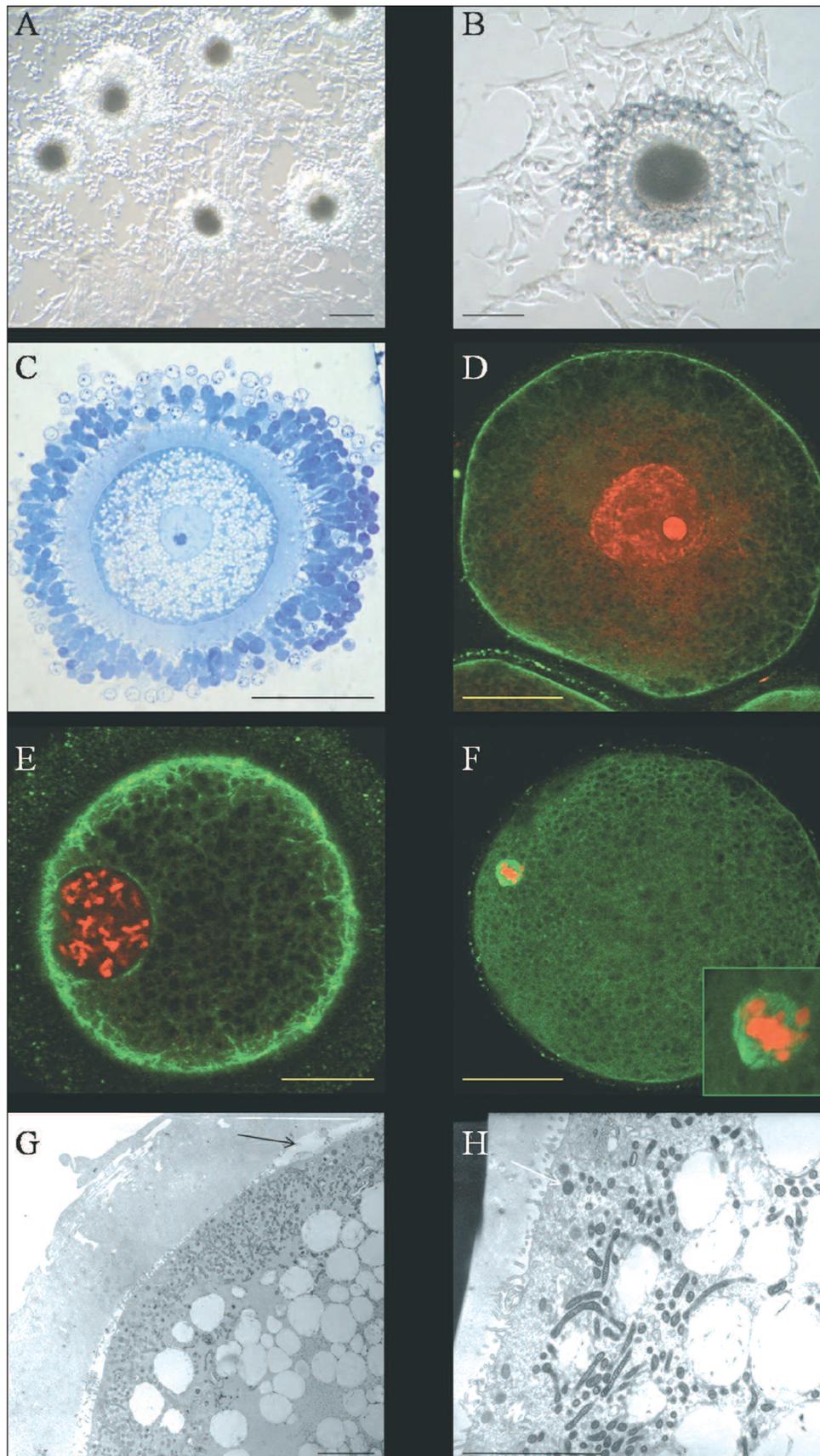


Figure 1 : Avant la maturation *in vitro*, les complexes ovocyte-cumulus de grade 1 (A) sont sélectionnés : ils présentent un cytoplasme sombre et homogène et sont entourés d'au moins deux couches de cellules de granulosa. Après 72 h de maturation, une partie des cellules du cumulus s'étale sur le support et prend un aspect fusiforme (B). Le noyau n'est pas observable directement en microscopie optique à cause du cytoplasme très sombre de l'ovocyte. Une coupe semi-fine (1 µm) d'un ovocyte non mûré (C) révèle un noyau au stade VG observable également au microscope confocal (D). Les chromosomes se condensent ensuite au stade GVBD (E), puis les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique (F). Après 72 h de maturation, parmi les modifications ultrastructurales, la microscopie électronique à transmission (G et H) permet d'observer la délocalisation centrifuge des mitochondries, le rassemblement des granules corticaux (flèche blanche) contre la membrane plasmique et le décollement de la zone pellucide (flèche noire). L'échelle correspond à 100 µm (A), 50 µm (B, C), 25 µm (D, E, F) ou 5 µm (G, H).

Auteurs	Origine des ovocytes	Conditions de culture	Traitements	Résultats MIV	Conclusions			
YAMADA <i>et al.</i> , 1992	Chiennes : 1-7 ans, superovulation, préovulatoire Ovocytes : 271 ovocytes à cumulus compact	<ul style="list-style-type: none"> • 15-20 ovocytes dans 400 µl sous huile • 10 % SVF • 5 % CO₂ • 37°C 	Temps de culture	M II	Rendements significativement supérieurs aux autres études mais encore bien inférieurs aux autres espèces (90 % chez les bovins et murins). Hétérogénéité des ovocytes mis en culture (petits et gros follicules)			
			0 h	0 %				
			24 h	9,1 %				
			48 h	27,3 %				
			72 h	31,9 %				
HEWITT <i>et al.</i> , 1998	Chiennes : Tous stades ovariens 1 à 7 ans Ovocytes : Grade 1 1292 ovocytes	<ul style="list-style-type: none"> • < 10 ovocytes dans 400 µl • sous goutte d'huile • 48 ou 96 h de MIV • 5 % CO₂ • 39°C 	Sources de protéine	MI à M II	Pas d'effet significatif du stade ovarien entre les 6 traitements. Le SVF à haute concentration ou la BSA semblent optimaux pour la MIV canine.			
			0	4 %		6 %		
			SVF 5 %	12 %		5 %		
			SVF 10 %	24 %		3 %		
			SVF 20 %	14 %		19 %		
			BSA 0,3 %	36 %		15 %		
			BSA 4 %	13 %		9 %		
			OTOI <i>et al.</i> , 2001	Chiennes : Anœstrus, phase folliculaire et diœstrus Ovocytes : 648 ovocytes de grade 1		<ul style="list-style-type: none"> • culture individuelle dans 40 µl de milieu sous huile • 72 h de MIV • 5 % CO₂ • 38,5°C 	Diamètre des ovocytes	Pas de M II pour le groupe < 110 µm. Les ovocytes ≥ 120 µm atteignent significativement plus le stade M II. Au sein des groupes de tailles, pas d'effet significatif du stade ovarien.
							< 110 µm	
							110 à < 120 µm ≥ 120 µm	
OTOI <i>et al.</i> , 2002	Chiennes : Anœstrus et Diœstrus 0,5 à 3 ans Ovocytes : Grade 1 > 110 µm 1483 ovocytes	<ul style="list-style-type: none"> • sérum de chienne en chaleurs • 72 h de MIV • 5 % CO₂ • 38,5°C 	Densité de culture	M II	Le nombre d'ovocytes en culture n'a pas d'influence sur la MIV pour une même densité de culture. La densité de culture a un effet sur les ovocytes d'ovaires en anœstrus (pas d'effet en diœstrus). 10 µl de milieu par ovocyte semble être la densité optimale.			
			5, 10, 15 ou 20 ovocytes dans 100 µl de milieu (anœstrus)	4,6 à 16,2 %				
			5, 10, 15 ou 20 ovocytes dans 100 µl de milieu (diœstrus)	2,2 à 11,3 %				
			1, 5 ou 10 ovocytes à 10 µl de milieu par ovocyte (anœstrus)	5 à 10 %				
			1, 5 ou 15 ovocytes à 7 µl de milieu par ovocyte (diœstrus)	9,9 à 11,5 %				
HISHINUMA <i>et al.</i> , 2004	Chiennes : pyomètres (2) et métœstrus (3) Ovocytes : 107 ovocytes de grade 1 > 100 µm de diamètre	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % SVF, FSH, E₂, pyruvate, gentamycine • 72 h de MIV • 5 % CO₂ • 38,5°C 	Pyomètre vs diœstrus	Dégénérés	La MIV est possible avec des ovocytes de chiennes en pyomètre.			
			Pyomètre	32 %		6 %		
			diœstrus	24,6 %		8,8 %		

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats les plus marquants d'études des conditions de la maturation in vitro chez la chienne.

SVF : sérum de veau fœtal, BSA : serumalbumine bovine, E₂ : œstradiol 17β, MI : métaphase I, MII : métaphase II, MIV : maturation in vitro

la maturation ovocytaire dans cette espèce (SAINT-DIZIER *et al.*, 2001).

Rôle de l'AMPc au cours de la maturation nucléaire et évaluation ultrastructurale de l'ovocyte

Chez les mammifères, deux voies métaboliques principales jouent un rôle dans le blocage et la reprise de la méiose : celles de l'AMPc et du calcium. L'importance relative de ces deux voies varierait selon les espèces (MERMILLOD et LE LANOU, 1999). De nombreuses expériences visant à moduler le niveau intraovocytaire d'AMPc ont été menées chez différentes espèces de mammifères. Il en ressort qu'une diminution de ce niveau entraîne la reprise de la méiose (WHITAKER, 1996). La chute du niveau intraovocytaire d'AMPc est due *in vivo* à la désolidarisation de l'ovocyte des cellules du cumulus, celles-ci approvisionnant l'ovocyte en AMPc. Cependant, chez le Clam (*Spisula solidissima*, mollusque), la reprise de la méiose est associée, contrairement aux mammifères, à une augmentation du niveau d'AMPc (YI *et al.*, 2002). Or la chienne partage avec le clam la particularité que la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte induit *in vitro* la reprise de la méiose (SAINT DIZIER *et al.*, 2001 ; YI *et al.*, 2002). Afin de déterminer l'effet éventuel d'une augmentation ou d'une diminution de l'AMPc sur la maturation ovocytaire, nous avons évalué l'effet de modulateurs de la concentration de l'AMPc et celui de la dénudation de l'ovocyte avant maturation.

De plus, afin d'estimer la qualité de nos milieux de maturation, mais également de déterminer des critères de qualité ovocytaire, deux protocoles de microscopie électronique sont en cours. Le but est de comparer les caractéristiques ultrastructurales des ovocytes ayant atteint le stade métaphase II, donc supposés de bonne qualité, et des ovocytes restés bloqués aux stades immatures ; en parallèle, sont analysés des ovocytes dont la maturation s'est effectuée *in vivo*.

Matériel et méthodes

Dans le cadre du protocole d'évaluation du rôle de l'AMPc, les ovocytes ont été obtenus à partir d'ovaires de chiennes en œestrus. Ceux qui présentaient au moins 2 couches de cellules de cumulus, un cytoplasme sombre et homogène et un diamètre de plus de 100 µm ont été placés *in vitro* dans cinq milieux différents de culture pendant

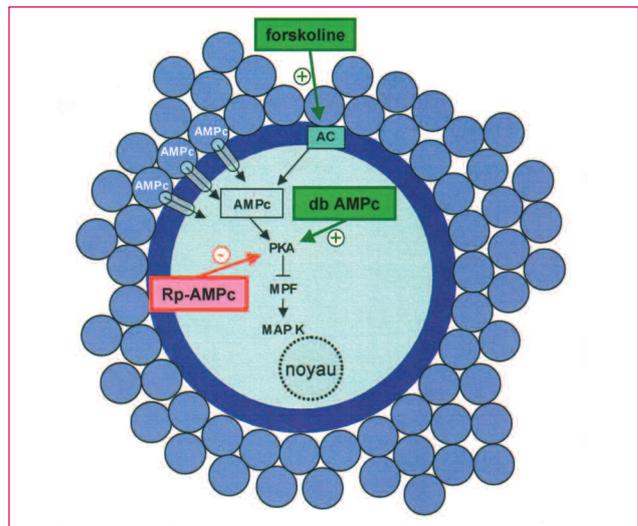


Figure 2 : Mécanismes d'action de la forskoline, du db-AMPc et du Rp-AMPc. La forskoline augmente la synthèse d'AMPc par activation de l'adénylate cyclase membranaire. Le dbAMPc est un analogue de l'AMPc. Le Rp-AMPc inhibe la PKA, contrecarrant ainsi l'effet de l'AMPc.

AC : AdénylateCyclase ; MAP-Kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase ; MPF : Maturation Promoting Factor ; PKA : Protein Kinase A

72 heures. Ces cinq milieux et leurs effets attendus sont résumés dans le **tableau 3**. Deux molécules, le db-AMPc et la forskoline ont pour action d'augmenter la concentration intraovocytaire d'AMPc et une autre, le Rp-AMPc, de le diminuer (**figure 2**). Le stade nucléaire des ovocytes après culture est évalué par la coloration de l'ADN par l'éthidium homodimère et par le marquage de la tubuline par immunocytochimie, suivies de l'observation en microscope confocale.

L'étude de la qualité de la maturation se fait également par une étude ultrastructurale de l'ovocyte. D'une part, les ovocytes issus de petits follicules d'ovaires en œestrus avant et après 72 heures de MIV sont recueillis, fixés, puis inclus en résine Epoxy. Des coupes semi-fines (1 µm) et ultra-fines (70 nm) sont réalisées, puis les premières sont observées au microscope optique et les secondes, au microscope électronique à transmission. D'autre part, des ovocytes au stade métaphase II sont collectés *in vivo* environ 60 heures après l'ovulation. L'ultrastructure de ces ovocytes est comparée à celle des ovocytes en métaphase II, obtenus *in vitro*.

Groupes	Composition du milieu de culture	Effet du composé	Effet sur la concentration d'AMPc
Témoin	Milieu de base		0
dbAMPc	Milieu de base + 2mM dbAMPc	Analogue de l'AMPc	+
Forskoline	Milieu de base + 100µM forskoline	Activateur de l'adénylate cyclase	+
Dénudés	Milieu de base + dénudation mécanique		?
Rp-AMPc	Milieu de base + 1mM Rp AMPc	Inhibiteur de la PKA	-

Tableau 3 : Composition et effets attendus des 5 milieux utilisés sur la concentration intraovocytaire d'AMPc.

Résultats

Des complexes ovocytes-cumulus observés à 0 et à 72 heures de maturation sont présentés sur la figure 1 (A à C). Les 1555 ovocytes observés ont été classés selon leur stade nucléaire (figure 1, D à F). Le stade VG est caractérisé par un noyau de taille importante, central et présentant un nucléole. Au cours de la maturation, le noyau est délocalisé en périphérie de l'ovocyte et les chromosomes se condensent. A un stade ultérieur, le marquage de la tubuline et de l'ADN permet de visualiser les chromosomes condensés, alignés sur la plaque métaphasique avant expulsion du premier globule polaire et blocage au stade métaphase II. Le taux de dégénérescence en culture, de 26,3 % à 36,3 %, ne varie pas significativement selon le traitement.

Seule la dénudation augmente nettement la reprise de la méiose avec un taux de 80,2 %, contre 62,6 % dans le groupe témoin. Cependant, elle n'est pas une solution à retenir pour la MIV car elle pose des problèmes de fécondation ultérieure, à cause de la modification de la zone pellucide qu'elle provoque.

Le traitement par le Rp-AMPC n'a aucun effet significatif sur la reprise de la méiose, mais les ovocytes ayant repris leur méiose atteignent néanmoins les stades avancés de prémétaphase à métaphase II, en proportion plus importante (16,6 % au lieu de 10,2 % dans le lot témoin).

La forskoline et le db-AMPC provoquent des résultats différents. Seule la forskoline a un effet significatif et améliore la reprise de la méiose (73,4 % au lieu de 62,6 % dans le lot témoin). En plus de son effet sur l'AMPC, elle activerait probablement aussi les voies calciques.

L'étude de l'ultrastructure ovocytaire est en cours, et nous nous intéresserons entre autres à l'aspect des organites de l'ovocyte (mitochondries, golgi, granules corticaux,...), du noyau (localisation, aspect de l'enveloppe nucléaire, condensation de la chromatine, présence de nucléoles) et des cellules du cumulus (figure 1 G et H).

Discussion

L'AMPC ne semble donc pas avoir d'effet chez la chienne sur l'induction de la maturation nucléaire *in vitro*, mais sur sa poursuite. Nos résultats suggèrent également un rôle possible du calcium dans la reprise de la méiose, hypothèse qui demandera à être vérifiée. Deux voies, celles du calcium puis de l'AMPC, pourraient être impliquées successivement dans la méiose ovocytaire, d'où l'intérêt, à l'avenir, d'utiliser des milieux de culture séquentiels pour d'abord induire la reprise de la méiose, puis dans un second temps, assurer sa poursuite.

• CONCLUSION

La chienne est un modèle de reproduction original parmi les mammifères, tant au niveau endocrinien (lutéinisation pré-ovulatoire) que par sa maturation ovocytaire. Pour comprendre ce modèle si particulier, nous disposons dans la bibliographie essentiellement d'études cliniques et appliquées et de très peu d'études fondamentales. Durant les vingt dernières années, les études sur la maturation *in vitro* ont porté essentiellement sur la mise au point de milieux de maturation calqués sur ceux des autres espèces. Le but de nos recherches est actuellement de mieux définir la maturation ovocytaire canine au plan fondamental, afin d'optimiser les biotechnologies qui y sont associées.

REMERCIEMENTS

Ce projet de recherche a été soutenu par l'Académie Nationale de Médecine (bourse de DEA 2003-2004 pour Christine Viaris de Lesegno). Nous remercions le CERCA (Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores de l'ENVA) pour le suivi de nos chiennes ainsi que Christine Longin et Sophie Chat (Plateforme microscopie, INRA Jouy-en-Josas) pour leurs conseils en microscopie électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- BRACKETT BG, BOUSQUET D, BOICE ML, DONAWICK WJ, EVANS JF, DRESSEL MA (1982) Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol.Reprod.* **27**, 147-158.
- EDWARDS RG (1965) Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, **208**, 349-351.
- EPPIG JJ, WIGGLESWORTH K (1995) Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: oxygen concentration. *Mol.Reprod.Dev.*, **42**, 447-456.
- HEWITT DA, ENGLAND GC (1997) Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J.Reprod.Fertil., Suppl.*, **51**, 83-91.
- HEWITT DA, ENGLAND GC (1998) The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, **49**, 957-966.
- HEWITT DA, WATSON PF, ENGLAND GC (1998) Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, **49**, 1083-1101.
- HISHINUMA M, MINAMI S, OKAMOTO Y, MIYATAKE K, SEKINE J (2004) Recovery, morphological quality, and *in vitro* maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. *Theriogenology*, **62**, 1652-1662.
- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D (2003) Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod.Domest.Anim.*, **38**, 410-414.
- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D (2005) Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, **63**, 41-59.
- MARSELOO N, FONTBONNE A, BASSU G, RIVIERE S, LEBLANC B, RAULT D, BIOURGE V, CHASTANT-MAILLARD S. (2004) Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. *In: Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction.* Sao Paulo, Brasil, 75-77.
- MERMILLOD P, LE LANOU D (1999) Maturation ovocytaire *in vivo* et *in vitro* chez les mammifères. *In: HAMAMAH S, MENEZOY, editors. Ovocyte et embryon, de la physiologie à la pathologie.* 2nd ed. Paris : ellipses/édition marketing S.A., 94-122.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, VIARIS DE LESEGNO C, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S (2005) Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **158** (2) 175-182.
- REYNAUD K, SAINT-DIZIER M et CHASTANT-MAILLARD S (2004) *In vitro* maturation and fertilization of canine oocytes. *In: SCHATTEN H , editor. Methods in Molecular Biology. Germ cell protocols. Vol 1 : Sperm and oocyte analysis,* Humana Press, 255-272.
- SAINT-DIZIER M, REYNAUD K, CHASTANT-MAILLARD S (2004) Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol.Reprod.Dev.*, **68**, 205-212.
- SAINT-DIZIER M, SALOMON JF, PETIT C, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S (2001) *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *J.Reprod.Fertil., Suppl.*, **57**, 147-150.
- TROUNSON A, ANDERIESZ C, JONES G (2001) Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*, **121**, 51-75.
- TSUTSUI T (1975) Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **21**, 70-75.
- WHITAKER M (1996) Control of meiotic arrest. *Rev. Reprod.*, **1**, 127-135.
- YAMADA S, SHIMAZU Y, KAWAJI H, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y (1992) Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biol.Reprod.*, **46**, 853-858.
- YI JH, LEFIEVRE L, GAGNON C, ANCTIL M, DUBE F (2002) Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *J.Cell Sci.*, **115**, 311-320.