



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 18023

**To cite this version :**

Maupeu, Diane. *Expression des facteurs de croissance GDF-9 et BMP-15 au cours de la folliculogenèse chez la chienne*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 100 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

ANNEE 2017 THESE : 2017 – TOU 3 – 4034

---

# EXPRESSION DES FACTEURS DE CROISSANCE GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9 (GDF-9) ET BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-15 (BMP-15) AU COURS DE LA FOLLICULOGENESE CHEZ LA CHIENNE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**MAUPEU Diane**

Née, le 17 août 1992 à Toulouse (31)

---

**Directeur de thèse : Mme Sylvie CHASTANT**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Jean PARINAUD**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

**Mme Sylvie CHASTANT**

**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

Professeur à L'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à L'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directrice** : **Madame Isabelle CHMITELIN**

**PROFESSEURS CLASSE  
EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°  
CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2°  
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT  
AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS  
CLASSE**

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe  
normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE  
CONTRACTUELS**

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

# REMERCIEMENTS

## **A Monsieur le Professeur Jean Parinaud**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse

Hommage respectueux

## **A Madame le Professeur Sylvie Chastant**

Professeur de Reproduction à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour avoir accepté la direction de ma thèse

Pour ses conseils de qualité et ses relectures

Un grand remerciement

## **A Madame le Docteur Isabelle Raymond-Letron**

Maître de Conférences d'Histologie – Anatomie Pathologique à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury

Sincères remerciements

## **A Madame le Professeur Monica De Los Reyes**

Professeur de Reproduction à la Faculté des Sciences vétérinaires de Santiago du Chili

Pour son accueil si chaleureux

Pour son aide précieuse durant mon séjour, mon stage et la réalisation de ma thèse

Un grand merci, en espérant se revoir souvent

## **A Jaime, Roca, Tomas et le reste de l'équipe**

De la Faculté des Sciences vétérinaires de Santiago du Chili

Un grand merci pour leur bonne humeur et leur jovialité sans faille qui ont rendu ce stage si agréable

## **A Monsieur le Docteur Faouzi Lyazrhi**

Maître de Conférences de Biostatistiques à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Un grand remerciement pour son aide en statistiques



# TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	11
FIGURES.....	11
TABLEAUX.....	13
ABRÉVIATIONS .....	15
INTRODUCTION .....	19
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>21</b>
<b>I. LA MATURATION IN VITRO CHEZ LA CHIENNE.....</b>	<b>23</b>
1. Essais de MIV et taux de réussite .....	23
2. Influence du milieu de culture.....	24
3. Influence de la durée de culture .....	25
4. Influence du stade du cycle œstral et du stade de folliculogenèse.....	26
<b>II. LES PARTICULARITÉS DE LA REPRODUCTION ET DE L'OVOCYTE DE LA CHIENNE .....</b>	<b>27</b>
1. Particularités du cycle œstral.....	27
2. Particularités de la période périovulatoire .....	28
A. <i>Avant l'ovulation : la lutéinisation pré-ovulatoire</i> .....	28
B. <i>Ovulation</i> .....	29
C. <i>Après l'ovulation : la maturation ovocytaire intratubaire</i> .....	30
3. Les follicules polyovocytaires.....	31
<b>III. LA COMMUNICATION OVOCYTE-GRANULOSA .....</b>	<b>33</b>
1. Importance de la communication ovocyte-granulosa .....	33
2. Modalités de la communication ovocyte-granulosa .....	33
A. <i>Projections transzonales</i> .....	33
B. <i>Jonctions gap</i> .....	34
C. <i>Facteurs paracrines</i> .....	35
3. Rôles de la communication ovocyte-granulosa.....	36
A. <i>Mise en place de la réserve folliculaire</i> .....	36
B. <i>Folliculogenèse</i> .....	37
C. <i>Période péri-ovulatoire</i> .....	37
<b>IV. LES FACTEURS DE CROISSANCE GDF-9 et BMP-15 .....</b>	<b>39</b>
1. Structure chimique de GDF-9 et BMP-15 .....	39
2. Récepteurs de GDF-9 et BMP-15 .....	39

3. Rôles de GDF-9.....	40
A. <i>Constitution de la réserve de follicules primordiaux</i> .....	40
B. <i>Folliculogenèse et ovogenèse</i> .....	41
C. <i>Période péri-ovulatoire et ovulation</i> .....	42
D. <i>Stéroïdogénèse</i> .....	42
4. Rôles de BMP-15 .....	42
A. <i>Constitution de la réserve de follicules primordiaux</i> .....	42
B. <i>Folliculogenèse</i> .....	43
C. <i>Période péri-ovulatoire et ovulation</i> .....	43
E. <i>Stéroïdogénèse</i> .....	44
<b>V. BILAN</b> .....	44
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	45
<b>I. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	47
1. Collecte des ovaires .....	47
2. Détermination du stade du cycle œstral .....	47
3. Inclusion des ovaires et préparation des lames d'immunohistochimie .....	48
4. Immunohistochimie .....	49
A. <i>Déparaffinage et étapes de préparation</i> .....	49
B. <i>Incubation avec les anticorps</i> .....	50
a. <i>Incubation des coupes avec les anticorps primaires</i> .....	51
b. <i>Incubation des coupes avec l'anticorps secondaire et révélation</i> .....	51
C. <i>Contre coloration et montage</i> .....	51
5. Observation des structures ovariennes.....	51
A. <i>Matériel d'observation</i> .....	51
B. <i>Détermination du stade folliculaire</i> .....	52
C. <i>Détermination de l'intensité de l'immunomarquage</i> .....	52
6. Analyse statistique des résultats .....	54
<b>II. RÉSULTATS</b> .....	57
1. Effectifs.....	57
2. Localisation de l'immunomarquage .....	59
3. Variations de l'immunomarquage selon le stade folliculaire .....	59
A. <i>GDF-9</i> .....	59
a. <i>Evolution du marquage de GDF-9 dans les ovocytes</i> .....	59
b. <i>Evolution du marquage de GDF-9 dans les follicules</i> .....	60

B. BMP-15.....	62
a. Evolution du marquage de BMP-15 dans les ovocytes.....	62
b. Evolution du marquage de BMP-15 dans les follicules.....	62
4. Variations de l'immunomarquage selon le stade du cycle œstral .....	64
A. GDF-9.....	64
a. Evolution du marquage de GDF-9 dans les ovocytes.....	64
b. Evolution du marquage de GDF-9 dans les follicules.....	64
B. BMP-15.....	67
a. Evolution du marquage de BMP-15 dans les ovocytes.....	67
b. Evolution du marquage de BMP-15 dans les follicules.....	67
<b>DISCUSSION</b> .....	71
<b>I. Protocole de réalisation des lames</b> .....	71
1. Nombre d'ovaires disponibles.....	71
2. Nombre de coupes d'ovaires disponibles .....	71
3. Choix de la technique .....	71
<b>II. Résultats</b> .....	72
1. Localisation des facteurs GDF-9 et BMP-15 .....	72
2. Variations d'expression des facteurs GDF-9 et BMP-15 au cours de la folliculogénèse	73
<b>III. Perspectives de l'étude</b> .....	76
 CONCLUSION .....	77
BIBLIOGRAPHIE .....	81
ANNEXES .....	95
 <b>Annexe 1</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 en fonction du stade folliculaire .....	95
<b>Annexe 2</b> : Marquage pour le facteur BMP-15 en fonction du stade folliculaire.....	96
<b>Annexe 3</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les ovocytes en fonction du cycle œstral et du stade folliculaire.....	97
<b>Annexe 4</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les follicules en fonction du cycle œstral et du stade folliculaire.....	98
<b>Annexe 5</b> : Marquage pour le facteur BMP-15 dans les ovocytes en fonction du cycle œstral et du stade folliculaire.....	99
<b>Annexe 6</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les follicules en fonction du cycle œstral et du stade folliculaire.....	100



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

<b>Figure 1</b> : Endocrinologie du cycle œstral chez la chienne (Olson et Husted, 1986).....	27
<b>Figure 2</b> : Structure d'un follicule antral canin ( <i>Photographie</i> : Sylvie Chastant).....	29
<b>Figure 3</b> : Coupe histologique d'un follicule polyovocytaire de chien au stade préantral contenant deux ovocytes (coloration hématoxyline/éosine) (d'après Viaris de Lesegno, 2007) .....	31
<b>Figure 4</b> : Projections transzonales d'un ovocyte canin (d'après De la Villeon, 2007).....	34
<b>Figure 5</b> : Jonctions gap (d'après Kidder et Vanderhyden, 2011).....	34
<b>Figure 6</b> : Modèle schématisant la régulation du relargage de facteurs paracrines à l'interface ovocyte-granulosa (d'après Albertini <i>et al.</i> , 2001).....	36
<b>Figure 7</b> : Structure chimique de GDF-9 et BMP-15 (D'après McIntosh <i>et al.</i> , 2012).....	39
<b>Figure 8</b> : Voie de signalisation des TGF- $\beta$ (Massegué et Chen, 2000) .....	40
<b>Figure 9</b> : Structures ovariennes observées et palpées à la surface de l'ovaire selon le stade du cycle œstral.....	48
<b>Figure 10</b> : Principe de l'immunohistochimie utilisée (d'après <a href="http://crn2m.univ-mrs.fr/IMG/pdf/TD_imagerie_OB_06-07.pdf">http://crn2m.univ-mrs.fr/IMG/pdf/TD_imagerie_OB_06-07.pdf</a> ) .....	50
<b>Figure 11</b> : Follicules canins à différentes étapes de croissance (avec immunomarquage).....	53
<b>Figure 12</b> : Notation de l'intensité de l'immunomarquage dans les ovocytes.....	55
<b>Figure 13</b> : Notation de l'intensité de l'immunomarquage dans les cellules folliculaires.....	56
<b>Figure 14</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 selon le stade de croissance folliculaire .....	61
<b>Figure 15</b> : Marquage pour le facteur BMP-15 selon le stade de croissance folliculaire.....	63
<b>Figure 16</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les ovocytes en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire.....	65
<b>Figure 17</b> : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire.....	66
<b>Figure 18</b> : Marquage pour le facteur BMP-15 dans les ovocytes en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire.....	68
<b>Figure 19</b> : Marquage pour le facteur BMP-15 dans les follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire.....	69



## ***TABLEAUX***

<b>Tableau 1</b> : Classification des ovaires selon les structures ovariennes observées à la surface de l’ovaire (observation macroscopique) et le niveau de progestérone sérique.....	47
<b>Tableau 2</b> : Méthode d’inclusion des ovaires avec processeur automatique.....	49
<b>Tableau 3</b> : Méthode de déparaffinage des lames.....	50
<b>Tableau 4</b> : Calcul des différences des densités intégrées pour les catégories Fort, Moyen, Faible d’immunomarquage.....	54
<b>Tableau 5</b> : Répartition des follicules examinés en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire pour le facteur GDF-9.....	58
<b>Tableau 6</b> : Répartition des follicules examinés en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire pour le facteur BMP-15.....	58



# ABRÉVIATIONS

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ALK 5** : Anaplastic Lymphoma Kinase 5  
**ALK6** : Anaplastic Lymphoma Kinase 6  
**AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
**ARNm** : Acide RiboNucléique messenger  
**BAX** : BCL2-associated X protein  
**BCL2** : B-cell CLL/lymphoma 2  
**BMP-15** : Bone Morphogenetic Protein-15  
**BMPRIB** : Bone Morphogenetic Protein Receptor IB  
**BMPRII** : Bone Morphogenetic Protein Receptor II  
**BSA** : Bovine Serum Albumin  
**CAPS3** : Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase  
**CASP2** : Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase  
**COX-2** : CycloOXygenase 2  
**Cx37** : Connexine 37  
**Cx43** : Connexine 43  
**DAB** : 3-3'DiAminoBenzidine  
**EBS** : Estrous Bitch Serum  
**eCG** : equine Chorionic Gonadotropin  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**ELISA** : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
**FBS** : Fetal Bovine Serum  
**FIGLA** : Folliculogenesis specific basic helix-loop-helix  
**FIV** : Fécondation In Vitro  
**FOXO3** : Forkhead box O3  
**FSH** : Follicle Stimulating Hormone  
**GCNF** : Germ Cell Nuclear Factor  
**GDF-9** : Growth Differentiation Factor-9  
**GVBD** : Germinal Vesicle BreakDown  
**HAS-2** : Hyaluronan Synthase 2  
**hCG** : human Chorionic Gonadotropin  
**HRP** : HorseRadish Peroxidase

**IL1A** : Interleukin 1 alpha  
**KITL** : KIT-Ligand  
**LH** : Luteinizing Hormone  
**LHR** : Luteinizing Hormone Receptor  
**LHX8** : LIM homeobox 8  
**LIF** : Leukemia Inhibitory Factor  
**MIV** : Maturation ovocytaire In Vitro  
**NOBOX** : NOBOX oogenesis homeobox  
**PBS** : Phosphate Buffered Saline  
**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog  
**SOF** : Synthetic Oviductal Fluid  
**SOHLH1** : Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1  
**SOHLH2** : Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2  
**TCM 199** : Tissue Culture Medium 199  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor- $\beta$   
**TGF $\beta$ RI** : Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor I  
**UICN** : Union Internationale pour la Conservation de la Nature  
**uPA** : urokinase Plasminogen Activator





# INTRODUCTION

L'espèce canine, malgré sa grande importance sociale, reste certainement l'espèce domestique dont les techniques de reproduction assistée sont les moins avancées. La recherche fondamentale en reproduction canine s'est développée depuis seulement une trentaine d'années, et les connaissances actuelles restent limitées par rapport aux autres espèces. Ce retard s'explique d'une part par le faible nombre d'équipes dans le monde travaillant dans ce domaine, en comparaison avec celles travaillant sur les espèces destinées à la consommation humaine, et d'autre part par les obstacles biologiques rencontrés, liés aux spécificités de l'ovocyte canin.

Le développement de techniques de reproduction assistée chez le chien aurait pourtant de nombreux intérêts. En effet, en plus de sa grande importance sociale, le chien a un intérêt croissant de modèle de recherche dans l'étude de maladies génétiques humaines. Plus de 370 maladies génétiques canines sont similaires à des maladies chez l'Homme (Patterson *et al.*, 1982 ; Ostrander *et al.*, 2000 ; Ostrander et Kruglyak, 2000 ; Patterson, 2000 ; Kirkness *et al.*, 2003), et il s'avère important de maintenir ces génotypes canins afin de les étudier. Les techniques de reproduction assistée, en particulier de production et transfert d'embryon, permettraient d'atteindre plus facilement cet objectif.

Ces techniques de reproduction assistée pourraient également être appliquées dans des programmes de sauvegarde d'espèces de Canidés menacées d'extinction : actuellement, parmi 35 espèces de Canidés, 10 sont menacées d'extinction (UICN, 2015). La reproduction assistée permettrait d'améliorer la gestion génétique des populations devenues rares (Wildt et Roth, 1997 ; Pope, 2000 ; Pukazhenthil et Wildt, 2004).

Jusqu'à présent, aucune étude n'a rapporté la naissance d'un chiot après maturation puis fécondation *in vitro*. En effet, l'ovocyte canin présente des particularités uniques parmi les ovocytes des autres espèces mammifères étudiés qui constituent un obstacle pour la réalisation de la maturation *in vitro*. Une de ces particularités est d'être ovulé au stade prophase I et de n'atteindre le stade métaphase II qu'après une période de 48-72 heures passée dans l'oviducte (Tsutsui et Shimizu, 1975). Les processus de cette maturation ovocytaire retardée sont méconnus à ce jour. Or l'ovocyte canin, comme celui des autres espèces mammifères, n'est fécondable qu'au stade métaphase II (Reynaud *et al.*, 2005). Une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant la folliculogénèse, la croissance et la maturation de l'ovocyte canin est donc nécessaire afin de développer des techniques de reproduction assistée chez le Chien.

Les facteurs de croissance GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*) et BMP-15 (*Bone Morphogenetic Protein-15*) jouent un rôle important dans la croissance folliculaire et la maturation de l'ovocyte chez plusieurs espèces de mammifères. Toutefois, les recherches sur ces facteurs chez le chien sont encore très limitées, et leur rôle chez cette espèce reste méconnu.

Dans cette thèse, nous présenterons tout d'abord les particularités de la reproduction et de l'ovocyte canin dans le contexte de la reproduction assistée chez la chienne, ainsi que les rôles des facteurs GDF-9 et BMP-15 chez les autres espèces.

L'objectif de l'étude expérimentale présentée par la suite porte sur la localisation des facteurs de croissance GDF-9 et BMP-15 dans les cellules folliculaires et les ovocytes au cours de la folliculogénèse chez la chienne et sur les variations d'expression selon le stade folliculaire et le stade du cycle œstral.

**PREMIERE PARTIE :  
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les particularités de la reproduction et de l'ovocyte de la chienne  
dans le cadre de la reproduction assistée

Les facteurs de croissance GDF-9 et BMP-15



# I. LA MATURATION *IN VITRO* CHEZ LA CHIENNE

La maturation *in vitro* (MIV) constitue l'étape limitante pour le développement de techniques de reproduction assistée chez la chienne. En effet, peu d'ovocytes parviennent à atteindre le stade Métaphase II après la phase de culture *in vitro*, et les mécanismes de la maturation de l'ovocyte canin sont actuellement méconnus, limitant les avancées dans le domaine.

Par conséquent, les autres techniques nécessitant une étape de MIV comme la fécondation *in vitro* (FIV) ont aussi rencontré un succès limité. Une étude rapporte la production d'un unique blastocyte après une insémination *in vitro* de plus de 200 ovocytes (Otoi *et al.*, 2000b), et une autre décrit une gestation non menée à terme après le transfert de 90 zygotes à une chienne receveuse deux jours après FIV (England *et al.*, 2001), mais aucun chiot jusqu'à présent n'est né de MIV.

Seule une étude rapporte la naissance de 7 chiots nés de FIV (Nagashima *et al.*, 2015), mais les embryons obtenus proviennent d'ovocytes maturés *in vivo*.

## 1. Essais de MIV et taux de réussite

La première étude de maturation *in vitro* et de fécondation *in vitro* d'ovocytes de chiennes a été réalisée en 1976 (Mahi et Yanagimachi, 1976). Dans cette étude, seulement 25% des ovocytes, prélevés dans l'ovaire à plusieurs stades du cycle œstral, ont été capables de reprendre la méiose et d'atteindre le stade métaphase I ou II après 72 heures de culture *in vitro*.

Depuis cette étude, peu de progrès ont été faits et en moyenne seulement 20% des ovocytes finissent leur maturation *in vitro*. Le taux de réussite varie entre 0 et 32% (Yamada *et al.*, 1992, 1993 ; Bolamba *et al.*, 1998, 2002 ; Hewitt et England, 1999a,b ; Otoi *et al.*, 1999, 2000a,b, 2001, 2002 ; Luvoni *et al.*, 2001, 2002, 2003 ; Saint-Dizier *et al.*, 2001a,b ; Songsasen *et al.*, 2002, 2003b ; Rodrigues et Rodrigues, 2003a,b ; Kim *et al.*, 2004, 2005 ; Rodrigues *et al.*, 2004 ; De Los Reyes *et al.*, 2005).

Le taux de réussite en MIV chez la chienne, c'est-à-dire le taux d'ovocytes qui atteignent le stade métaphase II, reste bas en comparaison avec ceux obtenus chez d'autres espèces domestiques, pour lesquelles la reprise de méiose ovocytaire du stade Prophase I au stade métaphase II a lieu 12 à 48 heures avant l'ovulation dans le follicule pré-ovulatoire. Chez la vache, 65 à 97% des ovocytes prélevés dans des follicules pré-ovulatoires atteignent le stade métaphase II après 24 heures de culture (Lonergan *et al.*, 1996). Chez le porc (Singh *et al.*, 1997 ; Prochazka *et al.*, 2000), 80 à 95% des ovocytes atteignent le stade métaphase II après 44 heures de culture, et 59 à 84% des ovocytes après 24 heures de culture chez la brebis (Guler *et al.*, 2000).

Différentes tentatives ont été réalisées afin d'améliorer ce faible taux de réussite chez la chienne, comme la supplémentation du milieu de culture, la durée de culture, le stade folliculaire et l'étape du cycle œstral au moment du prélèvement.

## 2. Influence du milieu de culture

Différents milieux et supplémentations ont été testés afin d'améliorer les résultats de MIV chez la chienne.

Trois milieux de culture principaux ont été utilisés : TCM 199, SOF (*Synthetic Oviductal Fluid*) et CMRL1066.

Le milieu SOF ne semble pas présenter de supériorité par rapport au milieu TCM 199. Dans l'étude de Hewitt et England (1999b), il n'y a pas de différence significative entre le taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II après 48h de culture dans le milieu TCM 199 (6%) et le milieu SOF complétement en BSA (*Bovine Serum Albumin*) (5-7%). On retrouve des résultats similaires dans l'étude de Rota et Cabianca (2004), avec 1,3% d'ovocytes atteignant le stade métaphase II après 72 heures de culture dans le milieu TCM 199 et 0% d'ovocytes pour le milieu SOF, sans différence significative. Le milieu TCM 199 est en revanche plus bénéfique que le milieu CMRL1066, avec 16% d'ovocytes atteignant le stade métaphase II avec TCM 199 contre 1% avec CMRL1066 (Songsasen *et al.*, 2002).

Finalement, le taux de réussite en MIV reste très bas quel que soit le milieu utilisé.

L'influence de la complémentation du milieu en protéines, comme la BSA, le FBS (*Fetal Bovine Serum*), l'EBS (*Estrous Bitch Serum*), sur le taux de réussite en MIV a également été étudiée et donne des résultats contradictoires selon les études (Hewitt *et al.*, 1998 ; Otoi *et al.*, 1999 ; Bolamba *et al.*, 2002 ; Songsasen *et al.*, 2002 ; Rodrigues et Rodrigues, 2003a).

La complémentation du milieu en hormones comme les gonadotropines, l'œstradiol ou la progestérone ne montre pas non plus de résultats concluants. Kim *et al.* (2005) montrent que la supplémentation du milieu avec de l'œstradiol-17 $\beta$  ou de la progestérone permet d'augmenter significativement le taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II (14,7% et 10% respectivement versus 1,5-8%). Au contraire, Willingham-Rocky *et al.* (2003) ne montrent pas de différence significative lors de la supplémentation du milieu en progestérone (14,7% versus 8,4-10,7%). Concernant l'ajout de LH (*Luteinizing Hormone*) dans le milieu, Hewitt *et al.* (1998) ne montrent pas d'amélioration significative, tandis que Songsasen *et al.* (2002) obtiennent une diminution du taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II (2% versus 16% sans supplémentation).

La complémentation du milieu en facteurs de croissance comme l'EFG (*Epidermal Growth Factor*), connu pour avoir un effet bénéfique sur la maturation ovocytaire chez d'autres espèces, a également été testée. Les résultats sont contradictoires (Rota et Cabianca, 2004 ; Kim *et al.*, 2004) : Kim *et al.* démontrent un effet bénéfique de l'EGF avec 13% d'ovocytes atteignant le stade métaphase II contre 3% en l'absence de supplémentation, tandis

que Rota et Cabianca ne montrent pas de différence significative, avec un taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II compris entre 0% et 1,3%.

Certaines équipes ont tenté de cultiver les ovocytes de chienne *in vitro* en présence de cellules de l'oviducte ou dans un milieu de culture de composition conçue pour être proche du fluide de l'oviducte (SOF) (Hewitt et England, 1999b ; Bolamba *et al.*, 2002 ; Rota et Cabianca, 2004). En effet, c'est au sein de l'oviducte que l'ovocyte atteint *in vivo* le stade métaphase II et que le développement embryonnaire a lieu jusqu'au stade blastocyste chez la chienne (Renton *et al.*, 1991). Cependant, le taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II avec ce milieu de culture reste très bas : 2 à 6% après 48 heures de culture. Effectuer la culture dans un oviducte de chienne ligaturé ne semble pas non plus avoir d'effet améliorateur (Luvoni *et al.*, 2003).

Une étude récente (Apparicio *et al.*, 2016) a évalué l'effet d'une co-culture d'ovocytes de chiennes avec des spermatozoïdes afin de voir si la présence de spermatozoïdes pouvait être un facteur déclenchant de la reprise de la méiose puis de sa poursuite jusqu'au stade métaphase II. Cependant, la co-incubation n'a eu aucun de ces deux effets, avec 15% d'ovocytes atteignant le stade métaphase II. En revanche, la pénétration des spermatozoïdes dans les ovocytes induit la reprise de méiose (Saint-Dizier *et al.*, 2001a) : après 72 heures de culture, le taux d'ovocytes ayant dépassé le stade métaphase I est significativement plus important pour les ovocytes fécondés (28,3% en métaphase I et II, versus 10,2% pour les ovocytes sans spermatozoïdes).

Cependant, le taux de réussite de MIV reste ainsi bas quel que soit le milieu de culture utilisé.

### **3. Influence de la durée de culture**

L'ovocyte de la chienne nécessite 48 à 72 heures pour achever sa maturation *in vivo* au sein de l'oviducte (Tsutsui, 1989 ; Reynaud *et al.*, 2005).

Après 24 heures de culture, certains ovocytes atteignent déjà le stade métaphase II, entre 1,7 et 9% selon les études (Yamada *et al.*, 1992, 1993 ; Saint-Dizier *et al.*, 2004). En augmentant le temps de culture à 48 heures, un plus grand nombre d'ovocytes achève leur maturation (10-27%), mais au-delà de 48 heures de culture, aucune augmentation du nombre total d'ovocytes en métaphase II n'est observée (Robertson *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1992, 1993 ; Nickson *et al.*, 1993 ; Songsasen *et al.*, 2003 ; Saint-Dizier *et al.*, 2004) et on assiste même à une augmentation du nombre d'ovocytes en dégénérescence (Nickson *et al.*, 1993 ; Luvoni *et al.*, 2003 ; Songsasen *et al.*, 2003b).

Ainsi, la durée de culture optimale pour la maturation *in vitro* des ovocytes canins semble être de 48 heures.

#### 4. Influence du stade du cycle œstral et du stade de folliculogénèse

L'effet du stade du cycle œstral de la chienne lors du prélèvement des ovocytes et celui du stade de folliculogénèse sur le taux de réussite de MIV ont aussi été étudiés.

La plupart des études ont été réalisées sur des follicules antraux. Bolamba *et al.* (1998, 2002) se sont eux intéressés aux follicules pré-antraux et aux stades précoces des follicules antraux. Le taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II est d'environ 10%, ce qui reste bas et proche des valeurs obtenues avec des follicules antraux.

Pour des ovocytes prélevés dans des follicules pré-ovulatoires chez des chiennes en œstrus ayant subi un traitement de superovulation à base d'eCG (*equine Chorionic Gonadotropin*)-hCG (*human Chorionic Gonadotropin*), le taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II est de 32% (Yamada *et al.*, 1992). Pour des ovocytes prélevés chez des chiennes en anœstrus par la même équipe, le taux d'ovocytes atteignant le stade métaphase II est de 14% (Yamada *et al.*, 1993). Inversement, d'autres études, qui comparent le taux de réussite de MIV entre chaque stade du cycle œstral, montrent qu'il n'y a pas d'effet du stade du cycle œstral sur le taux de réussite (Hewitt et England, 1997 ; Rodrigues et Rodrigues, 2003a,b).

Les résultats obtenus chez la chienne ne sont ainsi pas à la hauteur de ce que l'on pourrait espérer obtenir en comparaison avec les résultats observés chez d'autres espèces. Chez les bovins par exemple (Lonergan *et al.*, 1994), pour des ovocytes provenant de follicules antraux de grande taille, le taux d'ovocytes maturés et fécondés *in vitro* atteignant le stade blastocyte est de 65,9%, contre 34,3% pour des ovocytes provenant de follicules antraux de stade moins avancé.

Ainsi, quel que soit le stade du cycle œstral ou de folliculogénèse, le taux de réussite de MIV reste relativement bas chez la chienne. Nous allons voir par la suite quelles sont les particularités de l'ovocyte canin qui peuvent en être la cause.

## II. LES PARTICULARITÉS DE LA REPRODUCTION ET DE L'OVOCYTE DE LA CHIENNE

### 1. Particularités du cycle œstral

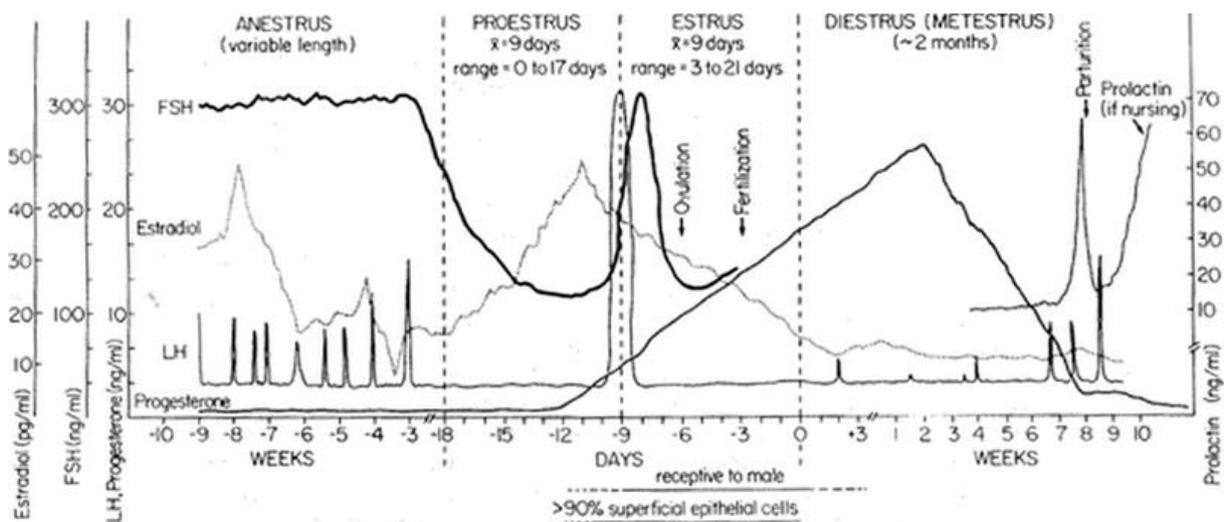
La chienne est une femelle à reproduction non saisonnée, à cycle mono-œstrien à ovulation spontanée qui ovule une à deux fois par an à 5-12 mois d'intervalle (Concannon *et al.*, 1989). Seuls les chiens de race Basenji sont saisonnés, avec un œstrus apparaissant en période de photopériode croissante (à l'inverse du loup).

Le cycle œstral de la chienne se divise en quatre étapes.

La phase de proœstrus, de durée variable (0-17 jours, 9 jours en moyenne), est caractérisée par un gonflement vulvaire et des écoulements sanguins. La femelle attire les mâles mais refuse l'accouplement (Chastant-Maillard *et al.*, 2014). Cette phase se termine par la survenue du pic de LH qui va déclencher l'ovulation.

La phase d'œstrus, elle aussi de durée variable (3 à 21 jours, 9 jours en moyenne), se caractérise cliniquement par des écoulements qui deviennent moins sanguins et par l'acceptation du coït. Proœstrus et œstrus correspondent aux « chaleurs ».

Chez la chienne, une des particularités du cycle œstral est que le comportement œstral et l'œstrus ont lieu en présence d'un faible taux d'œstrogènes circulants et d'une concentration élevée en progestérone (Wildt *et al.*, 1979 ; Figure 1), alors que chez les autres mammifères, cette phase a lieu en absence d'un taux significatif de progestérone circulante.



**Figure 1** : Endocrinologie du cycle œstral chez la chienne (Olson et Husted, 1986)

Après l'ovulation, la phase de diœstrus correspond à la phase de sécrétion de progestérone par les corps jaunes. La gestation, si elle a lieu, dure  $63 \pm 1$  jours (depuis l'ovulation) (Chastant-Maillard *et al.*, 2014). A la fin du diœstrus, les corps jaunes fonctionnels déclinent (Concannon *et al.*, 1989 ; Johnston *et al.*, 2001). Chez la chienne gestante, on assiste à une chute brutale de progestérone avant la mise-bas. En revanche, chez la chienne non gestante, la chute de la progestéronémie est beaucoup plus lente (jusqu'à 80 jours post-ovulation), avec un diœstrus ainsi plus long que celui des chiennes gravides (Chastant-Maillard *et al.*, 2014).

La lutéolyse conduit à une phase d'anœstrus d'environ 90 jours, qui ne correspond pas à une période d'inactivité ovarienne complète puisque des follicules y atteignent le stade antral (Chastant-Maillard *et al.*, 2014).

La durée moyenne de l'interœstrus est ainsi de 6-7 mois, avec de grandes variations (4 à 13 mois) à la fois entre chiennes et entre chaleurs d'une même chienne (Chastant-Maillard *et al.*, 2014).

## **2. Particularités de la période périovulatoire**

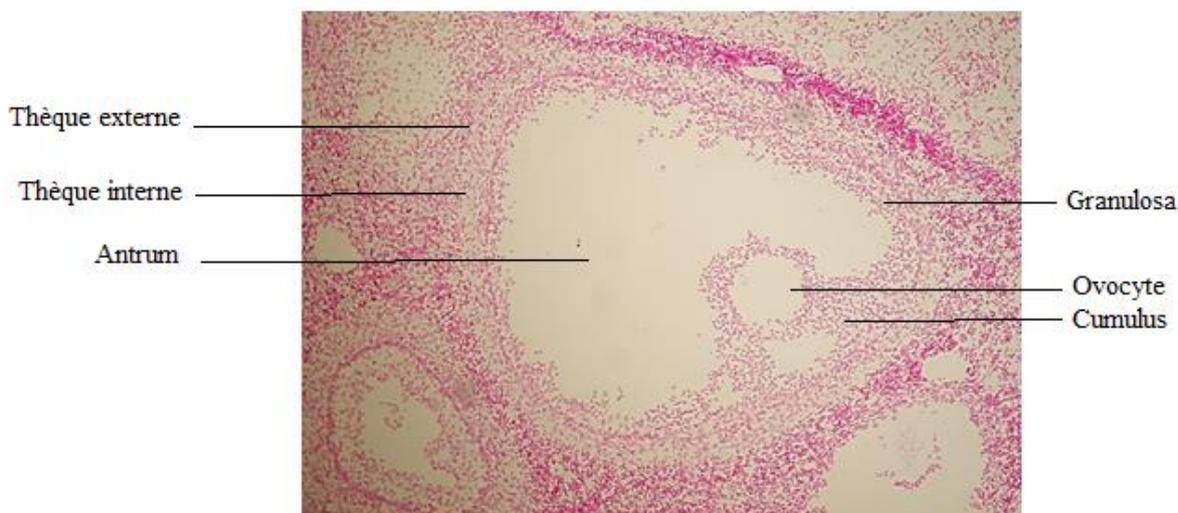
### *A. Avant l'ovulation : la lutéinisation pré-ovulatoire*

Une des particularités de la reproduction de la chienne est la lutéinisation pré-ovulatoire des follicules.

Les follicules canins en phase de croissance terminale (Figure 2) acquièrent les récepteurs à LH dans les cellules de la granulosa beaucoup plus précocement que ce que l'on observe dans les autres espèces. Des sites de liaison à LH peuvent être détectés dès 800  $\mu\text{m}$  de diamètre, soit environ un quart du diamètre à l'ovulation, alors que classiquement, ils n'apparaissent qu'une fois la moitié du diamètre ovulatoire atteint dans les autres espèces (Saint-Dizier *et al.*, 2008).

La lutéinisation chez la chienne débute plusieurs jours avant le pic de LH, donc avant l'ovulation, en parallèle de l'augmentation progressive de la concentration circulante en LH. Chez les autres mammifères, la lutéinisation débute uniquement suite au pic de LH (Concannon, 2009).

Chez la chienne, le taux circulant de progestérone est ainsi de l'ordre de 2 ng/ml au moment du pic de LH et de 6 ng/ml lors de l'ovulation, en moyenne 48 heures plus tard. Le suivi du taux de progestérone permet donc dans cette espèce de déterminer le moment de l'ovulation afin de décider du moment de la saillie ou de l'insémination (Chastant-Maillard *et al.*, 2014).



**Figure 2 : Structure d'un follicule antral canin**  
 (Photographie : Sylvie Chastant)

### B. Ovulation

Chez la chienne, le pic de LH est de très longue durée : 36 à 80 heures, contre 6-10 heures chez la vache (de Gier *et al.*, 2006). L'ovulation intervient 36 à 50 heures après le pic de LH, mais pour une même chienne, les ovulations des différents follicules peuvent s'étaler sur 24 à 36 heures (Concannon, 2009). Le taux d'ovulation (nombre de follicules ovulés/nombre de follicules de taille pré-ovulatoire) est de l'ordre de 95 à 100 % (England *et al.*, 2009).

La reprise de méiose ovocytaire est définie comme l'ensemble des modifications chromosomiques et cytologiques qui accompagnent la sortie de la phase de blocage en prophase I jusqu'au blocage suivant en métaphase II. Chez la plupart des mammifères, la reprise de méiose ovocytaire est induite au sein du follicule pré-ovulatoire 12 à 48 heures avant l'ovulation par le pic pré-ovulatoire de LH (Chastant-Maillard *et al.*, 2014).

La particularité majeure qui distingue la reproduction canine de celle des autres femelles mammifères est la libération à l'ovulation d'un ovocyte au stade prophase I de méiose. Cet ovocyte atteindra le stade métaphase II seulement après une période de 48-72 heures passée dans l'oviducte (Tsutsui et Shimizu, 1975).

Le pic de LH a plusieurs actions sur le follicule pré-ovulatoire. Il semble exercer une action sur le noyau ovocytaire chez la chienne, avec le passage de la chromatine d'une configuration diffuse à une forme compacte, toujours au stade prophase I (Reynaud *et al.*, 2009). Le pic de LH semble aussi être la cause directe de l'expansion du cumulus qui a lieu, comme pour les autres mammifères, quelques heures après le pic de LH. Cependant, cette expansion chez la chienne ne touche pas les 2 à 3 couches cellulaires les plus proches de la zone pellucide, qui restent en contact étroit avec la zone pellucide et le cytoplasme ovocytaire pendant 2 à 3 jours après l'ovulation (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008). Cette observation

conduit à suspecter que les cellules du cumulus chez la chienne pourraient jouer un rôle dans le retard de reprise de la méiose (Chastant-Maillard *et al.*, 2014).

### C. Après l'ovulation : la maturation ovocytaire intratubaire

Juste après l'ovulation, les ovocytes canins migrent rapidement dans la partie distale de l'oviducte où ils restent jusqu'à 8-10 jours après ovulation contre 3-4 jours chez les autres mammifères, et ils sont encore au stade prophase I jusqu'à 44 heures après l'ovulation. À partir de 48 heures post-ovulation, certains reprennent leur méiose et les premiers ovocytes fécondables, au stade métaphase II, apparaissent vers 48-54 heures après l'ovulation (Tsutsui et Shimizu, 1975 ; Reynaud *et al.*, 2005).

Les mécanismes contrôlant la reprise de la méiose de l'ovocyte de chienne sont actuellement inconnus.

Dans le modèle classique des femelles mammifères, l'AMPc (*Adénosine MonoPhosphate cyclique*) est le médiateur de la reprise de la méiose. Les cellules de la granulosa, en contact avec l'ovocyte par des projections cytoplasmiques transzonales, maintiennent une concentration d'AMPc élevée dans le cytoplasme ovocytaire responsable de l'inhibition de la reprise de la méiose. Après le pic de LH, les projections transzonales se rétractent et la concentration intra-ovocytaire d'AMPc chute, autorisant la condensation de l'ADN et la reprise de la méiose (Chastant-Maillard *et al.*, 2014). Des observations en microscopie électronique à transmission ont montré que les projections transzonales dégénèrent plus tardivement après le pic de LH chez la chienne que chez les autres mammifères (3-4 jours), mais que la reprise de méiose est bien associée à leur dégénérescence (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008).

Le rôle de l'AMPc reste controversé chez la chienne (Songsasen *et al.*, 2003).

Le retard à la reprise de la méiose pourrait être dû à l'absence dans le cytoplasme ovocytaire de certains facteurs, que l'ovocyte devrait soit capter à partir du liquide tubaire, soit synthétiser lui-même. En effet, à la différence des autres espèces, la transcription se réactive dans le nucléole et le noyau pour une courte période quelques heures avant la reprise de méiose, autour de 27-33 heures après l'ovulation (Viaris de Lesegno *et al.*, 2009).

On peut également s'interroger sur le rôle joué par la progestérone. En effet, la concentration circulante en progestérone est très élevée au moment de la reprise de la méiose chez la chienne par rapport à celle observée chez les autres femelles mammifères (20 ng/ml au lieu de quelques picogrammes) et le complexe cumulo-ovocytaire possède des récepteurs à la progestérone (Goncalves *et al.*, 2009). De plus, l'administration *in vivo* d'un antagoniste de la progestérone (aglépristone) juste avant le pic de LH entraîne un retard de 3 à 4 jours dans la reprise de méiose et cette reprise concerne une faible proportion d'ovocytes par rapport aux chiennes témoins (41 vs 100 %) (Reynaud *et al.*, 2015).

### 3. Les follicules polyovocytaires

Une autre particularité de l'ovocyte chez la chienne est la forte prévalence de follicules polyovocytaires (Figure 3). Ces follicules peuvent contenir 2 à 17 ovocytes (Andersen *et al.*, 1973 ; Telfer et Gosden, 1987 ; McDougall *et al.*, 1997).

La prévalence des follicules polyovocytaires est nettement supérieure chez la chienne à ce que l'on peut observer chez d'autres espèces : jusqu'à 14% des follicules d'un ovaire peuvent être polyovocytaires chez la chienne contre 4% chez le chat, 3% chez l'Homme et 2% chez le singe rhésus (Telfer et Gosden, 1987).



**Figure 3** : Coupe histologique d'un follicule polyovocytairien de chien au stade préantral contenant deux ovocytes (coloration hématoxyline/éosine) (d'après Viaris de Lesegno, 2007)

Certaines mutations génétiques augmentent l'incidence des follicules polyovocytaires, notamment les mutations touchant le récepteur à FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) (Yang *et al.*, 2003), à BMP-15 (*Bone Morphogenetic Protein-15*), à GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*) (Yan *et al.*, 2001) et à GCNF (*Germ Cell Nuclear Factor*) en relation avec l'expression aberrante de BMP-15 et GDF-9 (Lan *et al.*, 2003).

L'origine des follicules polyovocytaires est actuellement inconnue. Trois hypothèses sont retenues : la division d'un ovocyte polynucléaire, la fusion de plusieurs follicules ou la non séparation de plusieurs ovocytes au moment de la formation des follicules primordiaux. Les deux dernières hypothèses sont considérées comme les plus probables actuellement (Luvoni *et al.*, 2005 ; Reynaud *et al.*, 2010).

Une des questions concernant les follicules polyovocytaires est celle de leur fonctionnalité : ces follicules sont-ils capables de permettre aux ovocytes d'entreprendre leur maturation jusqu'à l'ovulation ? Si oui, combien d'ovocytes seront de bonne qualité et aptes à être fécondés ? Dans l'espèce canine, plusieurs auteurs ont montré que certains follicules pré-ovulatoires étaient polyovocytaires (Andersen *et al.*, 1973 ; Reynaud *et al.*, 2009) et deux travaux ont décrit un nombre supérieur d'ovocytes ou d'embryons récoltés par rapport au nombre de corps jaunes (Bysted *et al.*, 2001 ; Reynaud *et al.*, 2005). Cela laisse supposer que certains follicules ayant ovulé étaient polyovocytaires, bien que cette évaluation puisse être biaisée par les techniques d'obtention des ovocytes et de comptage.

Au sein des follicules polyovocytaires, les ovocytes peuvent être à différents stades de développement (Barber *et al.*, 2001). Ils présentent des critères morphologiques (diamètre, couleur du cytoplasme) et fonctionnels (degré d'expansion du cumulus) différents (Reynaud *et al.*, 2009). Dans la majorité des cas, un des ovocytes apparaît de meilleure qualité (Reynaud *et al.*, 2009). Il semble que les cellules de la granulosa soient au même stade de développement que le plus développé des ovocytes (Hartman *et al.*, 1926).

D'après une étude réalisée chez le lapin (Al-Mufti *et al.*, 1988), la taille de l'ovocyte serait liée à sa position dans le follicule : les ovocytes situés au centre seraient plus gros, capables de reprendre leur méiose et avec une expansion du cumulus normale, tandis que les ovocytes en périphérie sont plus petits, se développent moins vite et ne montrent un cumulus que partiellement expansé.

Ces caractéristiques étonnent les chercheurs : comment expliquer une telle variabilité de qualité et de capacité de croissance entre des ovocytes qui baignent dans le même fluide folliculaire au stade antral ? Des hypothèses concernant des phénomènes de compétition pour les nutriments ou l'expression de certaines molécules intervenant dans le dialogue ovocyte-cumulus ont été proposées (Kennedy, 1924). À ce jour, les facteurs responsables de la sélection intrafolliculaire d'un seul ovocyte parmi les nombreux ovocytes présents dans un même follicule restent inconnus.

Nous allons voir à présent l'importance du dialogue entre l'ovocyte et les cellules folliculaires qui l'entourent, afin d'assurer le bon développement de la folliculogénèse et de l'ovogénèse.

### **III. LA COMMUNICATION OVOCYTE-GRANULOSA**

#### **1. Importance de la communication ovocyte-granulosa**

La communication ovocyte-granulosa est essentielle autant pour le développement de l'ovocyte que pour celui des cellules folliculaires qui l'entourent.

Une étude consistant à réaliser une oocytectomie dans des follicules antraux a mis en évidence une évolution de ceux-ci en corps jaunes au bout de 3 jours, puis une dégénérescence des cellules folliculaires au bout de 8 jours (El-Fouly *et al.*, 1970). Vanderhyden *et al.* (1993) ont montré que des complexes cumulus-ovocytes ayant subi une oocytectomie produisent plus de progestérone et moins d'œstradiol que les complexes cumulus-ovocytes normaux. Ces résultats indiquent que l'ovocyte contribue à l'inhibition de la lutéinisation des cellules de la granulosa et régule la synthèse de progestérone et d'œstradiol par ces cellules.

De plus, un ovocyte cultivé en l'absence de cellules folliculaires, même s'il est cultivé en présence d'un autre type cellulaire somatique (fibroblastes par exemple), est incapable de se développer (Cecconi et Colonna, 1996). L'ovocyte est donc dépendant de la présence de cellules de la granulosa pour se développer.

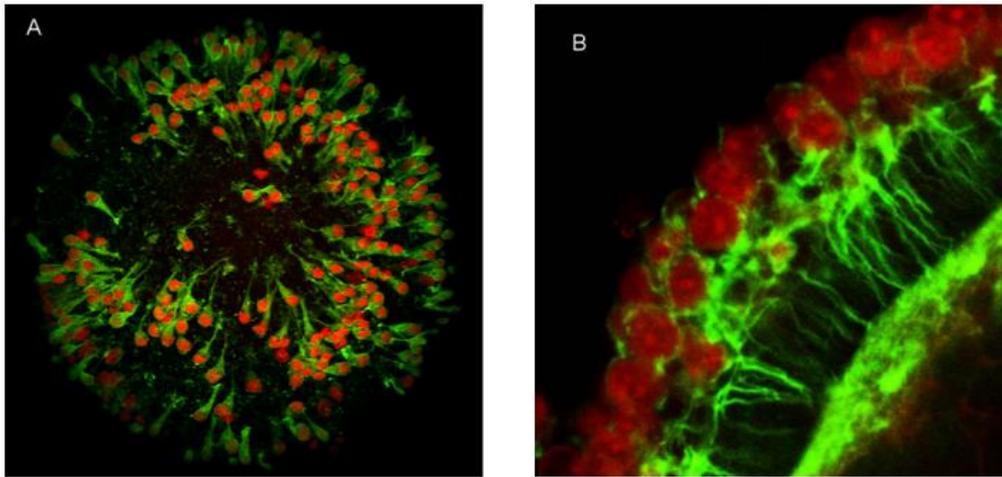
#### **2. Modalités de la communication ovocyte-granulosa**

Plusieurs acteurs interviennent dans la communication ovocyte-granulosa. Les projections transzonales et les jonctions gap permettent les échanges entre ces deux types cellulaires, notamment les échanges de facteurs paracrines qui jouent un rôle clé dans le dialogue ovocyte-granulosa.

##### *A. Projections transzonales*

Les projections transzonales sont des extensions des cellules de la granulosa qui traversent la zone pellucide et viennent au contact de l'ovocyte (Figure 4 ; Hertig et Adams, 1967 ; Anderson et Albertini, 1976).

Le nombre de ces projections varie selon le stade folliculaire chez l'Homme (Motta *et al.*, 1994) : au stade préantral, elles sont très nombreuses, puis leur nombre diminue durant le stade antral jusqu'à une rétraction au cours de l'ovulation.



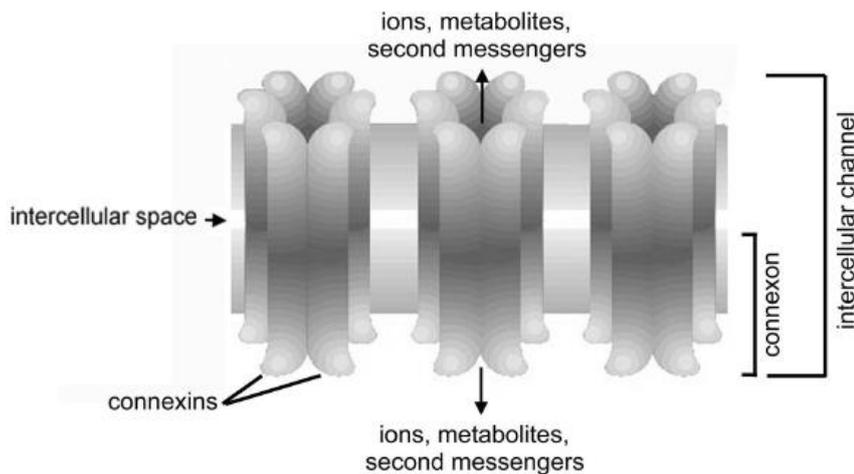
*Vue de la surface du cumulus (A) et vue en coupe transversale (B). Observation en microscopie confocale après coloration de l'ADN (rouge) et de la tubuline (vert). Les projections transzoniales sont visibles entre les cellules de la granulosa et la membrane ovocytaire.*

**Figure 4 : Projections transzoniales d'un ovocyte canin (d'après De la Villeon, 2007)**

### *B. Jonctions gap*

Les jonctions gap sont des canaux membranaires intercellulaires. Elles permettent une communication intercellulaire directe avec le transfert de molécules de faible poids moléculaire (< 1 kD) : ions, acides aminés, métabolites, molécules de signalisation, qui sont nécessaires pour la croissance de l'ovocyte (Kidder et Vanderhyden, 2011).

Les jonctions gap sont formées de deux connexons, qui sont des hexamères de six sous-unités appelées les connexines (Cx) (Figure 5 ; Kidder et Vanderhyden, 2011).



**Figure 5 : Jonctions gap (d'après Kidder et Vanderhyden, 2011)**

Parmi les nombreuses connexines qui existent, seules les connexines 37 (Cx37) et 43 (Cx43) jouent un rôle important dans l'ovogenèse (Kidder et Vanderhyden, 2011).

La connexine 37, produite par l'ovocyte, n'est présente que dans les jonctions gap à la surface de l'ovocyte et permet une communication directe entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa les plus proches (Kidder et Vanderhyden, 2011). Cette connexine semble être particulièrement importante pour le développement folliculaire et ovocytaire. Chez les souris *knock-out* pour le gène codant pour Cx37 (Simon *et al.*, 1997), la folliculogénèse s'arrête au stade préantral, avec une absence de follicules pré-ovulatoires, une absence d'ovulation et un nombre augmenté de corps jaunes. De plus, l'ovocyte ne peut reprendre sa méiose et passer au stade de la rupture de la vésicule germinative (GVBD, *Germinal Vesicle BreakDown*).

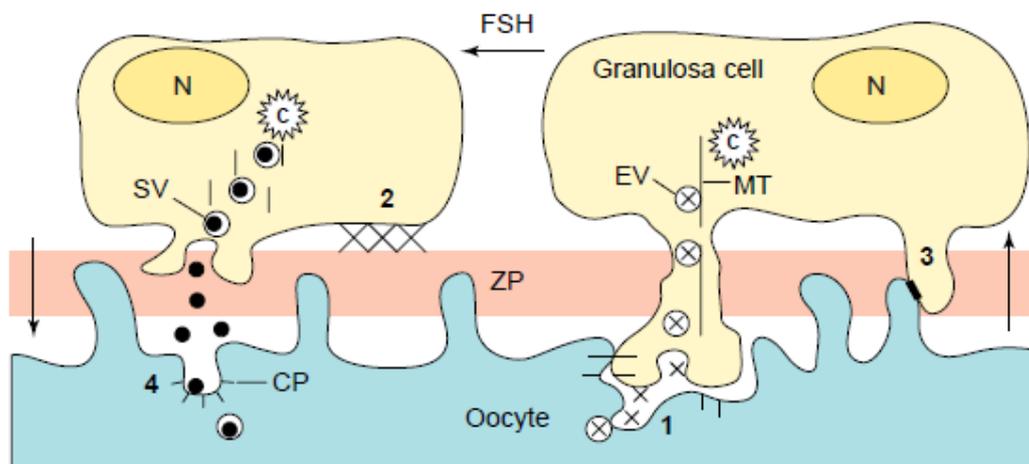
La connexine 43, quant à elle, est présente au niveau des jonctions gap entre les cellules de la granulosa, et en moins grand nombre entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa (Kidder et Mhawi, 2002). Elle joue également un rôle important dans la folliculogénèse et le développement de l'ovocyte. Chez les souris *knock-out* pour le gène codant pour Cx43, le nombre de cellules de la granulosa est fortement réduit et le développement folliculaire s'arrête au stade préantral. L'ovocyte présente également des défauts structuraux, est incompetent pour la reprise méiotique et ne peut être fécondé (Ackert *et al.*, 2001).

Le nombre de jonctions gap varie selon le stade folliculaire. Elles sont détectées dès la formation des follicules primordiaux chez la souris (Mitchell et Burghardt, 1986), et le pic de LH préovulatoire provoque la rupture des jonctions gap présentes entre les cellules de la granulosa chez la souris (Norris *et al.*, 2008).

### C. Facteurs paracrines

Les facteurs paracrines jouent un rôle clé dans le développement ovocytaire et folliculaire. L'existence de ces facteurs a été mise en évidence notamment par Buccione *et al.*, (1990) : pour des complexes cumulus-ovocytes oocyctectomisés, l'expansion des cellules du cumulus n'a pas lieu, sauf en présence d'un milieu conditionné par des ovocytes ou en présence d'ovocytes dénudés. Cette étude révèle l'existence de facteurs solubles synthétisés par l'ovocyte jouant un rôle clé pour les cellules folliculaires.

Le transfert des facteurs paracrines s'effectue selon plusieurs modalités (Figure 6 ; Albertini *et al.*, 2001) : par endocytose, ou via les jonctions gap et les projections transzonales.



N : noyau ; ZP : zone pellucide. Quatre modalités de communication sont décrites. 1 : prélèvement localisé de facteurs en provenance de l'ovocyte (X), par endocytose aux points d'attachement des projections transzonales à la membrane ovocytaire, puis transport dans des vésicules d'endocytose (EV) par un réseau de microtubules (MT). 2 : ancrage de la granulosa à la zone pellucide, nécessaire à l'orientation des projections transzonales. Les zones de contact pourraient jouer un rôle de signal pour les cellules de la granulosa et pour l'ovocyte, et des changements d'adhésion interviendraient en réponse aux changements de composition de la zone pellucide. 3 : jonctions gap, permettant une communication directe entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa. 4 : voie de transmission des facteurs issus des cellules de la granulosa, stockés dans des vésicules sécrétoires (SV). Ces facteurs sont ensuite absorbés par endocytose à travers les fosses tapissées (CP), médiée par des récepteurs situés à la surface de l'ovocyte.

**Figure 6 : Modèle schématisant la régulation du relargage de facteurs paracrines à l'interface ovocyte-granulosa (d'après Albertini *et al.*, 2001)**

### 3. Rôles de la communication ovocyte-granulosa

Les interactions entre les cellules folliculaires et l'ovocyte jouent un rôle important au cours des différents stades de la folliculogénèse.

#### A. Mise en place de la réserve folliculaire

Les facteurs ovocytaires jouent un rôle important pour la mise en place des follicules primordiaux et pour le développement du follicule. L'invalidation du gène codant pour le facteur de transcription ovocytaire FIGLA (*Folliculogenesis specific basic helix-loop-helix*) n'empêche pas la mise en place et la multiplication des ovogonies dans l'ovaire fœtal, mais bloque la formation des follicules primordiaux (Soyal *et al.*, 2000).

Concernant les facteurs d'origine somatique, de nombreux facteurs jouent un rôle essentiel dans la survie des cellules germinales et des follicules primordiaux : les cytokines KITL (*KIT-Ligand*), LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), IL1A (*Interleukin 1 alpha*) ; les facteurs mitochondriaux de la famille BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), BAX (*BCL2-associated X protein*) ; les caspases CASP2 (*Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase*)

et CAPS3 (*Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase*). Leur inactivation, et à l'inverse leur surexpression, modulent de façon très importante le taux d'apoptose des cellules germinales (Morita et Tilly, 1999).

## B. Folliculogénèse

De nombreux facteurs ovocytaires et folliculaires interviennent dans la régulation de la folliculogénèse.

Ces facteurs interviennent notamment dans le contrôle de l'initiation de la folliculogénèse. Les facteurs ovocytaires NOBOX (*NOBOX oogenesis homeobox*), LHX8 (*LIM homeobox 8*), SOHLH1 (*Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1*), SOHLH2 (*Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2*) permettent d'initier le démarrage de la croissance des follicules primordiaux (Choi et Rajkovic, 2006 ; Pangas *et al.*, 2006). Au contraire, les facteurs FOXO3 (*Forkhead box O3*) et PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) inhibent cette reprise de croissance et permettent de maintenir la réserve folliculaire (Castrillon *et al.*, 2003 ; Reddy *et al.*, 2008).

Dès le stade follicule primaire, l'ovocyte exprime et sécrète des facteurs qui stimulent la prolifération des cellules de la granulosa (Monniaux *et al.*, 2009). De plus, les cellules de la granulosa sécrètent des facteurs qui permettent de réguler la croissance folliculaire et ovocytaire. Le facteur KITL joue notamment un rôle important dans la folliculogénèse. Chez la souris, des mutations provoquant une diminution de la quantité de KITL causent une infertilité des souris mutantes, avec un développement folliculaire arrêté au stade primaire (Huang *et al.*, 1993).

## C. Période péri-ovulatoire

La communication ovocyte-granulosa joue un rôle important dans différents aspects de la période péri-ovulatoire.

Elle intervient dans le maintien du blocage de l'ovocyte au stade prophase I de méiose (Buccione *et al.*, 1990 ; Eppig, 1991). Ainsi, des ovocytes de rat entourés de leur cumulus mettent plus longtemps à atteindre le stade GVBD que ceux qui en sont débarrassés (Vanderhyden et Armstrong, 1989). L'AMPc est un des facteurs clés de ce blocage méiotique. Dans le follicule, ce facteur transite des cellules de la granulosa au cumulus et à l'ovocyte par des jonctions gap, et est maintenu à des concentrations élevées dans l'ovocyte (Monniaux *et al.*, 2009). Le pic pré-ovulatoire de LH induit la phosphorylation de la connexine 43 qui forme les jonctions gap, bloquant ainsi le passage d'AMPc et provoquant la chute de sa concentration ovocytaire, permettant alors la reprise de méiose (Norris *et al.*, 2008).

Le dialogue ovocyte-granulosa joue aussi un rôle dans l'expansion du cumulus induit par le pic pré-ovulatoire de LH, avec l'intervention notamment de facteurs ovocytaires (Monniaux *et al.*, 2009).

Parmi les nombreux facteurs intervenant dans la communication ovocyte-granulosa, les facteurs GDF-9 (*Growth and differentiation factor-9*) et BMP-15 (*Bone morphogenetic protein-15*, aussi connu sous le nom de GDF-9B) jouent un rôle particulièrement important que nous allons détailler par la suite.

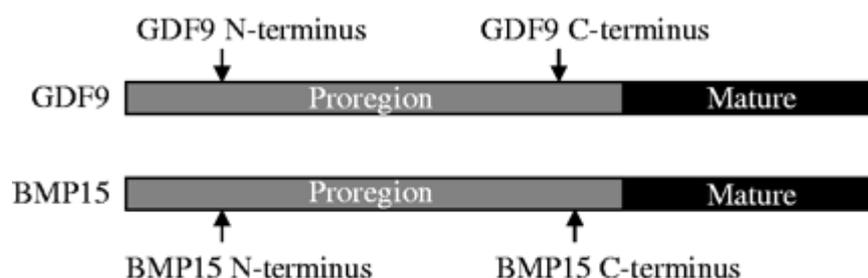
## IV. LES FACTEURS DE CROISSANCE GDF-9 et BMP-15

Les facteurs de croissance GDF-9 et BMP-15 appartiennent à la famille des facteurs de transformation et de croissance  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

Ces deux facteurs jouent un rôle important pour la croissance folliculaire et pour la régulation du taux d'ovulation, avec une action espèce-dépendante.

### 1. Structure chimique de GDF-9 et BMP-15

GDF-9 et BMP-15 sont tous deux produits sous forme de précurseurs protéiques qui subissent des clivages protéolytiques. Les protéines obtenues sont composées d'une pro-région et d'une portion mature biologiquement active de la protéine (Figure 7 ; Bodensteiner *et al.*, 1999 ; Galloway *et al.*, 2000 ; McIntosh *et al.*, 2012).

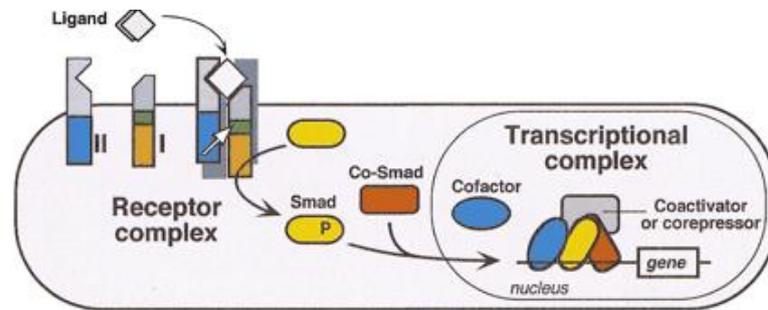


**Figure 7 : Structure chimique de GDF-9 et BMP-15**  
(D'après McIntosh *et al.*, 2012)

Chez les autres membres des TGF- $\beta$ , cette pro-région permettrait de faciliter la dimérisation des protéines matures (Kingsley, 1994 ; Chang *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2003). Cependant, le rôle de la pro-région de GDF-9 et BMP-15 est inconnu à ce jour, et on ne sait pas si la formation de dimères est un prérequis nécessaire pour l'activité biologique de ces deux facteurs.

### 2. Récepteurs de GDF-9 et BMP-15

Les récepteurs des TGF- $\beta$  sont des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase qui sont de deux types, I et II. Le récepteur de type II a une activité kinase intrinsèque alors que le récepteur de type I doit être phosphorylé pour être actif. Le TGF- $\beta$  se fixe ainsi au récepteur de type II qui recrute le récepteur de type I par dimérisation et l'active par phosphorylation. La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée par la phosphorylation des protéines Smads par le récepteur de type I (Figure 8 ; Attisano et Wrana, 1998 ; Masegué et Chen, 2000).



**Figure 8 : Voie de signalisation des TGF- $\beta$  (Massegué et Chen, 2000)**

Concernant les facteurs GDF-9 et BMP-15 en particulier, différents récepteurs pour ces facteurs ont été identifiés. Le récepteur BMPRII a été identifié comme un récepteur de type II impliqué à la fois dans la signalisation de BMP-15 et de GDF-9 (Vitt *et al.*, 2002 ; Moore *et al.*, 2003). Le récepteur de type I BMPRI (aussi connu sous le nom de ALK6) intervient dans la signalisation du facteur BMP-15 (Moore *et al.*, 2003), tandis que GDF-9 possède un récepteur de type I différent, le récepteur TGF $\beta$ RI (aussi connu comme ALK5) (Mazerbourg *et al.*, 2004). De plus, les voies de transduction activées par GDF-9 et BMP-15 n'utilisent pas les mêmes protéines Smads (Kaivo-Oja *et al.*, 2003 ; Moore *et al.*, 2003 ; Roh *et al.*, 2003).

Chez la femme, les protéines pour le récepteur TGF $\beta$ RI ont été localisées dans les cellules de la granulosa des follicules primordiaux, pré-antraux et antraux (Qu *et al.*, 2000). Chez la brebis, les ARNm et protéines pour BMPRII et BMPRI ont été observés à la fois dans les cellules de la granulosa et les ovocytes des follicules pré-antraux (Wilson *et al.*, 2001 ; Souza *et al.*, 2002). De plus, les ARNm de BMPRII et une faible quantité de protéines BMPRI et BMPRII ont été observés dans les cellules de la thèque (Souza *et al.*, 2002). Chez le rat, BMPRII est localisé uniquement dans les cellules de la granulosa, et BMPRI est localisé dans l'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque (Shimazaki *et al.*, 1999).

Ces résultats suggèrent que BMP-15 et GDF-9 sont actifs dans les cellules de la granulosa, de la thèque et de l'ovocyte et pourraient réguler l'activité de ces tissus dès les stades primordiaux de la folliculogénèse.

### 3. Rôles de GDF-9

#### A. Constitution de la réserve de follicules primordiaux

Le rôle de GDF-9 dans la formation des follicules n'est pas clairement établi chez les rongeurs. Il ne semble pas impliqué dans la formation des follicules chez la souris, puisqu'aucune modification de la population de follicules primordiaux n'a été observée chez les souris *knock-out* pour *gdf-9* (Dong *et al.*, 1996) et que *gdf-9* n'est pas exprimé dans les follicules avant le début de leur croissance (Elvin *et al.*, 1999a,b). En revanche, des ovaires de hamster collectés juste avant la naissance et mis en culture 9 jours dans un milieu contenant GDF-9 voyaient une augmentation dose-dépendante de la proportion d'ovocytes qui avaient

entamé la formation de follicules primordiaux (Wang et Roy, 2004), suggérant que GDF-9 chez le hamster jouerait un rôle pour la formation des follicules.

Chez la brebis, GDF-9 semble jouer un rôle dans la formation folliculaire. Selon Mandon-Pepin *et al.* (2003), GDF-9 est présent dans les ovaires de brebis dès le 56<sup>ème</sup> jour de vie fœtale avant la formation des follicules. De plus, l'ARNm et la protéine de GDF-9 ont été localisés dans les ovocytes fœtaux avant la formation folliculaire (Juengel *et al.*, 2004a). Cela pourrait suggérer un éventuel rôle de GDF-9, non démontré à ce jour, dans la formation folliculaire chez la brebis.

### *B. Folliculogenèse et ovogenèse*

De nombreuses études montrent un rôle clé de GDF-9 pour la folliculogenèse chez les rongeurs. Des études chez des souris *knock-out* pour *gdf-9* montrent que les femelles sont infertiles avec des follicules arrêtés au stade primaire avec une seule couche de cellules de la granulosa (Dong *et al.*, 1996). De plus, un traitement de GDF-9 administré *in vivo* chez des rats ou *in vitro* sur des follicules ovariens provoque une réduction du nombre de follicules primordiaux et une augmentation du nombre de follicules primaires et de petits follicules pré-antraux (Hayashi *et al.*, 1999 ; Vitt *et al.*, 2000b ; Nilsson et Skinner, 2002). Chez la brebis, GDF-9 joue un rôle important dans la folliculogenèse : les brebis homozygotes pour une mutation inactivant GDF-9 sont infertiles avec une croissance folliculaire arrêtée au stade primaire (Hanrahan *et al.*, 2004). Inversement, chez la femme, une étude montre que pour des ovaires cultivés en présence de GDF-9, un plus grand nombre de follicules primordiaux entame la croissance folliculaire et atteint le stade secondaire (Hreinsson *et al.*, 2002).

De même, GDF-9 semble avoir un rôle dans la survie des follicules pré-antraux et le passage au stade antral chez le rat. Il empêche en effet l'apoptose des cellules de la granulosa des follicules pré-antraux et l'atrésie des follicules. Ce phénomène serait lié à une augmentation de l'expression des récepteurs à FSH, nécessaire pour la croissance des follicules antraux (Orisaka *et al.*, 2006).

GDF-9 aurait un rôle dans la formation de la thèque chez la souris. Chez des souris déficientes en GDF-9, des marqueurs des cellules de la thèque deviennent indétectables (17 $\alpha$  hydroxylase, LHR (*Luteinizing Hormone Receptor*), c-kit), montrant qu'en l'absence de GDF-9, les follicules ne sont pas compétents pour émettre un signal recrutant les précurseurs des cellules de la thèque (Elvin *et al.*, 1999b).

GDF-9 est impliqué également dans l'ovogenèse chez la souris : les ovocytes déficients en GDF-9 grandissent plus vite que les ovocytes normaux et atteignent une taille plus grande malgré l'arrêt au stade primaire (Carabatsos *et al.*, 1998). Ils possèdent également plus de défauts ultrastructuraux, suggérant que certains événements de l'ovogenèse sont affectés par l'absence de GDF-9 (Dong *et al.*, 1996 ; Elvin *et al.*, 1999a ; Yan *et al.*, 2001).

### C. Période péri-ovulatoire et ovulation

GDF-9 jouerait un rôle dans l'expansion des cellules du cumulus chez la souris. En effet, dans des complexes cumulus-ovocytes dont l'ovocyte a été retiré, GDF-9 permet l'expansion des cellules du cumulus (Elvin *et al.*, 1999b). D'autres études soutiennent ce rôle de GDF-9 dans l'expansion du cumulus. L'induction de HAS-2 (*Hyaluronan Synthase 2*) et la suppression d'uPA (*urokinase plasminogen activator*) dans les cellules du cumulus sont des événements clés qui régulent la production d'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire durant l'expansion du cumulus. Cependant, GDF-9 stimule la synthèse d'HAS-2 et de COX-2 (*CycloOxygenase 2*) et supprime la synthèse d'uPA (Elvin *et al.*, 1999b), suggérant le rôle du facteur GDF-9 dans l'expansion du cumulus.

Chez la brebis, GDF-9 joue un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation. Les brebis homozygotes pour une mutation inactivant *gdf-9* sont infertiles avec une croissance folliculaire arrêtée au stade primaire, tandis que les brebis hétérozygotes pour cette mutation sont fertiles et ont un taux d'ovulation augmenté (Hanrahan *et al.*, 2004). De même, il semble que GDF-9 altère le taux d'ovulation chez la femme. En effet, des mutations sur *gdf-9* ont été détectées chez des patientes avec un taux d'ovulation augmenté (Palmer *et al.*, 2006).

### D. Stéroïdogénèse

Les résultats concernant le rôle de GDF-9 dans la stéroïdogénèse chez les rongeurs sont contradictoires. Une étude montre que GDF-9 stimule la synthèse de progestérone dans les cellules de la granulosa chez la souris (Elvin *et al.*, 2000). Au contraire, Vitt *et al.* (2000a) montrent que chez le rat, GDF-9 inhibe la synthèse de progestérone et d'œstradiol induite par FSH dans les cellules de la granulosa dans les petits follicules antraux et les follicules pré-ovulatoires.

Chez l'Homme, GDF-9 inhibe la synthèse de progestérone des cellules de la granulosa et de la thèque stimulée par l'AMPc (Yamamoto *et al.*, 2002).

## 4. Rôles de BMP-15

### A. Constitution de la réserve de follicules primordiaux

BMP-15 ne semble pas impliqué dans la formation des follicules chez la brebis. Aucune modification de la population de follicules primordiaux n'a été observée chez les brebis déficientes en BMP-15 (Smith *et al.* 1997 ; Galloway *et al.*, 2000). Ces observations semblent soutenues par le fait que BMP-15 n'est pas exprimé dans les follicules avant le début de leur croissance chez la brebis (Bodensteiner *et al.*, 1999).

## B. Folliculogenèse

BMP-15 semble jouer un rôle clé dans la folliculogenèse basale de plusieurs espèces.

McMahon *et al.* (2008) montrent que la folliculogenèse chez la souris est accélérée quand BMP-15 est surexprimé, avec une diminution du nombre de follicules primaires et une augmentation du nombre de follicules secondaires. Cette accélération de la folliculogenèse serait due à une augmentation de l'index mitotique des cellules de la granulosa observée chez ces souris. De plus, l'expression des ARNm codant pour les récepteurs à FSH est diminuée, et on observe une augmentation du nombre de follicules antraux atrétiques, qui pourrait s'expliquer par la diminution du nombre de récepteurs à FSH durant les stades FSH-dépendants.

Chez les brebis de race Inverdale possédant une mutation inactivant *bmp-15*, les individus homozygotes pour cette mutation sont stériles avec une croissance folliculaire arrêtée au stade primaire (Davis *et al.*, 1992 ; Braw-Tal *et al.*, 1993 ; Galloway *et al.*, 2000 ; Hanrahan *et al.*, 2004).

Chez la femme, une étude montre que deux sœurs atteintes d'une mutation hétérozygote pour le gène *bmp-15* souffraient de dysgénésie ovarienne, avec une croissance folliculaire arrêtée au stade primaire et une diminution de la croissance des cellules de la granulosa ; elles étaient stériles (Di Pasquale *et al.*, 2004). BMP-15 est donc requis chez la femme pour le bon déroulement de la folliculogenèse basale.

## C. Période péri-ovulatoire et ovulation

Chez les souris *knock-out* pour *bmp-15*, une diminution de la fertilité est observée. La croissance folliculaire ne semble pas affectée mais l'ovulation et la fécondation des ovocytes sont diminuées (Yan *et al.*, 2001). BMP-15 aurait donc un rôle chez les rongeurs dans la régulation du taux d'ovulation, en régulant celui-ci à la hausse.

Chez la brebis, BMP-15 joue également un rôle clé pour l'ovulation, en régulant à la baisse le taux d'ovulation. Les brebis hétérozygotes pour une mutation de *bmp-15* sont fertiles et possèdent un taux d'ovulation augmenté et une plus grande incidence de naissance de jumeaux et de triplets (Davis *et al.*, 1991, 1993 ; Galloway *et al.*, 2000 ; Hanrahan *et al.*, 2004). Elles possèdent également plus de follicules pré-ovulatoires matures, bien qu'ils soient plus petits et comportent moins de cellules de la granulosa (Shakell *et al.*, 1993). Le nombre élevé de follicules pré-ovulatoires peut s'expliquer par leur sensibilité augmentée à FSH et leur pic de réponse plus précoce à LH (Shackell *et al.*, 1993), limitant ainsi l'atrésie quand le taux de FSH chute sous le seuil critique.

Pour des brebis immunisées contre BMP-15, le taux d'ovulation est augmenté et la capacité de l'ovocyte à être fécondé n'est pas altérée (Juengel *et al.*, 2004b).

## *E. Stéroïdogénèse*

Chez le rat, BMP-15 inhibe la production de progestérone stimulée par la FSH dans les cellules de la granulosa (Otsuka *et al.*, 2000), en particulier en supprimant l'expression des récepteurs à FSH dans cellules de la granulosa (Otsuka *et al.*, 2001). BMP-15 pourrait donc jouer un rôle dans l'inhibition de la lutéinisation des cellules de la granulosa.

## **V. BILAN**

Nous venons de voir que l'ovocyte canin présente des particularités uniques parmi les ovocytes des autres mammifères. Une des particularités majeures est d'être ovulé au stade prophase I de méiose et de n'atteindre le stade métaphase II qu'après une période de 48-72 heures passée dans l'oviducte. Le taux de réussite en MIV reste décevant chez la chienne et varie entre 0 et 32%, et ce quel que soit le stade du cycle œstral et de folliculogénèse de l'ovocyte prélevé, la composition du milieu et la durée de culture.

Les mécanismes contrôlant la reprise de méiose de l'ovocyte canin sont inconnus à l'heure actuelle, mais ce retard pourrait être dû notamment à l'absence de facteurs dans le cytoplasme ovocytaire, que l'ovocyte devrait synthétiser lui-même ou récupérer dans le fluide de l'oviducte.

Nous avons également vu que la communication entre l'ovocyte et la granulosa est indispensable pour le bon développement du follicule et de l'ovocyte. Cette communication s'effectue notamment par l'action de facteurs paracrines, dont l'inactivation ou la surexpression peut avoir des conséquences importantes sur l'ovogénèse et la folliculogénèse. Parmi ces facteurs, GDF-9 et BMP-15 jouent un rôle dans plusieurs processus de la folliculogénèse, de l'ovogénèse et de la régulation de l'ovulation chez de nombreuses espèces, avec un effet espèce-dépendant.

Chez la chienne, les rôles de GDF-9 et BMP-15 restent à ce jour méconnus. Il serait intéressant de savoir si ces deux facteurs jouent aussi un rôle chez la chienne dans l'ovogénèse et l'acquisition de la compétence méiotique comme pour d'autres espèces. Ces informations pourraient servir à terme à moduler leur expression afin d'augmenter le taux de réussite en MIV.

Le premier objectif de l'étude expérimentale présentée par la suite porte sur la localisation de GDF-9 et BMP-15 par immunohistochimie dans les cellules folliculaires et les ovocytes canins au cours de la folliculogénèse.

Le second objectif de ce travail est d'étudier les variations d'expression de GDF-9 et BMP-15 selon le stade folliculaire, afin de savoir s'ils sont majoritairement exprimés durant la folliculogénèse basale, terminale ou avant l'ovulation, et leurs variations d'expression selon les étapes du cycle œstral. Ceci pourrait suggérer une influence de l'environnement hormonal sur l'expression de ces deux facteurs.

**DEUXIEME PARTIE :  
ETUDE EXPERIMENTALE**

LOCALISATION DES FACTEURS DE CROISSANCE GDF-9 ET BMP-15  
DANS LES FOLLICULES ET OVOCYTES CANINS  
PAR IMMUNOHISTOCHEMIE

*Projet FONDECYT 1140658*



# I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Collecte des ovaires

Les ovaires de 14 chiennes, âgées de 1 à 6 ans et cliniquement saines, ont été collectés par ovariohystérectomie de convenance à différents stades du cycle œstral. Les stérilisations ont été effectuées dans des centres vétérinaires municipaux de Santiago du Chili.

Pour chaque chienne, une prise de sang sur tube sec a également été réalisée au moment de la stérilisation pour le dosage ultérieur de la progestéronémie. Les tubes étaient conservés au congélateur à -20°C jusqu'au dosage.

Une fois les ovaires prélevés, ils ont été placés dans des tubes à essai maintenus à 38,5°C contenant du PBS (*Phosphate Buffered Saline*), puis transportés au laboratoire dans l'heure suivant leur exérèse.

Au laboratoire, les ovaires ont été lavés avec du PBS puis fixés dans une solution à 4% de paraformaldéhyde dans du PBS (Merck, Darmstadt, Allemagne) et conservés à température ambiante (20°C).

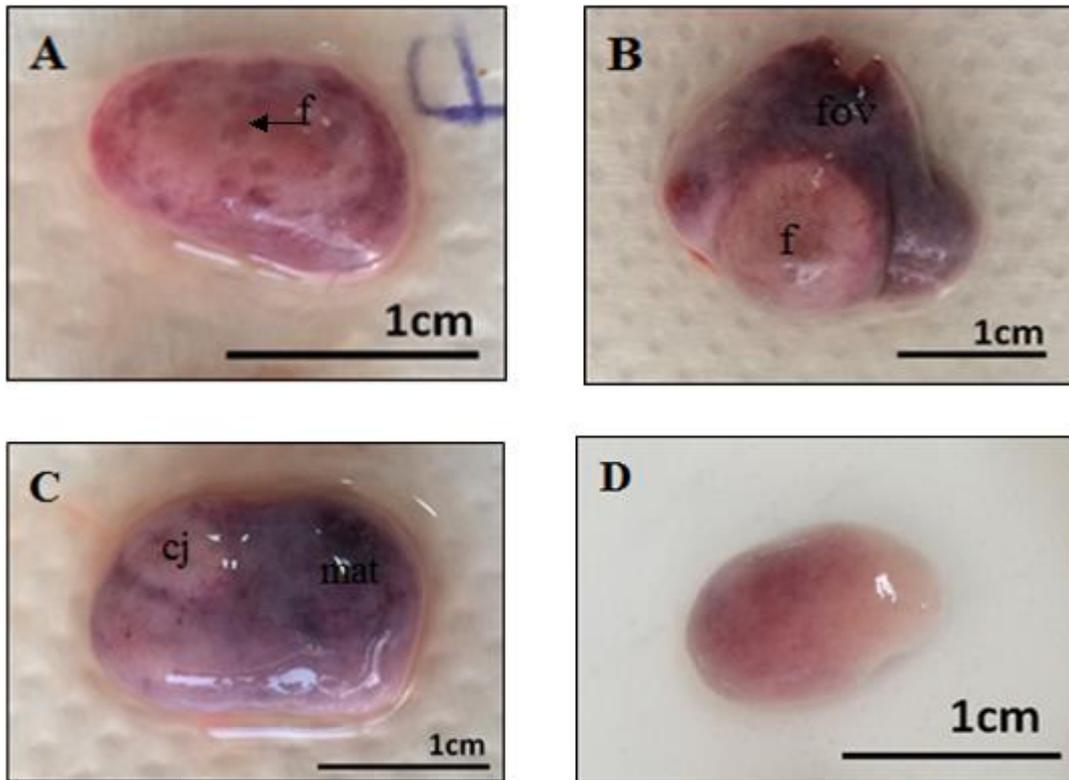
## 2. Détermination du stade du cycle œstral

Les ovaires ont été classés selon le stade du cycle œstral auquel se trouvait la chienne.

Le stade du cycle œstral a été déterminé en considérant les structures ovariennes prédominantes visualisées et palpées à la surface de l'ovaire (Figure 9 et Tableau 1) et le niveau de progestérone sérique mesuré par méthode ELISA (PHomo Microplate Reader, Autobio Labtec Instruments, Zhenghaidong, Chine) avec un kit canin (Prog ELISA Kit, MyBioSource, San Diego, USA).

**Tableau 1** : Classification des ovaires selon les structures ovariennes observées à la surface de l'ovaire (observation macroscopique) et le niveau de progestérone sérique

	<b>Structures ovariennes observées à la surface de l'ovaire</b>	<b>Concentration sérique de progestérone</b>
<b>Proœstrus</b>	Petits follicules (<5mm)	1 - 2ng/mL
<b>Œstrus</b>	Follicule ayant ovulé Gros follicules (>5mm)	2 - 25 ng/mL
<b>Diœstrus</b>	Corps jaune	1 - 80 ng/mL
<b>Anœstrus</b>	Absence de structure	< 1 ng/mL



Les ovaires ont été isolés de leur bourse ovarique.

**Photo A :** Proœstrus. On observe seulement des petits follicules (f) à la surface de l'ovaire.

**Photo B :** Œstrus. De gros follicules (f) et/ou des follicules ayant ovulé (fov) sont visibles.

**Photo C :** Dioœstrus. Des corps jaunes sont présents à la surface de l'ovaire (cj) et des corps jaunes en cours de maturation sont présents (mat).

**Photo D :** Anœstrus. La surface de l'ovaire est lisse, aucune structure n'est observable.

**Figure 9 :** Structures ovariennes observées et palpées à la surface de l'ovaire selon le stade du cycle œstral

### 3. Inclusion des ovaires et préparation des lames d'immunohistochimie

Grâce à un automate d'imprégnation en paraffine (Shandon Citadel 2000, Thermoscientific, Cheshire, Royaume-Uni), les ovaires ont été déshydratés à température ambiante (20°C) dans des solutions d'alcool de concentrations croissantes de 95 à 100% puis de xylol (Tableau 2 pour le détail des étapes) puis immergées dans un bain de paraffine liquide.

Les ovaires ont été ensuite inclus dans des blocs de paraffine (automate d'inclusion en paraffine Leica EG 1120, Leica, Nussloch, Allemagne) puis ont été maintenus à 4°C jusqu'à préparation des lames.

A partir des blocs de paraffine contenant les ovaires, des coupes de 3 à 4 µm d'épaisseur ont été réalisées grâce à un microtome rotatif (Leitz 1512, Leitz, Stuttgart, Allemagne).

Ces coupes ont été étalées sur un bain marie d'eau à 40°C pour être ensuite placées sur des lames de verre silanisées (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis). La surface silanisée des lames permet une meilleure adhérence des coupes de tissus.

Pour chaque ovaire, 4 lames blanches choisies de manière aléatoire au sein de l'ovaire ont été effectuées et ont été réparties sur 2 lames : une lame avec 2 coupes pour étudier le facteur de croissance GDF-9 avec un contrôle négatif, et une lame avec 2 coupes pour étudier le facteur de croissance BMP-15 avec un contrôle négatif.

Les lames ont enfin été incubées 2 heures à 40 °C dans une étuve (Memmert, Allemagne) afin de les faire sécher et d'éliminer le film liquidien compris entre la lame et la coupe paraffinée.

**Tableau 2 : Méthode d'inclusion des ovaires avec processeur automatique**

Les chiffres romains correspondent à des bains différents pour chaque solution.

	<b>Temps d'incubation</b>	<b>Température d'incubation</b>
<b>Alcool 95% I</b>	1h30	22°C
<b>Alcool 95% II</b>	1h30	22°C
<b>Alcool 100% I</b>	1h00	22°C
<b>Alcool 100% II</b>	2h00	22°C
<b>Alcool 100% III</b>	2h30	22°C
<b>Xylol I</b>	1h00	22°C
<b>Xylol II</b>	1h00	22°C
<b>Xylol III</b>	1h00	22°C
<b>Paraffine I</b>	2h00	58°C
<b>Paraffine II</b>	3h00	58°C
<b>Inclusion</b>		

## 4. Immunohistochimie

### A. Déparaffinage et étapes de préparation

Les lames ont été déparaffinées selon le protocole présenté dans le Tableau 3.

Une fois déparaffinées, les lames ont été incubées au bain marie dans du tampon citrate 10 mmol/L à pH 6 (Merck) pendant 10 minutes à 95°C afin de réaliser un démasquage des sites antigéniques rendu nécessaire par l'étape de fixation au paraformaldéhyde, puis ont été placées à température ambiante pendant 10 minutes.

Les coupes ont été placées dans une solution d'eau oxygénée à 3% (Sigma Aldrich) durant 10 minutes afin de bloquer la peroxydase endogène, suivi de 3 lavages au PBS d'une minute chacun.

Les échantillons ont ensuite été placés dans une solution de PBS + BSA 2% (A253-10G, Sigma Aldrich) durant 15 minutes en vue de leur saturation. Cette étape permet un

blocage des liaisons non spécifiques, car la BSA a la propriété de se fixer de manière non spécifique sur les sites d'attachement cellulaires. La solution a ensuite été retirée par simple aspiration sans lavage.

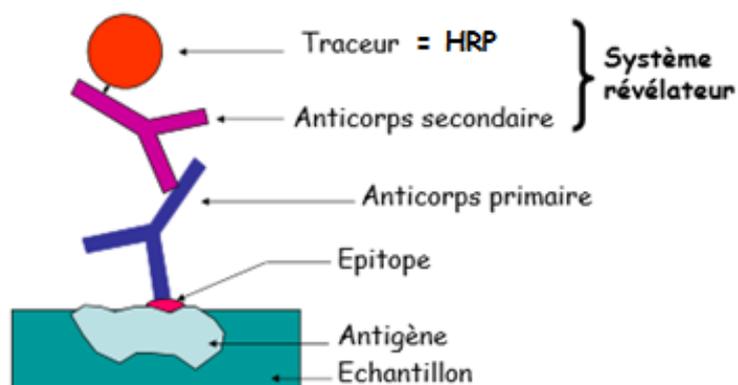
**Tableau 3 : Méthode de déparaffinage des lames**

Les chiffres romains correspondent à des bains différents pour chaque solution.

	Temps d'incubation	Température d'incubation
<b>Xylol I</b>	5 min	22°C
<b>Xylol II</b>	5 min	22°C
<b>Xylol III</b>	5 min	22°C
<b>Alcool 100% I</b>	5 min	22°C
<b>Alcool 100% II</b>	5 min	22°C
<b>Alcool 95%</b>	5 min	22°C
<b>Alcool 75%</b>	5 min	22°C
<b>Rinçage avec du PBS</b>		

### B. Incubation avec les anticorps

Pour le protocole d'immunohistochimie, une technique d'immunoréaction indirecte a été utilisée, avec des anticorps primaires et des anticorps secondaires conjugués au traceur HRP (Horseradish Peroxidase) (Figure 10). La peroxydase est révélée grâce au chromogène DAB (3-3'diaminobenzidine), substrat de la peroxydase. Chaque étape est détaillée par la suite.



**Figure 10 : Principe de l'immunohistochimie utilisée**  
(d'après [http://crn2m.univ-mrs.fr/IMG/pdf/TD\\_imagerie\\_OB\\_06-07.pdf](http://crn2m.univ-mrs.fr/IMG/pdf/TD_imagerie_OB_06-07.pdf))

#### *a. Incubation des coupes avec les anticorps primaires*

Les coupes consacrées à l'étude du facteur de croissance GDF-9 ont été incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GDF-9 humain (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) à une dilution 1:200 dans une solution de PBS + BSA 2%. La coupe contrôle négatif sur la même lame a été incubée dans une solution de PBS + BSA 2% sans l'anticorps.

Les coupes consacrées à l'étude du facteur de croissance BMP-15 ont été incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-BMP-15 humain (R&D Systems, Minneapolis, USA) à une dilution 1:150 dans une solution de PBS + BSA 2%. De même, le contrôle négatif a été incubé dans une solution de PBS + BSA 2% sans l'anticorps.

#### *b. Incubation des coupes avec l'anticorps secondaire et révélation*

Après l'incubation, toutes les lames ont été lavées trois fois une minute avec du PBS puis les tissus ont été incubés deux heures à l'obscurité et à température ambiante avec l'anticorps secondaire à la dilution 1:200 dans du PBS + BSA 2%. Pour GDF-9, l'anticorps utilisé était un anticorps polyclonal de chèvre anti-lapin conjugué à l'HRP (Abcam), et pour BMP-15 un anticorps d'âne anti-chèvre conjugué à l'HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA).

Les échantillons ont ensuite été lavés trois fois 5 minutes avec du PBS, puis révélés 15 minutes avec le chromogène DAB (Vector, Burlingame, USA), et enfin lavés avec de l'eau distillée.

### *C. Contre coloration et montage*

Pour la contre coloration, les échantillons ont été colorés avec de l'hématoxyline (Merck). Après cette étape, les lames ont été déshydratées (placés dans des solutions d'alcool successives d'alcool : une solution à 70%, 2 solutions à 100% et 2 solutions de xylol à 100% durant 10 secondes chacune), pour être enfin montés entre lame et lamelle avec milieu de montage Entellan (Merck).

## **5. Observation des structures ovariennes**

### *A. Matériel d'observation*

Les follicules aux différents stades de développement et leurs ovocytes ont été observés grâce à un microscope à lumière inversée Olympus IX71 (Tokyo, Japon) équipé d'une lampe IX2-RFA. Les photographies ont été obtenues avec une caméra ProgRes-Capture Pro 2.5 (Jenoptik, Jena, Allemagne) annexée au microscope. Le même temps d'exposition et la même lumière ont été appliqués à tous les échantillons pour la prise de cliché.

## B. Détermination du stade folliculaire

Concernant les follicules, nous avons distingué les différentes étapes de la croissance folliculaire selon les critères suivants (Figure 11 ; Monniaud *et al.*, 2009) :

- *Follicule primordial* : ovocyte entouré d'une seule couche de cellules folliculaires aplaties.
- *Follicule primaire* : ovocyte avec une seule couche de cellules folliculaires de forme cuboïdale.
- *Follicule secondaire* : ovocyte avec plusieurs couches de cellules folliculaires, sans antrum.
- *Follicule antral* : ovocyte avec plusieurs couches de cellules folliculaires différenciées en cellules de la granulosa et cellules de la thèque, et présence d'une cavité antrale.

## C. Détermination de l'intensité de l'immunomarquage

Tout le long de cette étude, nous avons étudié séparément l'immunomarquage des cellules folliculaires et celui des ovocytes.

Nous avons classé les ovocytes et les cellules folliculaires selon 4 degrés d'immunomarquage : Fort, Moyen, Faible, Nul, en relation avec l'intensité de l'immunomarquage.

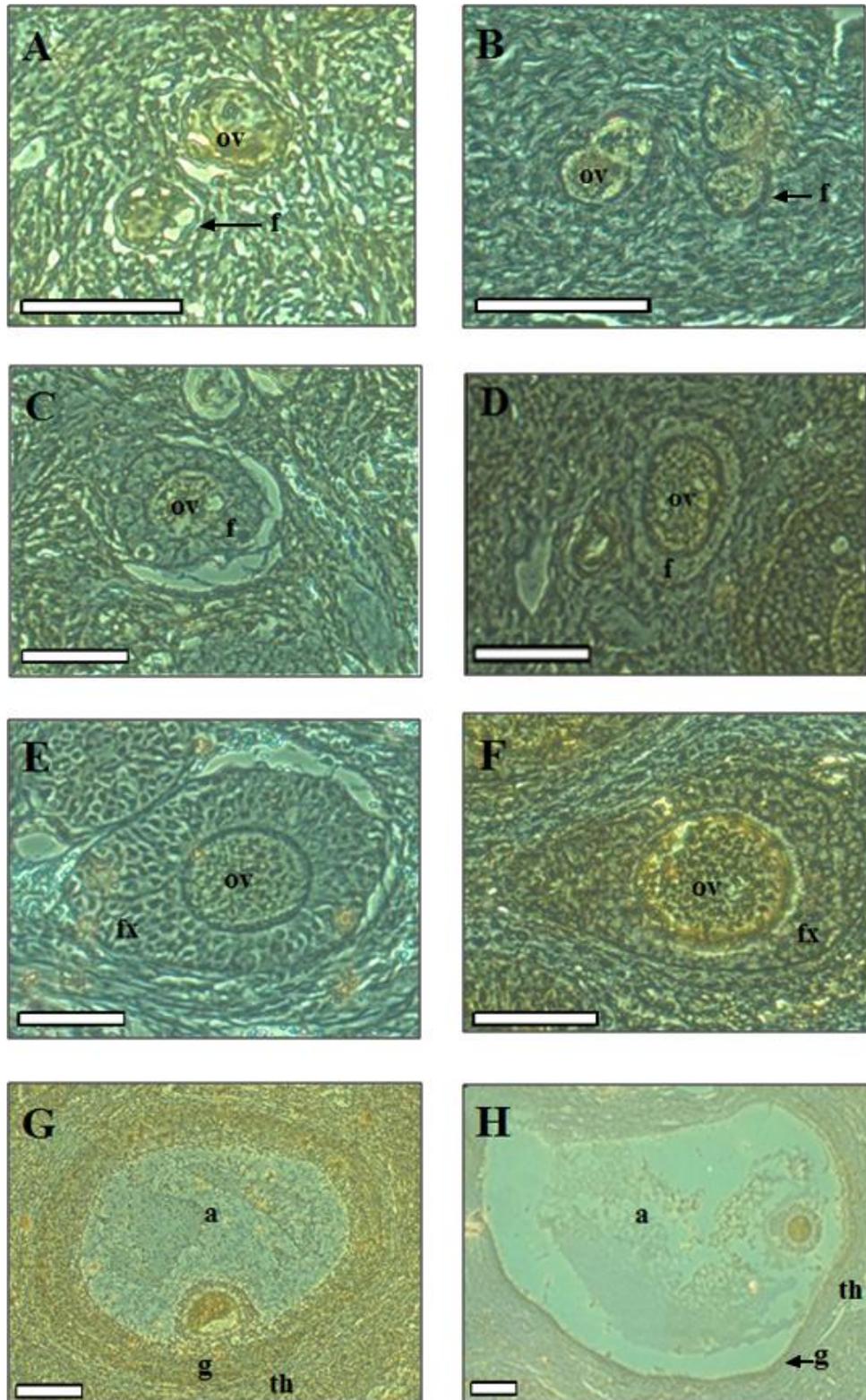
L'intensité du marquage a été quantifiée au début des manipulations grâce au programme Image J (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Pour cela, nous avons réalisé les mesures sur un échantillon de 6 ovocytes/cellules folliculaires pour chaque catégorie d'immunomarquage : Fort, Moyen, Faible. Sur le logiciel, les photographies ont été transformées en échelle de gris. L'intensité de l'immunomarquage a été calculée par le logiciel en réalisant la différence suivante :

« *Densité intégrée moyenne* » de l'arrière-plan des photographies – « *Densité intégrée moyenne* » de la zone immuno-marquée

A partir des valeurs obtenues, une moyenne et un écart type pour chaque catégorie ont été obtenus et ont permis d'établir les valeurs seuils pour chaque catégorie. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 4.

La catégorie Fort été attribuée pour une valeur strictement supérieure à 23, la catégorie Moyenne pour une valeur strictement supérieure à 11 jusqu'à 23 inclus, la catégorie Faible pour une valeur inférieure ou égale à 11 (Figures 12 et 13).

Ces données ont été utilisées pour l'entraînement des observateurs. Pour la suite des observations, la classification selon les 4 degrés d'immunomarquage a été réalisée par deux observateurs de façon visuelle, sans utiliser le logiciel.



Photos **A et B** : Follicule primordial avec ovocyte (ov) et une seule couche de cellules folliculaires aplaties (f).  
 Photos **C et D** : Follicule primaire avec ovocyte (ov) et une seule couche de cellules folliculaires cuboïdales (f).  
 Photos **E et F** : Follicule secondaire avec ovocyte (ov) et plusieurs couches de cellules folliculaires (fx).  
 Photos **G et H** : Follicule antral avec antrum (a), granulosa (g) et thèque (th).  
 Echelle des photographies A, B, C, D, E= 20µm, observation au grossissement x400  
 Echelle des photographies G, H = 40µm, observation au grossissement x200.

**Figure 11 : Follicules canins à différentes étapes de croissance (avec immunomarquage)**

**Tableau 4 : Calcul des différences des densités intégrées pour les catégories Fort, Moyen, Faible d'immunomarquage**

	<b>Marquage Fort</b>					
<b>Arrière-plan</b>	144	118	147	157	151	147
<b>Zone étudiée</b>	119	93	121	120	107	116
<b>Différence</b>	25	25	26	37	44	31
<b>Moyenne ± SD</b>	31,1 ± 7,8					

	<b>Marquage Moyen</b>					
<b>Arrière-plan</b>	143	135	137	128	143	147
<b>Zone étudiée</b>	121	113	115	112	125	126
<b>Différence</b>	22	22	22	16	18	21
<b>Moyenne ± SD</b>	20,2 ± 2,6					

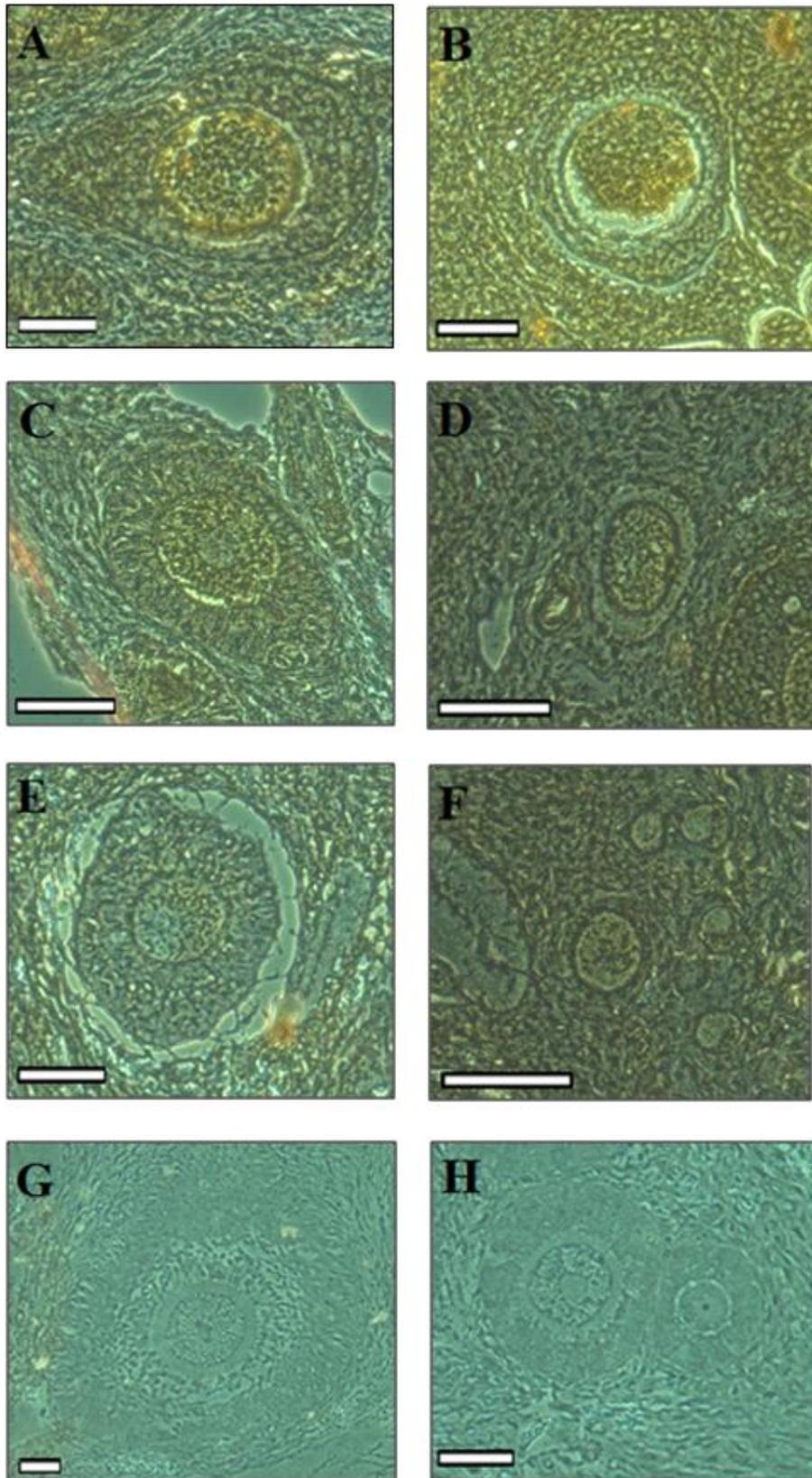
	<b>Marquage Faible</b>					
<b>Arrière-plan</b>	118	143	151	158	142	142
<b>Zone étudiée</b>	112	136	142	146	135	130
<b>Différence</b>	6	7	9	12	7	12
<b>Moyenne ± SD</b>	8,8 ± 2,6					

*Toutes les mesures sont exprimées en « unité logiciel ».*

## 6. Analyse statistique des résultats

L'observation des ovocytes et des cellules folliculaires a permis de les répartir en plusieurs groupes selon le stade folliculaire et le degré d'immunomarquage. L'analyse statistique des résultats a été réalisée avec le logiciel informatique R (R Core Team (2015), R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche).

Les répartitions des structures folliculaires étudiées dans les différents groupes ont été comparées en utilisant le test de Fisher exact. La correction de Bonferroni a été appliquée en fixant un seuil de 5% comme critère acceptable pour la significativité de l'ensemble. Les différences entre groupes ont donc été considérées significatives lorsque la probabilité de considérer que ces différences étaient imputables au hasard était plus petite que  $0,05/n$ , avec  $n$  le nombre de comparaisons élémentaires.

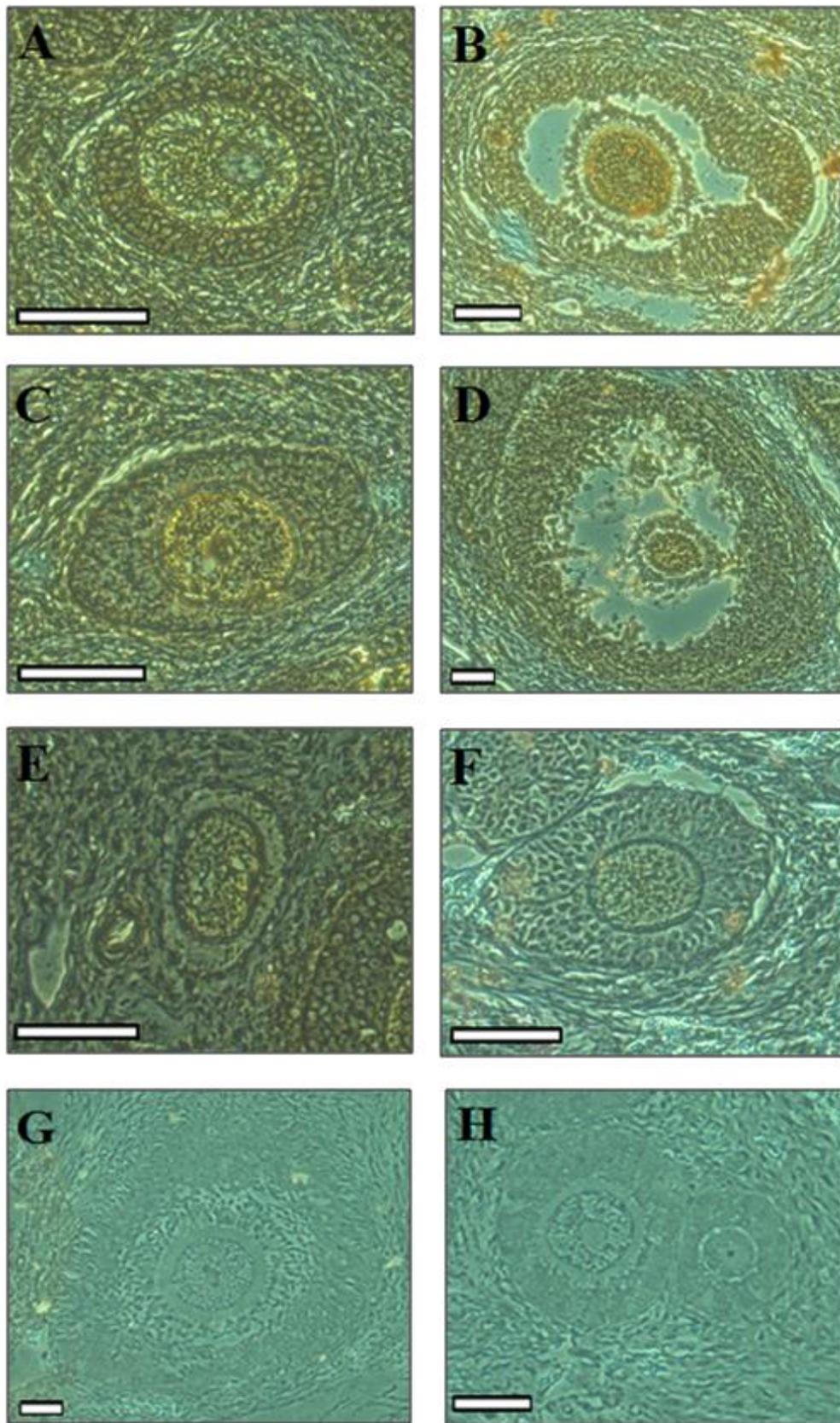


Photos **A et B** : intensité Forte,  
 Photos **E et F** : intensité Faible,  
 Echelle = 20µm.

Photos **C et D** : intensité Moyenne,  
 Photos **G et H** : témoins négatifs avec intensité Nulle.

A, B, C, D, E, F, H : observation au grossissement x400. G : observation au grossissement x200.

**Figure 12** : Notation de l'intensité de l'immunomarquage dans les ovocytes



Photos **A et B** : intensité Forte,                      Photos **C et D** : intensité Moyenne,  
 Photos **E et F** : intensité Faible,                      Photos **G et H** : témoins négatifs avec intensité Nulle.  
 Échelle = 20µm. B, D, G : observation à l'objectif x20. A, C, E, F, H : observation à l'objectif x40.

**Figure 13** : Notation de l'intensité de l'immunomarquage dans les cellules folliculaires

## II. RÉSULTATS

### 1. Effectifs

Après détermination du stade du cycle œstral des chiennes, l'effectif des individus inclus était la suivante :

- Proœstrus : 3 chiennes, 3 ovaires
- Œstrus : 2 chiennes, 2 ovaires
- Dioœstrus : 5 chiennes, 5 ovaires
- Anœstrus : 4 chiennes, 4 ovaires

Un seul ovaire par chienne a été retenu dans l'étude, le deuxième ayant été utilisé pour une autre étude menée en parallèle.

En raison du faible nombre de chiennes en proœstrus et en œstrus, les deux catégories ont été regroupées pour l'étude, avec un total de 5 chiennes, soit 5 ovaires, pour le proœstrus/œstrus.

Pour les lames consacrées à l'étude du facteur de croissance GDF-9, un total de 181 ovocytes et 168 follicules a été observé.

Pour les lames consacrées à l'étude du facteur de croissance BMP-15, un total de 126 ovocytes et 114 follicules a été observé.

Le nombre d'ovocytes diffère du nombre de follicules car certaines structures ont été abîmées dans les coupes : il manquait parfois l'ovocyte du follicule, et parfois la couche de cellules folliculaires, en particulier pour les follicules primordiaux.

La répartition des effectifs de follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire pour les deux facteurs est détaillée dans les tableaux 3 et 4.

**Tableau 5 : Répartition des follicules examinés en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire pour le facteur GDF-9**

Stade du cycle œstral		Stade folliculaire				Total
		Primordial	Primaire	Secondaire	Antral	
<b>Anœstrus</b>	<i>Ovocyte</i>	10	7	20	26	63
	<i>Follicule</i>	0	7	21	25	53
<b>Proœstrus/Œstrus</b>	<i>Ovocyte</i>	27	0	21	17	65
	<i>Follicule</i>	21	4	22	17	64
<b>Diœstrus</b>	<i>Ovocyte</i>	13	10	19	11	53
	<i>Follicule</i>	1	16	23	11	51
<b>Total</b>	<i>Ovocyte</i>	50	17	60	54	181
	<i>Follicule</i>	22	27	66	53	168

**Tableau 6 : Répartition des follicules examinés en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire pour le facteur BMP-15**

Stade du cycle œstral		Stade folliculaire				Total
		Primordial	Primaire	Secondaire	Antral	
<b>Anœstrus</b>	<i>Ovocyte</i>	0	5	15	14	34
	<i>Follicule</i>	0	5	5	14	24
<b>Proœstrus/Œstrus</b>	<i>Ovocyte</i>	11	3	28	18	60
	<i>Follicule</i>	1	3	30	19	53
<b>Diœstrus</b>	<i>Ovocyte</i>	14	0	13	5	32
	<i>Follicule</i>	4	6	22	5	37
<b>Total</b>	<i>Ovocyte</i>	25	8	56	37	126
	<i>Follicule</i>	5	14	57	38	114

## 2. Localisation de l'immunomarquage

Les contrôles négatifs, incubés sans le premier anticorps, n'ont pas montré de marquage, prouvant la spécificité de l'immunomarquage.

Toutes les coupes d'ovaires incubées avec les anticorps anti-GDF-9 et anti-BMP-15 ont présenté un marquage pour GDF-9 ou BMP-15.

Les facteurs GDF-9 et BMP-15 ont été immuno-localisés à la fois dans le cytoplasme des ovocytes et dans les cellules folliculaires, indiquant la présence de ces protéines dans les deux types de cellules, et ce, quels que soient le stade du cycle œstral et l'étape de croissance folliculaire.

Les 4 degrés d'intensité ont été observés pour les ovocytes et les follicules.

Par la suite, nous avons étudié dans un premier temps l'influence du stade folliculaire sur l'immunomarquage des facteurs GDF-9 et BMP-15 dans les ovocytes et follicules sans tenir compte de l'étape du cycle œstral.

Nous avons ensuite analysé l'influence du stade du cycle œstral sur l'immunomarquage des deux facteurs.

## 3. Variations de l'immunomarquage selon le stade folliculaire

Pour l'ensemble de cette partie, les résultats ont été considérés significativement différents lorsque  $p < 0,004$ . En effet, douze comparaisons élémentaires ont été réalisées (comparaison de tous les stades folliculaires entre eux et de toutes les intensités de marquage entre elles) et la correction de Bonferroni a été appliquée en fixant un seuil de 5% comme critère acceptable pour la significativité de l'ensemble.

### A. GDF-9 (Annexe 1, Figure 14)

#### a. Evolution du marquage de GDF-9 dans les ovocytes (Figure 14A)

Le marquage observé pour GDF-9 dans les ovocytes est cytoplasmique.

La proportion d'ovocytes marqués fortement aux stades primordial et secondaire est significativement supérieure au pourcentage d'ovocytes marqués fortement au stade antral (86% et 70,6% respectivement vs 42,6%). Inversement, la proportion d'ovocytes marqués moyennement au stade antral était significativement supérieure à celle des stades secondaire et primordial (51,9% vs 18,3% et 12% respectivement).

Parmi les follicules primordiaux, la proportion d'ovocytes marqués fortement est significativement supérieure à la proportion d'ovocytes marqués moyennement (86% vs

12%). De plus, parmi les follicules antraux, la proportion d'ovocytes marqués moyennement est significativement supérieure à la proportion d'ovocytes marqués fortement (51,9% vs 42,6%).

Étonnamment, on pourrait s'attendre à ce que la proportion d'ovocytes marqués fortement au stade primordial soit significativement supérieure à la proportion d'ovocytes marqués faiblement au même stade : l'odds ratio est en effet de 6. L'absence de significativité pourrait s'expliquer ici par un déséquilibre des effectifs pour la réalisation du test de Fisher exact, plutôt que par un effectif insuffisant. Il en va de même pour d'autres résultats : la proportion d'ovocytes marqués fortement au stade antral contre la proportion d'ovocytes marqués faiblement et sans marquage au même stade par exemple.

Ces résultats tendent à suggérer que le nombre d'ovocytes marqués fortement pour GDF-9 diminue au cours de la croissance folliculaire.

On pourrait alors supposer que GDF-9 est présent en grande quantité dans les ovocytes des stades pré-antraux puis que sa concentration diminue au stade antral.

#### *b. Evolution du marquage de GDF-9 dans les follicules (Figure 14B)*

La proportion de follicules marqués fortement au stade primordial est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués fortement aux stades secondaire et antral (95,5% vs 37,9% et 18,5% respectivement), et la proportion de follicules marqués fortement au stade primaire est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués fortement au stade antral (63% vs 18,5%).

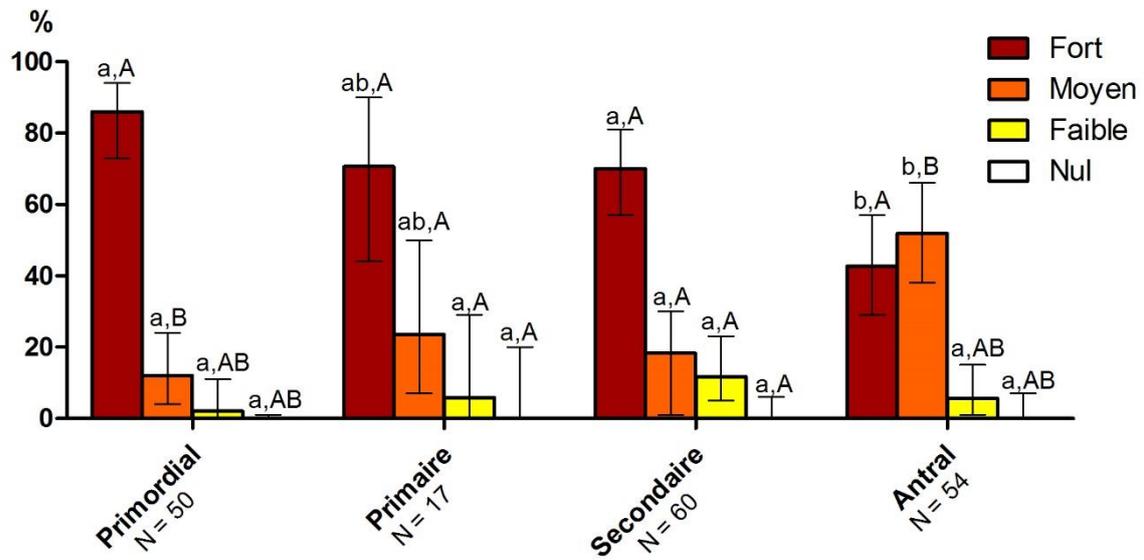
Inversement, la proportion de follicules marqués moyennement aux stades secondaire et antral est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués moyennement au stade primordial (36,4% et 50% respectivement vs 4,5%) et au stade antral par rapport au stade primaire (50% vs 14,8%). De même, il y a significativement plus de cellules folliculaires faiblement marquées au stade antral par rapport au stade primordial (27,8% vs 0%).

Parmi les follicules primordiaux, la proportion de follicules marqués fortement est significativement supérieure à la proportion de follicules marqués moyennement (95,5% vs 4,5%). De plus, parmi les follicules antraux, la proportion de follicules marqués moyennement et faiblement est significativement supérieure à la proportion de follicules marqués fortement (50% et 27,8% vs 18,5%).

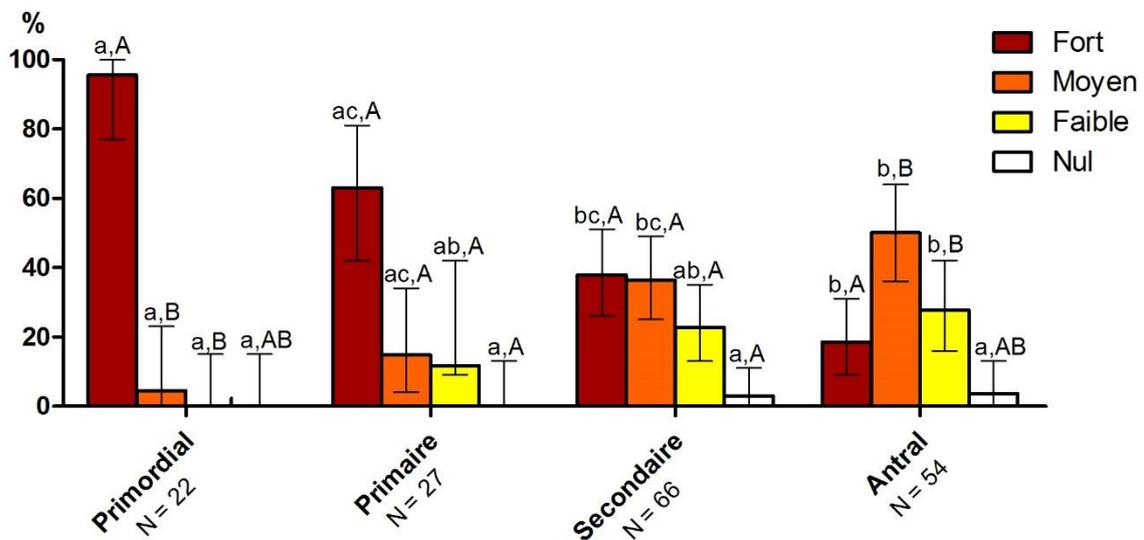
Ces résultats tendent à suggérer que l'intensité du marquage diminue dans les follicules au cours de la folliculogénèse, notamment à partir du stade follicule secondaire.

La diminution de la quantité de GDF-9 serait alors plus précoce dans les follicules que dans les ovocytes, avec une diminution de concentration à partir du stade secondaire au lieu du stade antral.

## A - Ovocytes



## B - Follicules



a,b,c : Les valeurs sans exposant en commun pour une intensité donnée (Forte/Moyenne/Faible/Nulle) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donné (Primordial/Primaire/Secondaire/Antral) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

**Figure 14 : Marquage pour le facteur GDF-9 selon le stade de croissance folliculaire**

## *B. BMP-15 (Annexe 2, Figure 15)*

### *a. Evolution du marquage de BMP-15 dans les ovocytes (Figure 15A)*

La proportion d'ovocytes marqués fortement au stade primordial est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués fortement aux stades secondaire et antral (64% vs 5,4% et 13,5% respectivement).

Inversement, il y a significativement plus d'ovocytes marqués faiblement aux stades secondaire et antral qu'au stade primordial (55,4% et 32,4% respectivement vs 0%).

Parmi les follicules primordiaux, la proportion d'ovocytes marqués fortement est significativement supérieure à la proportion de follicules marqués moyennement et faiblement (64% vs 36% et 0% respectivement), et la proportion d'ovocytes marqués moyennement est significativement supérieure à la proportion d'ovocytes marqués faiblement (36% vs 0%).

De plus, parmi les follicules secondaires, la proportion d'ovocytes marqués faiblement est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués fortement (55,4% vs 5,4%).

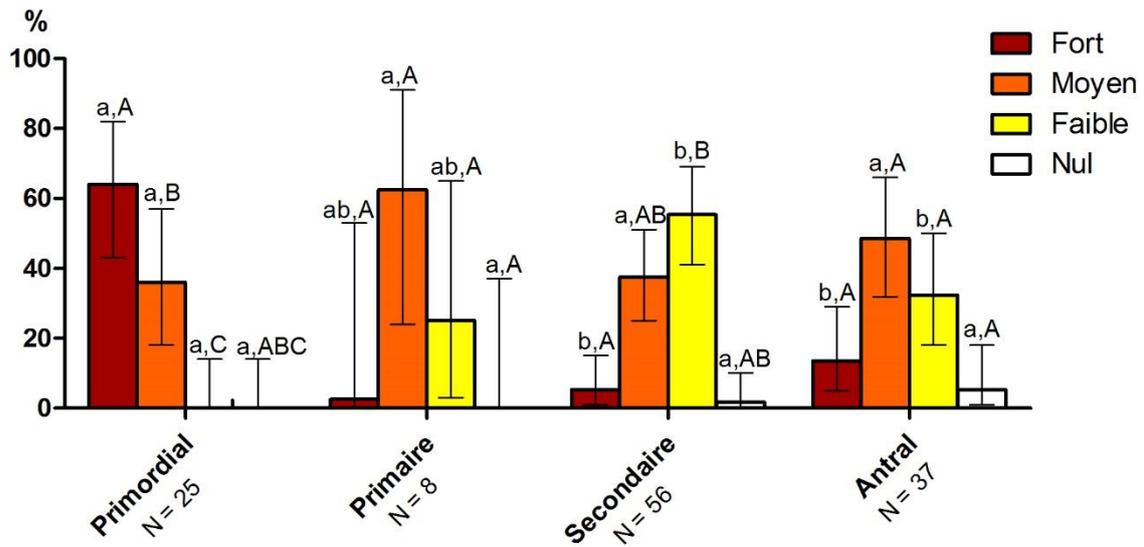
Ces résultats tendent à suggérer que l'expression de BMP-15 dans les ovocytes semble diminuer au cours de la croissance folliculaire, en particulier à partir du stade primaire.

### *b. Evolution du marquage de BMP-15 dans les follicules (Figure 15B)*

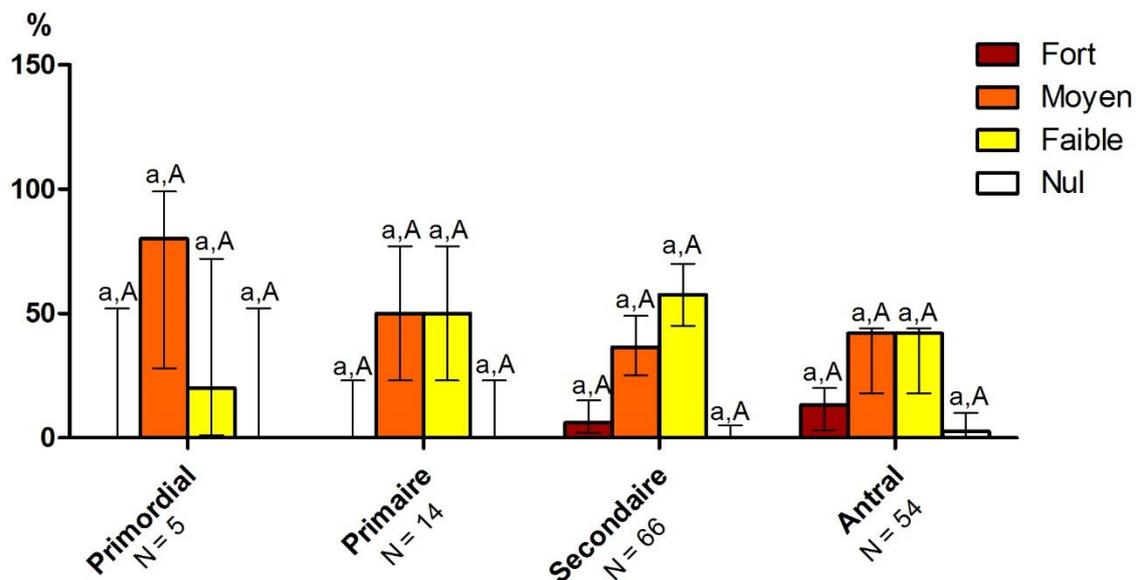
Aucune différence significative n'a été observée selon les différents stades de croissance folliculaire, et pour un stade folliculaire donné, il n'y a pas de différence significative dans la répartition selon le degré de marquage.

La quantité de BMP-15 dans les follicules ne semble donc pas varier selon les stades de croissance folliculaire.

## A - Ovocytes



## B - Follicules



a,b,c : Les valeurs sans exposant en commun pour une intensité donnée (Forte/Moyenne/Faible/Null) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donné (Primordial/Primaire/Secondaire/Antral) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

**Figure 15 : Marquage pour le facteur BMP-15 selon le stade de croissance folliculaire**

## 4. Variations de l'immunomarquage selon le stade du cycle œstral

Pour l'ensemble de cette partie, les résultats ont été considérés significativement différents lorsque  $p < 0,005$ . En effet, neuf comparaisons élémentaires ont été réalisées (comparaison de toutes les étapes du cycle œstral entre elles et de toutes les intensités de marquage entre elles) et la correction de Bonferroni a été appliquée en fixant un seuil de 5% comme critère acceptable pour la significativité de l'ensemble.

Les effectifs obtenus pour cette partie étant très faibles, peu de données ont pu être extrapolées statistiquement.

### A. GDF-9 (Annexes 3 et 4, Figures 16 et 17)

#### a. Evolution du marquage de GDF-9 dans les ovocytes (Figure 16)

Pour les follicules primaires, la proportion d'ovocytes marqués fortement est significativement plus importante en diœstrus qu'en anœstrus (100% avec N=10 vs 28,6% avec N=7).

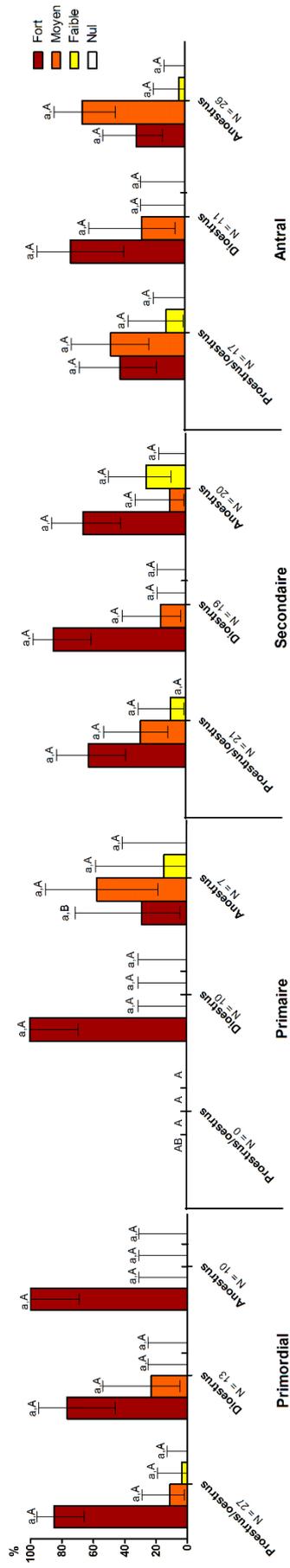
Sous réserve de la faible représentativité de l'échantillon, on pourrait alors supposer que la concentration de GDF-9 dans les ovocytes des follicules primaires diminue lors du passage du diœstrus à l'anœstrus.

#### b. Évolution du marquage de GDF-9 dans les follicules (Figure 17)

Pour le stade primaire, la proportion de follicules marqués fortement en proœstrus/œstrus et diœstrus est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués fortement en anœstrus (100% avec N=4 et 81,2% avec N= 16 respectivement vs 0% avec N=7). Inversement, la proportion de follicules marqués faiblement en anœstrus est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués faiblement en diœstrus (85,7% avec N=7 vs 0% avec N=16).

De plus, durant le diœstrus pour les follicules primaires, la proportion de follicules marqués fortement est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués faiblement (81,2% vs 0% avec N=16), et inversement en anœstrus (0% vs 85,7% avec N=7).

Sous réserve de la faible représentativité de l'échantillon, il semblerait que la concentration de GDF-9 dans les follicules primaires est plus importante en diœstrus et en proœstrus/œstrus qu'en anœstrus.

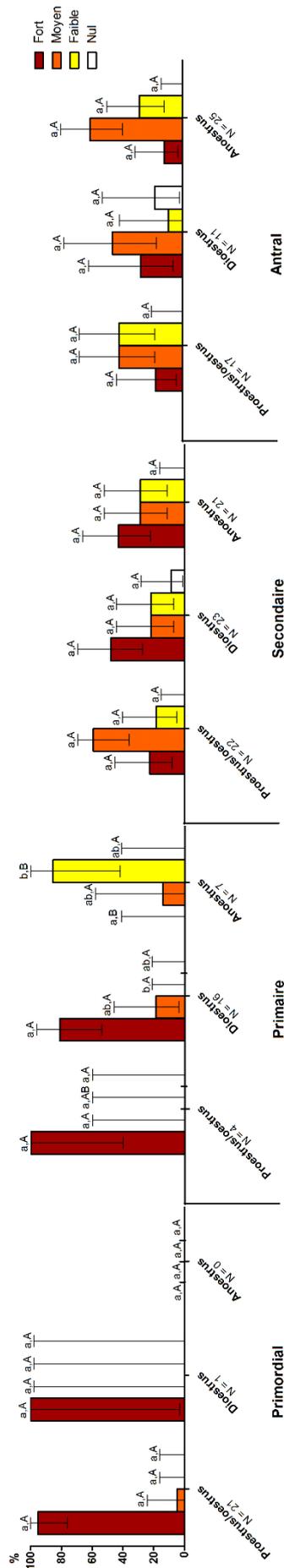


a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

**Figure 16 : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les ovocytes en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire**



a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

**Figure 17** : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire

## *B. BMP-15 (Annexes 5 et 6, Figures 18 et 19)*

### *a. Evolution du marquage de BMP-15 dans les ovocytes (Figure 18)*

Pour le stade primordial, la proportion d'ovocytes marqués fortement en proœstrus/œstrus est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués fortement en diœstrus (100% avec N=11 vs 35,7% avec N=14). Inversement, la proportion d'ovocytes marqués moyennement en diœstrus est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués moyennement en proœstrus/œstrus (64,3% avec N=14 vs 0% avec N=11).

De plus, durant le proœstrus/œstrus pour les follicules primordiaux, la proportion d'ovocytes marqués fortement est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués moyennement (100% vs 0% avec N=11), et inversement en diœstrus (35,7% vs 64,3% avec N=14).

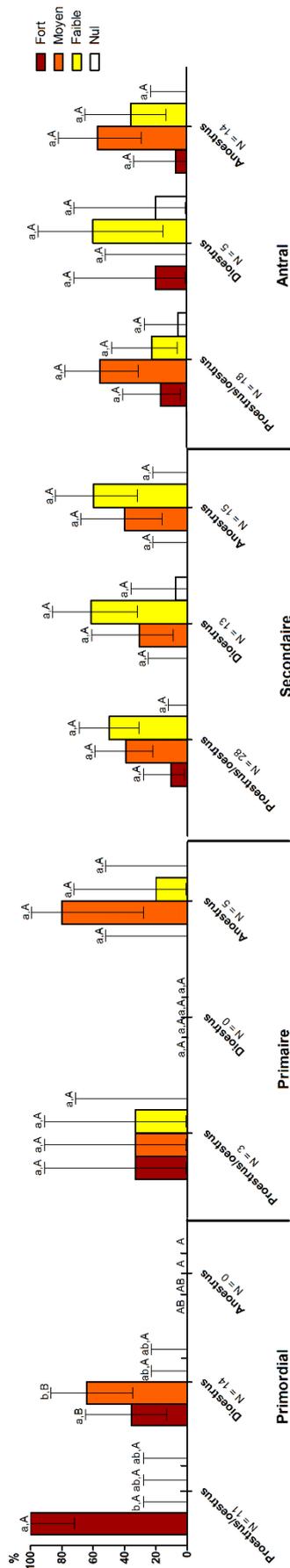
Sous réserve de la faible représentativité de l'échantillon, il semblerait que la concentration de BMP-15 dans les ovocytes des follicules primordiaux est plus importante en proœstrus/œstrus qu'en diœstrus.

### *b. Evolution du marquage de BMP-15 dans les follicules (Figure 19)*

Pour le stade primaire, la proportion de follicules marqués moyennement en diœstrus est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués moyennement en anœstrus (100% avec N=6 vs 0% avec N=5). Inversement, la proportion de follicules marqués faiblement en anœstrus est significativement plus importante que la proportion de follicules marqués faiblement en diœstrus (100% avec N=5 vs 0% avec N=6).

De plus, durant le diœstrus pour les follicules primaires, la proportion de follicules marqués moyennement est significativement plus importante que la proportion d'ovocytes marqués faiblement (100% vs 0% avec N=6), et inversement en anœstrus (0% vs 100% avec N=5).

Sous réserve de la faible représentativité de l'échantillon, il semblerait que la concentration de BMP-15 dans les follicules primaires est plus importante en diœstrus qu'en anœstrus.

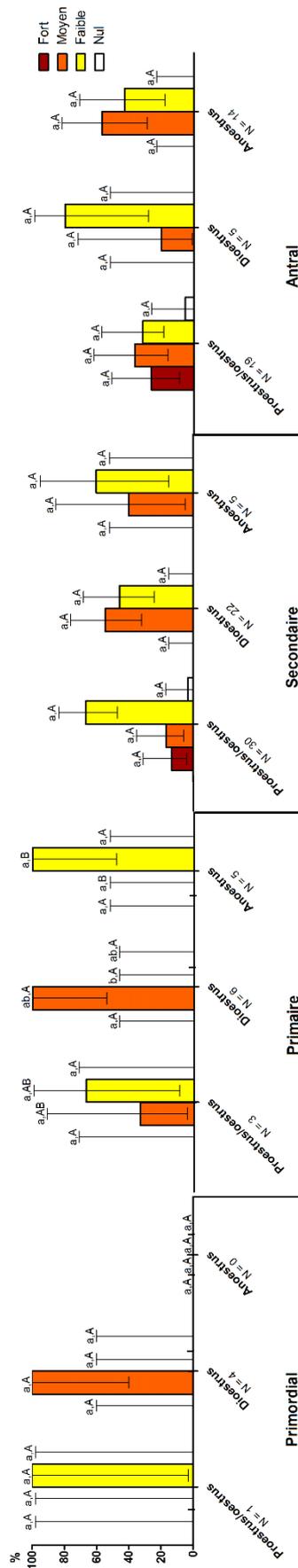


a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

**Figure 18 : Marquage pour le facteur BMP-15 dans les ovocytes en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire**



a, b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A, B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

**Figure 19** : Marquage pour le facteur BMP-15 dans les follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire



# DISCUSSION

## I. Protocole de réalisation des lames

### 1. Nombre d'ovaires disponibles

Un des points faibles de cette étude est le nombre réduit d'ovaires étudié. Nous avons à disposition 14 ovaires provenant de 14 chiennes, dont 3 ovaires en proœstrus, 2 ovaires en œstrus, 5 ovaires en diœstrus, 4 ovaires en anœstrus.

Un seul ovaire sur les deux présents chez chaque chienne a été étudié, car le deuxième ovaire était utilisé par une autre étude menée en parallèle. Le faible nombre de chiennes étudié était lié au temps limité de l'étude, ainsi qu'à l'approvisionnement irrégulier et en faible nombre des ovaires.

### 2. Nombre de coupes d'ovaires disponibles

Le nombre de coupes étudié par ovaire était également réduit, avec un total de quatre coupes par ovaire. Parmi ces quatre coupes, une coupe était consacrée au facteur GDF-9, une autre au facteur BMP-15 et les deux dernières aux contrôles négatifs respectifs.

Le nombre limité de coupes étudié était imposé par la limite de temps de l'étude. En effet, le temps dédié à l'étude elle-même était restreint à quelques semaines, et la technique d'immunohistochimie était longue à réaliser et l'observation des lames au microscope était chronophage.

Idéalement, il aurait été intéressant de réaliser des coupes sériées des ovaires. Cette technique aurait permis d'augmenter le nombre de follicules étudié et d'être plus représentatif de chaque population folliculaire.

### 3. Choix de la technique

La technique d'immunohistochimie a été choisie afin de pouvoir localiser facilement les protéines des facteurs GDF-9 et BMP-15 dans les ovocytes et les follicules. Cette technique a été choisie aussi car elle permet de réaliser une étude semi-quantitative des variations d'expression des deux facteurs.

D'autres techniques auraient pu être réalisées mais ne correspondaient pas à nos critères. L'hybridation *in situ* aurait permis de détecter la localisation des ARNm de GDF-9 et BMP-15 dans les tissus, et il aurait été possible de réaliser une étude semi-quantitative. La RT-PCR aurait permis une étude quantitative des ARNm de GDF-9 et BMP-15 contenus dans les ovocytes et les cellules folliculaires, mais sans avoir accès à la localisation des ARNm au sein du tissu. Toutefois, ces deux techniques étudient les ARNm des facteurs et non les

protéines. Il est possible que ces ARNm soient stockés sans être traduits directement, ou qu'ils soient traduits mais que les protéines ne subissent pas le clivage protéolytique qui permet leur activation biologique.

Il aurait également été possible d'utiliser la cytométrie en flux afin de quantifier les protéines GDF-9 et BMP-15, mais cette technique n'aurait pas permis d'avoir la localisation des facteurs au sein du tissu ovarien.

## II. Résultats

### 1. Localisation des facteurs GDF-9 et BMP-15

Le premier objectif de ce travail était de localiser les facteurs GDF-9 et BMP-15 dans les follicules et ovocytes chez la chienne au cours de la folliculogénèse. Chez les autres espèces mammifères étudiées, il existe en effet des variations interspécifiques de la localisation de ces deux facteurs et une expression variable au cours de la folliculogénèse.

Chez le porc (Sun *et al.*, 2010), les protéines GDF-9 et BMP-15 sont présentes à tous les stades de la folliculogénèse. Chez la souris (FitzPatrick *et al.*, 1998 ; Otsuka *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2010) et la chèvre (Silva *et al.*, 2005), elles sont présentes seulement à partir du stade primaire.

Chez la plupart des espèces, GDF-9 et BMP-15 sont localisés à la fois dans l'ovocyte et dans les cellules de la granulosa (porc, Sun *et al.*, 2010 ; chèvre, Silva *et al.*, 2005 ; vache, Hosoe *et al.*, 2011 ; Homme, Aaltonen *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 2010).

Chez la souris, on pensait jusqu'à présent que GDF-9 et BMP-15 étaient localisés uniquement dans les ovocytes (FitzPatrick *et al.*, 1998 ; Otsuka *et al.*, 2000). Toutefois, une étude plus récente montre que BMP-15 est aussi localisé dans les cellules de la granulosa des follicules antraux (Sun *et al.*, 2010).

Chez la chienne, peu de travaux sont disponibles sur ce sujet. Une étude montre que GDF-9 est présent dans l'ovocyte et les cellules du cumulus des follicules antraux (De Los Reyes *et al.*, 2013) et BMP-15 dans les cellules folliculaires des follicules antraux (Fernandez *et al.*, 2016). Toutefois, la localisation de ces deux facteurs au cours de la folliculogénèse n'a pas été étudiée à ce jour.

D'après notre étude, les facteurs GDF-9 et BMP-15 sont localisés à la fois dans le cytoplasme des ovocytes et dans les cellules folliculaires du stade primordial jusqu'au stade antral inclus et ce, quelle que soit le stade du cycle œstral. Ces résultats viennent donc compléter les études précédentes sur l'expression de ces deux facteurs dans les follicules canins.

Leur présence chez la chienne depuis le stade primordial jusqu'au stade antral suggère qu'ils pourraient jouer un rôle important à plusieurs stades de la folliculogénèse canine.

L'expression de GDF-9 et BMP-15 dans les follicules primordiaux pourrait suggérer qu'ils jouent un rôle dans la croissance et le développement des follicules primordiaux chez la

chienne. Des études chez d'autres espèces rapportent un rôle de GDF-9 dans la formation folliculaire et la croissance des follicules primordiaux (Mandon-Pepin *et al.*, 2003 ; Juengel *et al.*, 2004a ; Wang et Roy, 2004 ; Martins *et al.*, 2008). En effet, l'injection dans des ovaires de porc d'ADNc de GDF-9 promeut la croissance des follicules primordiaux (Martins *et al.*, 2008), et chez le hamster, il y a une augmentation de la proportion d'ovocytes entamant la croissance folliculaire pour des ovaires collectés avant la naissance et cultivés dans un milieu contenant du GDF-9 (Wang et Roy, 2004, 2006).

L'expression de GDF-9 et BMP-15 jusqu'au stade antral suggère qu'ils jouent peut-être aussi un rôle dans l'acquisition de la compétence méiotique de l'ovocyte et l'ovulation. Chez d'autres espèces, des études permettent de soutenir ces hypothèses. GDF-9 possède en effet un rôle dans l'expansion des cellules du cumulus chez la souris (Elvin *et al.*, 1999b) et semble diminuer le taux d'ovulation chez la femme, puisque des mutations sur *gdf-9* ont été détectées chez des patientes avec un taux d'ovulation augmenté (Palmer *et al.*, 2006). BMP-15 joue lui un rôle dans l'ovulation chez la souris et la brebis, en augmentant le taux d'ovulation chez la souris et en le diminuant chez la brebis (Yan *et al.*, 2001 ; Juengel *et al.*, 2002).

## **2. Variations d'expression des facteurs GDF-9 et BMP-15 au cours de la folliculogénèse**

Le second objectif de ce travail était d'étudier les variations d'expression des facteurs GDF-9 et BMP-15 au cours de la folliculogénèse, afin de savoir s'ils pourraient jouer un rôle plutôt dans la folliculogénèse basale, terminale ou l'ovulation. Les variations ont aussi été étudiées selon les stades du cycle œstral afin de voir si l'environnement hormonal possède une influence sur l'expression de ces deux facteurs.

Chez le porc (Prochazka *et al.*, 2004), le rat (Erickson et Shimazaki, 2003) et la brebis (Kona *et al.*, 2016), des techniques d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont montré que l'expression de GDF-9 diminue au cours de la folliculogénèse et des étapes de MIV. L'expression de BMP-15 diminue également chez le porc et la brebis, mais pas chez le rat (Erickson et Shimazaki, 2003 ; Prochazka *et al.*, 2004 ; Kona *et al.*, 2016). On observe au contraire chez la femme une augmentation de l'expression de GDF-9 et BMP-15 durant la maturation de l'ovocyte (Li *et al.*, 2014).

L'expression de ces deux facteurs varie donc différemment selon les espèces au cours de la folliculogénèse, bien que les variations des concentrations des protéines GDF-9 et BMP-15 ne soient pas disponibles d'après ces études.

Chez la chienne, la concentration de la protéine GDF-9 diminue au cours de la maturation *in vitro* des complexes cumulus-ovocyte et est corrélée négativement avec l'expansion du cumulus (De Los Reyes *et al.*, 2013). Fernandez *et al.* (2016) montrent que les concentrations des protéines GDF-9 et BMP-15 varient au cours de la folliculogénèse terminale et selon l'étape du cycle œstral chez la chienne. La quantité de GDF-9 diminue durant la croissance des follicules antraux en anœstrus et proœstrus/œstrus, tandis que sa

quantité augmente au début de la croissance des follicules antraux en diœstrus. Pour BMP-15, sa quantité augmente durant la folliculogénèse terminale au cours de l'anœstrus, mais elle diminue en revanche au cours du proœstrus/œstrus, et reste stable durant le diœstrus.

Palomino et De Los Reyes (2016) ont travaillé sur l'expression des ARNm de GDF-9 et BMP-15 au cours de la folliculogénèse du stade préantral à antral. D'après eux, l'expression de GDF-9 dans les cellules folliculaires et les ovocytes diminue au cours de la croissance folliculaire pour toutes les étapes du cycle œstral. L'expression de BMP-15 dans les ovocytes augmente au cours de la folliculogénèse terminale pour toutes les étapes du cycle œstral, mais en revanche des variations existent selon l'étape du cycle œstral pour les cellules folliculaires : l'expression de BMP-15 augmente durant la folliculogénèse en anœstrus, et est plutôt stable en proœstrus/œstrus et diœstrus.

Toutefois, les variations des concentrations protéiques de GDF-9 et BMP-15 au cours de l'ensemble des stades de la folliculogénèse n'a pas été étudiée à ce jour chez la chienne. De plus, bien que les variations des concentrations en ARNm de GDF-9 et BMP-15 aient déjà été étudiées pour cette espèce, il est possible que ces ARNm soient stockés dans les cellules sans être traduits immédiatement en protéines, ou que la protéine ne subisse pas de clivage protéolytique pour l'activer. L'étude des variations des concentrations protéiques de GDF-9 et BMP-15 par immunohistochimie permet donc de compléter les données actuellement disponibles.

D'après notre étude, l'expression de GDF-9 et BMP-15 varie au cours de la folliculogénèse et selon le stade du cycle œstral.

La quantité de GDF-9 dans les ovocytes diminue au cours de la folliculogénèse à partir du stade antral, et cette diminution s'opère à partir du stade secondaire pour les cellules folliculaires. Pour BMP-15, on observe une diminution marquée dans les ovocytes à partir du stade primaire, et en revanche on n'observe aucune variation de la quantité de BMP-15 pour les cellules folliculaires.

Concernant les variations au cours du cycle œstral, le nombre réduit d'effectif et leur faible représentativité nous permettent seulement de suggérer certaines tendances.

GDF-9 semble ainsi plus fortement exprimé dans les ovocytes des follicules primaires en diœstrus qu'en anœstrus, et plus fortement exprimé dans les cellules folliculaires des follicules primaires en diœstrus et proœstrus/œstrus qu'en anœstrus. Pour BMP-15, son expression semble plus marquée en proœstrus/œstrus qu'en diœstrus pour les ovocytes des follicules primordiaux, et en diœstrus pour les cellules folliculaires des follicules primaires par rapport à l'anœstrus.

L'expression décroissante de GDF-9 dans les ovocytes et cellules folliculaires au cours de la folliculogénèse concorde avec les résultats des autres études chez la chienne (De Los Reyes *et al.*, 2013 ; Fernandez *et al.*, 2016 ; Palomino et De Los Reyes, 2016). Dans l'étude de Palomino et De Los Reyes (2016) étudiant les variations d'expression des ARNm dans les follicules pré-antraux à antraux, la diminution s'opère dès le stade préantral, ce qui est cohérent avec nos résultats où la diminution des concentrations protéiques s'opère à partir du stade secondaire pour les cellules folliculaires, et du stade antral pour les ovocytes. On

retrouve une telle diminution de l'expression de GDF-9 pour d'autres espèces comme le rat (Jaatinen *et al.*, 1999) et la brebis (Kona *et al.*, 2016). En revanche, ce schéma d'expression semble différer de celui de la femme où on observe au contraire une augmentation de l'expression de GDF-9 au cours des procédés de maturation ovocytaire *in vitro* (Li *et al.*, 2014).

Ces résultats pourraient suggérer que GDF-9 chez la chienne joue surtout un rôle dans la folliculogénèse basale, et un rôle moindre dans la folliculogénèse terminale. Des études chez d'autres espèces montrent en effet que GDF-9 est essentiel pour la folliculogénèse basale (Otsuka *et al.*, 2000 ; Vitt *et al.*, 2000b), avec des follicules arrêtés au stade primaire pour les animaux déficients en GDF-9 (Dong *et al.*, 1996 ; Hanrahan *et al.*, 2004).

La diminution de l'expression de BMP-15 dans les ovocytes à partir du stade primaire et l'absence de variation pour les cellules folliculaires diffèrent en revanche des résultats de Palomino et De Los Reyes (2016). Dans leur étude, ils observent en effet une augmentation de l'expression de BMP-15 au cours de la folliculogénèse. Ces variations pourraient être liées aux techniques d'analyse différentes, puisque qu'ils étudient les concentrations d'ARNm tandis que nous étudions les concentrations protéiques.

Chez les autres espèces, on observe une diminution de l'expression des ARNm de BMP-15 chez la brebis (Kona *et al.*, 2016) et une augmentation de l'expression de BMP-15 chez la femme (Li *et al.* 2014). Les schémas d'expression de BMP-15 sont donc variables selon les espèces.

Il est donc nécessaire d'effectuer d'autres études chez la chienne afin de savoir si BMP-15 pourrait participer à la folliculogénèse terminale pour cette espèce. Nos résultats suggèrent en revanche que BMP-15 jouerait lui aussi un rôle dans la folliculogénèse basale, ce que l'on retrouve chez d'autres espèces. En effet chez la souris, la folliculogénèse basale est accélérée quand BMP-15 est surexprimé (McMahon *et al.*, 2008), et BMP-15 est également essentiel à la folliculogénèse basale chez la femme et la brebis (Galloway *et al.*, 2000 ; Di Pasquale *et al.*, 2004 ; Hanrahan *et al.*, 2004).

Enfin, pour un stade folliculaire donné, on observe une expression plus importante de GDF-9 dans les cellules folliculaires des follicules primaires en diœstrus et proœstrus/œstrus qu'en anœstrus, et une expression plus importante dans les ovocytes en diœstrus qu'en anœstrus. Pour BMP-15, l'expression est supérieure dans les ovocytes des follicules primordiaux en proœstrus/œstrus qu'en diœstrus, et dans les cellules folliculaires des follicules primaires en diœstrus qu'en anœstrus. On observe donc globalement une expression plus forte des deux facteurs en diœstrus et proœstrus/œstrus pour les stades folliculaires primordiaux et primaires par rapport à l'anœstrus.

Ces résultats semblent diverger des études de Fernandez *et al.* (2016) et Palomino et De Los Reyes (2016), où les facteurs sont exprimés en plus grande quantité lors de l'anœstrus. Cette différence de résultats pourrait être liée aux techniques d'analyse différentes, ainsi qu'à notre effectif réduit de follicules.

Nos résultats ne soutiennent donc pas à ce niveau l'hypothèse de Fernandez *et al.* (2016) et Palomino et De Los Reyes (2016) selon laquelle l'augmentation de GDF-9 et BMP-

15 en anœstrus est liée à leur rôle dans la sélection des follicules et l'initiation de la folliculogénèse.

### **III. Perspectives de l'étude**

Notre étude a permis d'établir la localisation de GDF-9 et BMP-15 dans les ovocytes et follicules au cours de la folliculogénèse, et ce pour chaque stade du cycle œstral. Nous avons ainsi montré que GDF-9 et BMP-15 sont tous les deux exprimés dans les cellules folliculaires et les ovocytes à tous les stades folliculaires chez la chienne.

Nous avons montré qu'il existait des variations de l'expression de ces facteurs selon le stade du cycle œstral. Toutefois, la faible représentativité de notre échantillon nous permet seulement d'établir certaines tendances, avec une expression qui semble plus importante en diœstrus et proœstrus/œstrus pour les stades folliculaires primordiaux et primaires par rapport à l'anœstrus. Ces résultats divergent des études disponibles chez la chienne (Fernandez *et al.*, 2016 ; Palomino et De los Reyes, 2016).

Il serait donc intéressant de réaliser une étude avec un nombre important de follicules afin d'établir clairement les variations d'expression des protéines GDF-9 et BMP-15 au cours du cycle œstral. Il serait également intéressant d'explorer l'effet de la FSH et de la LH sur l'expression de GDF-9 et BMP-15 chez la chienne.

Enfin, à présent que nous avons montré que GDF-9 et BMP-15 étaient exprimés à tous les stades de la folliculogénèse, il serait intéressant d'étudier en particulier leur rôle dans la folliculogénèse et l'ovulation chez la chienne. Des études d'immunisation contre GDF-9 et BMP-15 par exemple permettraient d'étudier leur rôle chez cette espèce.

A terme, la connaissance du rôle exact de GDF-9 et BMP-15 pourrait nous permettre d'augmenter ou de diminuer leur concentration afin de favoriser la maturation des ovocytes *in vitro*.

## CONCLUSION

Malgré l'intérêt de développer des techniques de reproduction assistée chez la chienne pour la médecine humaine et pour la sauvegarde d'espèces, les recherches se heurtent aux particularités de l'ovocyte canin. Une des particularités majeures est le blocage de l'ovocyte en stade prophase I de méiose à l'ovulation, avec le passage au stade métaphase II seulement après une période de 48-72h passée dans l'oviducte.

Au cours des dernières années, les facteurs de croissance GDF-9 et BMP-15 ont été décrits chez plusieurs espèces comme des facteurs clés pour la folliculogénèse et l'ovulation. Il paraissait intéressant dans ce contexte d'étudier la localisation de ces deux facteurs au cours de la folliculogénèse chez la chienne.

Notre étude a permis d'établir une cartographie de l'expression de GDF-9 et de BMP-15 dans les follicules canins. Ces facteurs sont tous les deux exprimés dans les cellules folliculaires et les ovocytes à tous les stades folliculaires, et pour tous les stades du cycle œstral.

Nous avons aussi montré que leur expression diminue au cours de la folliculogénèse. Ce résultat confirme les données disponibles chez la chienne pour GDF-9, suggérant un possible rôle dans la folliculogénèse basale pour cette espèce. En revanche, les résultats obtenus pour BMP-15 divergent des résultats des études disponibles chez la chienne.

Nous avons enfin montré qu'il existait des variations d'expression selon les stades du cycle œstral. Toutefois, la faible représentativité de notre échantillon nous permet seulement d'établir certaines tendances, qui seront à confirmer avec des études menées avec un plus grand nombre d'ovaires.

Cette étude soulève plusieurs questions. Sachant que GDF-9 et BMP-15 sont exprimés à tous les stades de la folliculogénèse, mais avec une expression décroissante au cours de celle-ci, il serait intéressant d'étudier s'ils jouent un rôle dans la folliculogénèse et l'ovulation chez la chienne. Des études d'immunisation contre GDF-9 et BMP-15 par exemple nous permettraient d'étudier leur rôle chez cette espèce.

Il serait aussi intéressant de savoir si d'autres facteurs sont impliqués dans la maturation ovocytaire et dans l'ovulation chez la chienne. L'étude des follicules polyovocytaires chez la chienne semble intéressante à ce point de vue. En effet, les facteurs responsables de la sélection intrafolliculaire d'un seul ovocyte parmi les nombreux ovocytes présents dans un même follicule restent à ce jour inconnus.



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Sylvie CHASTANT, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **MAUPEU Diane** intitulée « **Expression des facteurs de croissance Growth différentiation factor-9 (GDF-9) et Bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) au cours de la folliculogénèse chez la chienne** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



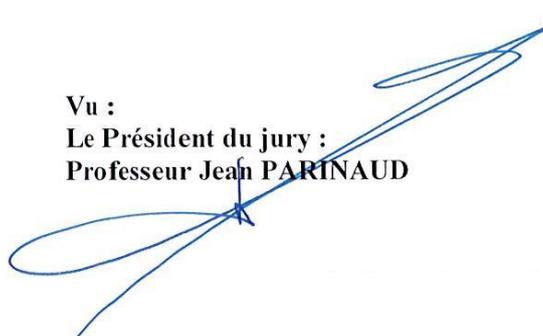
**Ecole Nationale Vétérinaire  
de Toulouse**  
Reproduction  
23 chemin des Capelles  
31076 TOULOUSE cedex 03  
France

Fait à Toulouse, le 22 mai 2015  
Professeur Sylvie CHASTANT  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



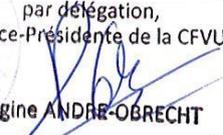
Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN

Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Jean PARINAUD



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.



## BIBLIOGRAPHIE

AALTONEN J, LAITINEN MP, VUOJOLAINEN K, JAATINEN R, HORELLI-KUITUNEN N, SEPPA L, LOUHIO H, TUURI T, SJOBERG J, BUTZOW R, HOVATTA O, DALE L, RITVOS O (1999). Human Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 2744–2750.

ACKERT CL, GITTENS JEI, O'BRIEN MJ, EPPIG JJ, KIDDER GM (2001) Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Develop. Biol.*, **233**, 258–270.

ALBERTINI DF, COMBELLES CM, BENECCHI E, CARABATSOS MJ (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, **121**, 647–653.

AL-MUFTI W, BOMSEL-HELMREICH O, CHRISTIDES JP (1988). Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. *J Reprod Fertil.*, **82**, 15-25.

ANDERSEN AC, SIMPSON ME (1973). The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle), Geron-X Inc., Los Altos.

ANDERSON E, ALBERTINI DF (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovar. *J. Cell. Biol.*, **71**, 680–686.

APPARICIO M, MOSTACHIO G, MOTHEO T, ALVES A, PADILHA-NAKAGHI L, MACENTE B, PIRES-BUTLER E, MATTOS JR, LUVONI G, VICENTE W (2016). Spermatozoa co-culture does not improve oocyte maturation rates in dog. ISCFR -EVSSAR, 22-25 juin, 2016, Paris, France, p. 98.

ATTISANO L, WRANA JL (1998). Signal transduction by TGF-beta superfamily. *Curr Opin Cell Biol.*, **10**, 188-194.

BARBER MR, LEE SM, STEFFENS WL, ARD M, FAYRER-HOSKEN RA (2001). Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*, **55**, 1705–1717.

BODENSTEINER KJ, CLAY CM, MOELLER CL, SAWYER HR (1999). Molecular cloning of the ovine Growth Differentiation Factor-9 gene and expression of Growth Differentiation Factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.*, **60**, 381–386.

BOLAMBA D, BORDEN-RUSS KD, DURRANT BS (1998). In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, **49**, 933–942.

BOLAMBA D, RUSS KD, OLSON MA, SANDLER JL, DURRANT BS (2002). In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, **58**, 1689–1703.

BOLAMBA D, RUSS KD, HARPER SA, SANDLER JL, DURRANT BS (2006). Effects of Epidermal Growth Factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology*, **65**, 1037–1047.

- BRAW-TAL R, MCNATTY KP, SMITH P, HEATH DA, HUDSON NL, PHILLIPS DJ, MCLEOD BJ, DAVIS GH (1993). Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (FecX1) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biol. Reprod.*, **49**, 895–907.
- BUCCIONE R, VANDERHYDEN BC, CARON PJ, EPPIG JJ (1990). FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*, **138**, 16–25.
- BYSTED BV, DIELEMAN SJ, HYTTEL P, GREVE T (2001). Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.*, **57**, 181-186.
- CARABATSOS MJ, LEVIN J, MATZUK MM, ALBERTINI DF (1998). Characterization of oocyte and follicle development in Growth Differentiation Factor-9-deficient mice. *Dev. Biol.* **204**, 373–384.
- CASTRILLON DH, MIAO L, KOLLIPARA R, HORNER JW, DEPINHO RA (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, **301**, 215-218.
- CECCONI S, COLONNA R (1996). Influence of granulosa cells and of different somatic cell types on mammalian oocyte development in vitro. *Zygote*, **4**, 305–307.
- CHANG H, BROWN CW, MATZUK MM (2002). Genetic analysis of the mammalian Transforming Growth Factor- $\beta$  superfamily. *Endocr. Rev.*, **23**, 787–823.
- CHASTANT-MAILLARD S, REYNAUD K, SAINT-DIZIER M. (2014). Particularités de la reproduction chez la chienne. In: *La reproduction animale et humaine*. Versailles : Editions Quae, p. 609-623.
- CHOI Y, RAJKOVIC A (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 579-590.
- CONCANNON PW, MCCANN JP, TEMPLE M (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy, and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, **39** (Suppl.), 3–25.
- CONCANNON PW (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reprod. Domest. Anim.*, **44** Suppl 2, 3-15.
- CONCANNON PW (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim.Reprod. Sci.*, **124**, 200–210.
- DAVIS GH, MCEWAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, FARQUHAR PA (1991). Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biol. Reprod.*, **44**, 620–624.
- DAVIS GH, MCEWAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, MCNATTY KPO-WS (1992). Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biol. Reprod.*, **46**, 636–640.

- DAVIS GH, DODDS KG, MCEWAN JC, FENNESSY PF (1993). Liveweight, fleece weight and prolificacy of Romney ewes carrying the Inverdale prolificacy gene (FecXI) located on the X-chromosome. *Liv. Prod. Sci.*, **34**, 83–91.
- DE GIER J, KOOISTRA HS, DJAJADININGRAT-LAANEN SC, DIELEMAN SJ, OKKENS AC (2006). Differential regulation of the secretion of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology*, **66** (6-7), 1419-1422.
- DE LA VILLEON G (2007). *La maturation ovocytaire chez la chienne : description de la reprise de méiose et rôle des cellules de la granulosa*. Thèse de doctorat vétérinaire, Paris-XII, 95 p.
- DE LOS REYES M, DE LANGE J, MIRANDA P, PALOMINO J, BARROS C (2005). Effect of human Chorionic Gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, **64**, 1–11.
- DE LOS REYES M, ROJAS C, PARRAGUEZ V-H, PALOMINO J (2013). Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) during in vitro maturation in canine oocytes. *Theriogenology*, **80**, 587–596.
- DI PASQUALE E, BECK-PECCOZ P, PERSANI L (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*, **75**, 106–111.
- DONG J, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, RAJENDRA KUMAR T, LU N, MATZUK MM (1996). Growth Differentiation Factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, **383**, 531–535.
- DUBE J-L, WANG P, ELVIN J, LYONS K-M, CELESTE A-J, MATZUK M-M (1998). The Bone Morphogenetic Protein-15 gene is x-linked and expressed in oocytes. *J. Mol. Endocrinol.*, **12**, 1809–1817.
- EL-FOULY MA, COOK B, NEKOLA M, NALBANDOV AV (1970). Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology*, **87**, 288–293.
- ELVIN JA, YAN C, WANG P, NISHIMORI K, MATZUK MM (1999a). Molecular characterization of the follicle defects in the Growth Differentiation Factor 9-deficient ovary. *Mol. Endocrinol.*, **13**, 1018–1034.
- ELVIN JA, CLARK AT, WANG P, WOLFMAN NM, MATZUK MM (1999b). Paracrine actions of Growth Differentiation Factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.*, **13**, 1035–1048.
- ELVIN JA, YAN C, MATZUK MM (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **159**, 1–5.
- ENGLAND GC, VERSTEGEN JP, HEWITT DA (2001). Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. *Vet. Rec.*, **148**, 20–22.

- ENGLAND GC, RUSSO M, FREEMAN SL (2009). Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. *Reprod. Domest. Anim.*, **44**, 53-58.
- EPPIG JJ (1991). Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays*, **13**, 569-574.
- ERICKSON GF, SHIMASAKI S (2003). The spatiotemporal expression pattern of the Bone Morphogenetic Protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **5**, 1-9.
- FITZPATRICK SL, SINDONI DM, SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERCHENTHALER IJ, FRAIL DE (1998). Expression of Growth Differentiation Factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*, **139**, 2571-2578.
- FERNANDEZ T, PALOMNIO J, PARRAGUEZ V-H, PERALTA O, DE LOS REYES M (2016). Differential expression of GDF-9 and BMP- 15 during follicular development in canine ovaries evaluated by flowcytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, **167**, 59-67.
- GALLOWAY SM, MCNATTY KP, CAMBRIDGE LM, LAITINEN MPE, JUENGEL JL, JOKIRANTA S, MCLAREN RJ, LUIRO K, DODDS KG, MONTGOMERY GW, BEATTIE AE, DAVIS GH, RITVOS O (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.*, **25**, 279-283.
- GONCALVES JS, VANNUCCHI CI, BRAGA FC, PAULA-LOPES FF, MILAZZOTTO MP, ASSUMPCAO ME, VISINTIN JA (2009). Oestrogen and progesterone receptor gene expression in canine oocytes and cumulus cells throughout the oestrous cycle. *Reprod. Domest. Anim.*, **44** (2), 239-242.
- GULER A, POULIN N, MERMILLOD P, TERQUI M, COGNIE Y (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, **54**, 209-218.
- HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN M, DAVIS GH, POWELL R, GALLOWAY SM (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.*, **70**, 900-909.
- HARTMAN CG (1926). Polynuclear ova and polyovular follicles in the opossum and other mammals with special reference to the problem of fecundity. *Am J Anat.*, **37**, 1-52.
- HAYASHI M, MCGEE EA, KLEIN C, ROSE UM, VAN DUIN M, HSUEH AJW (1999). Recombinant Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, **140**, 1236-1244.
- HERTIG AT, ADAMS EC (1967). Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. *J. Cell. Biol.*, **34**, 647-675.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW (1997). Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil.*, **51** (Suppl.), 83-91.

- HEWITT DA, ENGLAND GCW (1999a). Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Vet. Rec.*, **144**, 237–239.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW (1999b). Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, **55**, 63–75.
- HEWITT DA, WATSON PF, ENGLAND GCW (1998). Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, **49**, 1083–1101.
- HOSOE M, KANEYAM K, USHIZAWA K, HAYASHI K, TAKAHASHI T (2011). Quantitative analysis of Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP15) and Growth Differentiation Factor-9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, **15**, 9 -33.
- HREINSSON JG, SCOTT JE, RASMUSSEN C, SWAHN ML, HSUEH AJW, HOVATTA O (2002). Growth Differentiation Factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 316–321.
- HUANG EJ, MANOVA K, PACKER AI, SANCHEZ S, BACHVAROVA RF, BESMER P (1993). The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev. Biol.*, **157**, 100-109.
- JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ MV, OLSON PNS (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- JUENGEL JL, HUDSON NL, HEATH DA, SMITH P, READER KL, LAWRENCE SB, O'CONNELL AR, LAITINEN MPE, CRANFIELD M, GROOME NP, RITVOS O, MCNATTY KP (2002). Growth Differentiation Factor-9 and Bone Morphogenetic Protein-15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.*, **67**, 1777–1789.
- JUENGEL JL, HUDSON NL, WHITING L, MCNATTY KP (2004). Effects of immunization against Bone Morphogenetic Protein-15 and Growth Differentiation Factor-9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, **70**, 557–561.
- JUENGEL JL, BODENSTEINER KJ, HEATH DA, HUDSON NL, MOELLER CL, SMITH P, GALLOWAY SM, DAVIS GH, SAWYER HR, MCNATTY KP (2004a). Physiology of GDF-9 and BMP-15 signalling molecules. *Anim. Reprod. Sci.*, **82–83**, 447–460.
- JUENGEL JL, HUDSON NL, WHITING L, MCNATTY KP (2004b). Effects of Immunization Against Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 on Ovulation Rate, Fertilization, and Pregnancy in Ewes. *Biol. Reprod.*, **70**, 557-561.
- KAIVO-OJA N, BONDESTAM J, KAMARAINEN M, KOSKIMIES J, VITT U, CRANFIELD M, VUOJOLAINEN K, KALLIO JP, OLKKONEN VM, HAYASHI M, MOUSTAKAS A, GROOME NP, TEN DIJKE P, HSUEH AJW, RITVOS O (2003). Growth Differentiation Factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **88** (2), 755–762.
- KENNEDY WP (1924). The Occurrence of Polyovular Graafian Follicles. *J Anat.*, **58**, 328- 334.

- KIDDER GM, MHAWI AA (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, **123**, 613–620.
- KIDDER GM, VANDERHYDEN BC (2010). Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol*, **88**, 399–413.
- KIM MK, FIBRIANTO YH, OH HJ, JANG G, KIM HJ, LEE KS, KANG SK, LEE BC, HWANG WS (2004). Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol or Epidermal Growth Factor supplementation on in vitro maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of the estrus cycle. *J. Vet. Sci.*, **5**, 253–258.
- KIM MK, FIBRIANTO YH, OH HJ, JANG G, KIM HJ, LEE KS, KANG SK, LEE BC, HWANG WS (2005). Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, **63**, 1342–1353.
- KINGSLEY DM (1994). The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.*, **8**, 133–146.
- KIRKNESS EF, BAFNA V, HALPERN AL, LEVY S, REMINGTON K, RUSCH DB, DELCHER AL, POP M, WANGW, FRASER CM, VENTER JC (2003). The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*, **301**, 1898–1903.
- KONA SSR, CHAKRAVARTHI VP, KUMAR AVN, SRIVIDYA SD, PADMAJA K, RAO V (2016). Quantitative expression patterns of GDF-9 and BMP-15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology*, **85**, 315–22.
- LAITINEN M, VUOJOLAINEN K, JAATINEN R, KETOLA I, AALTONEN J, LEHTONEN E, HEIKINHEIMO M, RITVOS O (1998). A novel Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech. Dev.*, **78**, 135–140.
- LAN ZJ, GU P, XU X, JACKSON KJ, DEMAYO FJ, O'MALLEY BW, COONEY AJ (2003). GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J.*, **22**, 4070-4081.
- LI Y, LI RQ, OU SB, ZHANG NF, REN L, WEI LN, ZHANG QX, YANG DZ (2014). Increased GDF-9 and BMP-15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod Biol Endocrinol*, **12**, 81.
- LIN SY, MORRISON JR, PHILLIPS DJ, DE KRETZER DM (2003). Regulation of ovarian function by the TGF- $\beta$  superfamily and follistatin. *Reproduction*, **126**, 133–148.
- LONERGAN P, MONAGHAN P, RIZOS D, BOLAND MP, GORDON I (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*, **37**, 48-53.
- LONERGAN P, CAROLAN C, VAN LANGENDONCKT A, DONNAY I, KHATIR H, MERMILLOD P (1996). Role of Epidermal Growth Factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.*, **54**, 1420-1429.

- LUVONI GC, LUCIANO AM, MODINA S, 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.*, **57** (Suppl.), 141–146.
- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D, PEREGO L (2002). Extension of incubation time in a two step culture system for the maturation of canine oocytes. Congrès EVSSAR, 10-12 mai, 2002, Liège, Belgique, p. 121-122.
- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D (2003). Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod. Dom. Anim.*, **38**, 410–414.
- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D (2005). Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, **63**, 41-59.
- MAHI CA, YANAGIMACHI R (1976). Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.*, **196**, 189–196.
- MANDON-PEPIN B, OUSTRY-VAIMAN A, VIGIER B, PIUMI F, CRIBIU E, COTINOT C (2003). Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. *Biol. Reprod.*, **68**, 985–995.
- MARTINS FS, CELESTINO JJ, SARAIVA MV, MATOS MH, BRUNO JB, ROCHA-JUNIOR CM, LIMA-VERDE IB, LUCCI CM, BAO SN, FIGUEIREDO JR (2008). Growth and Differentiation Factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reprod Fertil Dev*, **20**, 916–924.
- MASSAGUE J, CHEN YG (2000). Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev.*, **14**, 627-644.
- MAZERBOURG S, KLEIN C, ROH J, KAIVO-OJA N, MOTTERSHEAD DG, KORCHYNSKYI O, RITVOS O, HSUEH AJ (2004). Growth Differentiation Factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 653–665.
- MCDUGALL K, HAY MA, GOODROWE KL, GARTLEY CJ, 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.
- MCGRATH SA, ESQUELA AF, LEE SJ (1995). Oocyte-specific expression of Growth Differentiation Factor-9. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 131-136.
- MCINTOSH CJ, LAWRENCE S, SMITH P, JUENGEL J, MCNATTY K (2012). Active immunization against the proregions of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice. *Reproduction*, **143**, 195-201.
- MCMAHON HE, HASHIMOTO O, MELLON PL, SHIMASAKI S (2008). Oocyte-specific overexpression of mouse Bone Morphogenetic Protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology*, **149**, 2807–2815.

- MITCHELL PA, BURGHARDT RC (1986) The ontogeny of nexuses (gap junctions) in the ovary of the fetal mouse. *Anat Rec*, **214**, 283-288.
- MONNIAUX D, CARATY A, CLÉMENT F, DALBIÈS-TRAN R, DUPONT J, FABRE S, GÉRARD N, MERMILLOD P, MONGET P, UZBEKOVAS (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra Prod. Anim.*, **22**, 59-76.
- MOORE RK, OTSUKA F, SHIMASAKI S (2003). Molecular basis of Bone Morphogenetic Protein-15 signaling in granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 304–310.
- MORITA Y, MANGANARO TF, TAO XJ, MARTIMBEAU S, DONAHOE PK, TILLY JL (1999). Requirement for phosphatidylinositol-30-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology*, **140**, 941–949.
- MOTTA PM, MAKABE S, NAGURO T, CORRER S (1994). Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Arch. Histol. Cytol.*, **57**, 369–394.
- NAGASHIMA JB, SYLVESTER SR, NELSON JL, CHEONG SH, MUKAI C, LAMBO C, FLANDERS JA, MEYERS-WALLEN VN, SONGSASEN N, TRAVIS AJ (2015). Live births from Domestic Dog (*Canis familiaris*) embryos produced by *In Vitro* Fertilization. *PLoS ONE*, **10**(12): e0143930.doi:10.1371/journal.pone.0143930.
- NICKSON DA, BOYD JS, ECKERSALL PD, FERGUSON JM, HARVEY MJA, RENTON JP (1993). Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J. Reprod. Fertil.*, **47** (Suppl.), 231–240.
- NILSSON EE, SKINNER MK (2002). Growth and Differentiation Factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.*, **67**, 1018–1024.
- NORRIS RP, FREUDZON M, MEHLMANN LM, COWAN AE, SIMON AM, PAUL DL, LAMPE PD, JAFFE LA (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, **135**, 3229-3238.
- OLSON PN, HUSTED PW (1986). Breeding management for optimal reproductive efficiency in the bitch and stud dog. In *Morrow DA. Current therapy in theriogenology*. 2. Saunders, Philadelphia, p. 463-468.
- ORISAKA M, ORISAKA S, JIANG JY, CRAIG J, WANG Y, KOTSUJI F, TSANG BK (2006). Growth Differentiation Factor-9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol*, **20**, 2456–2468.
- OSTRANDER EA, KRUGLYAK L (2000). Unleashing the canine genome. *Genome Res.*, **10**, 1271–1274.
- OSTRANDER EA, GALIBERT F, PATTERSON DF (2000). Canine genetics comes of age. *Trends Genet.*, **16**, 117–124.

- OTOI F, TANAKA M, OOKA A, SUZUKI T (1999). Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, **11**, 387–390.
- OTOI T, FUJII M, TANAKA M, OOKA A, SUZUKI T (2000a). Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, **54**, 535–542.
- OTOI T, MURAKAMI M, FUJII M, TANAKA M, OOKA A, UNE S, SUZUKI T (2000b). Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. *Vet. Rec.*, **146**, 52–53.
- OTOI T, OOKA A, MURAKAMI M, KURNIANI KARJA NW, 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**, 151–155.
- OTOI T, WILLINGHAM L, SHIN T, KRAEMER DC, WESTHUSIN M (2002). Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, **124**, 775–781.
- OTSUKA F, YAO Z, LEE TH, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S (2000). Bone Morphogenetic Protein-15: Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, **275**, 39523–39528.
- OTSUKA F, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S (2001). Bone Morphogenetic Protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem*, **276**, 11387–11392.
- OTSUKA F, MCTAVISH K, SHIMASAKI S (2011). Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol. Reprod. Dev.*, **78**, 9–21.
- PALMER JS, ZHAO ZZ, HOEKSTRA C, HAYWARD NK, WEBB PM, WHITEMAN DC, MARTIN NG, BOOMSMA DI, DUFFY DL, MONTGOMERY GW (2006). Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab*, **91**, 4713–4716.
- PALOMINO J, DE LOS REYES M (2016). Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology*, **86**, 1541-1549.
- PANGAS SA, CHOI Y, BALLOW DJ, ZHAO Y, WESTPHAL H, MATZUK MM, RAJKOVIC A (2006). Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 8090-8095.
- PATTERSON DF (2000). Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J. Vet. Intern. Med.*, **14**, 1–9.
- PATTERSON DF, HASKINS ME, JEZYK PF (1982). Models of human genetic disease in domestic animals. *Adv. Hum. Genet.*, **12**, 263–339.
- POPE CE (2000). Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, **53**, 163–174.

- PROCHAZKA R, SRSEN V, NAGYOVA E, MIYANO T, FLECHON JE (2000). Developmental regulation of effect of Epidermal Growth Factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: Nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev*, **56**, 63-73.
- PROCHAZKA R, NEMCOVA L, NAGYOVA E, KANKA J (2004). Expression of Growth Differentiation Factor-9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol Reprod*, **71**, 1290–1295.
- PUKAZHENTHI GN, WILDT DE (2004). Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserve wildlife? *Reprod. Fertil. Dev.*, **16**, 33–46.
- QU J, GODIN PA, NISOLLE M, DONNEZ J (2000) Expression of receptors for Insulin-like Growth Factor-I and transforming growth factor in human follicles. *Mol Hum Reprod*, **6**, 137 –145.
- REDDY P, LIU L, ADHIKARI D, JAGARLAMUDI K, RAJAREDDY S, SHEN Y, DU C, TANG W, HAMALAINEN T, PENG SL, LAN ZJ, COONEY AJ, HUHTANIEMI I, LIU K (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, **319**, 611-613.
- RENTON JP, BOYD JS, ECKERSALL PD, FERGUSON JM, HARVEY MJA, MULLANEY J, PERRY B (1991). Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.*, **93**, 221–231.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, THOUMIRE S, CHEBROUT M, DE LESEGNO CV, CHASTANT-MAILLARD S (2005). In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, **130**, 193–201.
- REYNAUD K, VIARIS DE LESEGNO C, CHEBROUT M, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S (2009). Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*, **72 (8)**, 1120-1131.
- REYNAUD K, HALTER S, TAHIR Z, THOUMIRE S, CHEBROUT M, CHASTANT-MAILLARD S (2010). Les follicules polyovocytaires. *Gynécol. Obstet. Fertil.*, **38**, 395–397.
- REYNAUD K, SAINT-DIZIER M, TAHIR MZ, HAVARD T, HARICHAUX G, LABAS V, THOUMIRE S, FONTBONNE A, GRIMARD B, CHASTANT-MAILLARD S (2015). Progesterone plays a critical role in canine oocyte maturation and fertilization. *Biol Reprod.*, **93**, 87.
- ROBERTSON JB, SRSEN V, KING WA (1992). Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured in vitro. 12th International Congress in Animal Reproduction, 23-27 août, 1992, The Hague, The Netherland, p. 1808–1810.
- RODRIGUES BA, RODRIGUES JL (2003a). Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod. Dom. Anim.*, **38**, 58–62.
- RODRIGUES BA, RODRIGUES JL (2003b). Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, **60**, 59–66.

- RODRIGUES BA, DOS SANTOS LC, RODRIGUES JL (2004). Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **67**, 215–223.
- ROH JS, BONDESTAM J, MAZERBOURG S, KAIVO-OJA N, GROOME N, RITVOS O, HSUEH AJW (2003). Growth Differentiation Factor-9 stimulates inhibin production and activates Smad2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, **144**, 172–178.
- ROTA A, CABIANCA G (2004). In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod. Nutr. Dev.*, **44**, 105–109.
- SAINT-DIZIER M, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S (2001a). Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction*, **121**, 97–105.
- SAINT-DIZIER M, SALOMON JF, PETIT C, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S (2001b). In vitro maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *J. Reprod. Fertil*, **57** (Suppl.), 147–150.
- 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, JAFFRE N, REYNAUD K, REMY B, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S (2008). Expression of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinising Hormone binding sites in the bitch ovary during the follicular phase. *Reprod. Fertil. Dev.*, **20**(8), 925-934.
- SHACKELL GH, HUDSON NL, HEATH DA, LUN S, SHAW L, CONDELL L, BLAY LR, MCNATTY KP (1993). Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (FecXI) on the X chromosome that influences ovulation rate. *Biol. Reprod.*, **48**, 1150–1156.
- SILVA J.R, VAN DEN HURK R, VAN TOL H.T.A, ROELEN B.A, FIGUEIREDO J.R (2005). Expression of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9), and Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.*, **70**, 11–19.
- SIMON AM, GOODENOUGH DA, LI E, PAUL DL (1997). Female infertility in mice lacking connexin37. *Nature*, **385**, 525–529.
- SINGH B, MENG L, RUTLEDGE JM, ARMSTRONG DT (1997). Effects of Epidermal Growth Factor and Follicle-Stimulating Hormone during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, **46**, 401–407.
- SMITH P, O WS, CORRIGAN KA, SMITH T, LUNDY T, DAVIS GH, MCNATTY KP (1997). Ovarian morphology and endocrine characteristics of female sheep fetuses that are heterozygous or homozygous for the Inverdale prolificacy gene (fecXI). *Biol. Reprod.*, **57**, 1183–1192.
- SONGSASEN N, WILDT DE (2007). Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim. Reprod. Sci.*, **98**, 2–22.
- SONGSASEN N, YU I, LEIBO SP (2002). Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol. Reprod. Dev.*, **62**, 407–415.

SONGSASEN N, YU I, GOMEZ M, LEIBO SP (2003). Effects of meiosis-inhibiting agents and equine Chorionic Gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **65**, 435–445.

SONGSASEN N, WOODRUFF TK, WILDT DE (2011). In vitro growth and steroidogenesis of dog follicles as influenced by the physical and hormonal microenvironment. *Reproduction*, **142**, 113–22.

SOUZA CJ, CAMPBELL BK, MCNEILLY AS, BAIRD DT (2002). Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, **123**, 363–369.

SOYAL SM, AMLEH A, DEAN J (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, **127**, 4645-4654.

SU YQ, SUGIURA K, WIGGLESWORTH K, O'BRIEN MJ, AFFOURTIT JP, PANGAS SA, MATZUK MM, EPPIG JJ (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP-15 and GDF-9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, **135**, 111–121.

SUGIURA K, PENDOLA FL, EPPIG JJ (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Dev Biol*, **279**, 20–30.

SUN RZ, LEI L, CHENG L, JIN ZF, ZU SJ, SHAN ZY, WANG ZD, ZHANG JX, LIU ZH (2010). Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *J Mol Hist*, **41**, 325–332.

TELFER E, 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**, 137-147.

TSUTSUI T (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, **39** (Suppl.), 269–275.

TSUTSUI T, SHIMIZU T (1975). Studies on the reproduction in the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. *Jpn J. Anim. Reprod.*, **21**, 65-69.

TSUTSUI T, TAKAHASHI F, HORI T, KAWAKAMI E, CONCANNON PW (2009). Prolonged duration of fertility of dog ova. *Reprod. Domest. Anim.*, **44** (2), 230-233.

UICN. *The UICN Red List of threatened species* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.iucnredlist.org> (consulté le 16/06/2016).

Université d'Aix-Marseille. *Approche des interactions cellulaires et de la colocalisation neuronale en microscopie optique et électronique* [en ligne]. Disponible sur : [http://crn2m.univ-mrs.fr/IMG/pdf/TD\\_imagerie\\_OB\\_06-07.pdf](http://crn2m.univ-mrs.fr/IMG/pdf/TD_imagerie_OB_06-07.pdf) (consulté le 22/07/2016).

VANDERHYDEN BC, ARMSTRONG DT, (1989). Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod*, **40**, 720-728.

- VANDERHYDEN BC, COHEN JN, MORLEY P (1993). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*, **133**, 423–426.
- VIARIS DE LESEGNO C (2007). *La maturation de l'ovocyte canin in vivo et in vitro*. Thèse de Docteur de l'Institut des sciences et Industries du vivant et de l'environnement, AgroParisTech, 125 p.
- VIARIS DE LESEGNO C, REYNAUD K, PECHOUX C, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S (2008). Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, **75** (1), 115–125.
- VIARIS DE LESEGNO C, REYNAUD K, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD (2009). Transcriptional reactivation during in vivo maturation of canine oocyte. 25<sup>ième</sup> meeting annuel AETE, 11-12 septembre, 2009, Poznan, Pologne, p. 264.
- VITT UA, HAYASHI M, KLEIN C, HSUEH AJW (2000a). Growth Differentiation Factor-9 stimulates proliferation but suppresses the Follicle-Stimulating Hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.*, **62**, 370–377.
- VITT UA, MCGEE EA, HAYASHI M, HSUEH AJW (2000b). In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, **141**, 3814–3820.
- VITT UA, KLEIN C, HSEUH AJ (2002). Bone Morphogenetic Protein receptor type II is a receptor for Growth Differentiation Factor-9. *Biol. Reprod.*, **67**, 473–480.
- WILDT DE, PANKO WB, CHAKRABORTY P, SEAGER SWJ (1979). Relationship of serum estrone, estradiol-17 $\beta$  and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.*, **20**, 648–658.
- WANG J, ROY SK (2004). Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) and Stem Cell Factor (SCF) promote primordial follicle formation in the hamster: Modulation by Follicle-Stimulating Hormone. *Biol. Reprod.*, **70**, 577–585.
- WANG C, ROY SK (2006). Expression of Growth Differentiation Factor-9 in the oocytes is essential for the development of primordial follicles in the hamster ovary. *Endocrinology*, **147**, 1725–34.
- WILDT DE, ROTH TL (1997). Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int. Zoo Yearbook*, **35**, 164–172.
- WILLINGHAM-ROCKY LA, HINRICHS K, WESTHUSIN ME, KRAEMER DC (2003). Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction*, **126**, 501–508.
- WILSON T, WU XY, JUENGEL JL, ROSS IK, LUMSDEN JM, LORD EA, DODDS KG, WALLING GA, MCEWAN JC, O'CONNELL AR, MCNATTY KP, MONTGOMERY GW (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of Bone Morphogenetic Protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, **64**, 1225–1235.

XU J, OAKLEY J, MCGEE EA (2002). Stage-specific expression of Smad2 and Smad3 during folliculogenesis. *Biol Reprod*, **66**, 1571 – 1578.

YAMADA S, SHIMAZU Y, KAWAJI H, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y (1992). Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol. Reprod.*, **46**, 853–858.

YAMADA S, SHIMAZU Y, KAWANO Y, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y (1993). In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **47** (Suppl.), 227–229.

YAMAMOTO N, CHRISTENSON LK, MCALLISTER JM, STRAUSS III JF (2002). Growth Differentiation Factor-9 inhibits 3'5'-Adenosine MonoPhosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**(6), 2849–2856.

YAN C, WANG P, DEMAYO J, DEMAYO FJ, ELVIN JA, CARINO C, PRASAD SV, SKINNER SS, DUNBAR BS, DUBE JL, CELESTE AJ, MATZUK MM (2001). Synergistic roles of Bone Morphogenetic Protein-15 and Growth Differentiation Factor-9 in ovarian function. *Mol Endocrinol.*, **15**, 854-866.

## ANNEXES

### **Annexe 1 : Marquage pour le facteur GDF-9 en fonction du stade folliculaire**

a,b,c : Les valeurs sans exposant en commun pour une intensité donnée (Forte/Moyenne/Faible/Nulle) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donné (Primordial/Primaire/Secondaire/Antral) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

Les chiffres entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

#### **A - Ovocytes**

Stade folliculaire	Intensité de marquage pour GDF-9				Total
	Forte	Moyenne	Faible	Nulle	
<b>Primordial</b>	86,0% <sup>a,A</sup> [73-94%]	12,0% <sup>a,B</sup> [4-24%]	2,0% <sup>a,AB</sup> [0-11%]	0,0% <sup>a,AB</sup> [0-1%]	N=50
<b>Primaire</b>	70,6% <sup>ab,A</sup> [44-90%]	23,5% <sup>ab,A</sup> [7-50%]	5,9% <sup>a,A</sup> [0-29%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-20%]	N=17
<b>Secondaire</b>	70,0% <sup>a,A</sup> [57-81%]	18,3% <sup>a,A</sup> [1-30%]	11,7% <sup>a,A</sup> [5-23%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-6%]	N=60
<b>Antral</b>	42,6% <sup>b,A</sup> [29-57%]	51,9% <sup>b,B</sup> [38-66%]	5,6% <sup>a,AB</sup> [1-15%]	0,0% <sup>a,AB</sup> [0-7%]	N=54
<b>Total</b>	N=120	N=49	N=12	N=0	

#### **B - Follicules**

Stade folliculaire	Intensité de marquage pour GDF-9				Total
	Forte	Moyenne	Faible	Nulle	
<b>Primordial</b>	95,5% <sup>a,A</sup> [77-100%]	4,5% <sup>a,B</sup> [0-23%]	0,0% <sup>a,B</sup> [0-15%]	0,0% <sup>a,AB</sup> [0-15%]	N=22
<b>Primaire</b>	63,0% <sup>ac,A</sup> [42-81%]	14,8% <sup>ac,A</sup> [4-34%]	22,2% <sup>ab,A</sup> [9-42%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-13%]	N=27
<b>Secondaire</b>	37,9% <sup>bc,A</sup> [26-51%]	36,4% <sup>bc,A</sup> [25-49%]	22,7% <sup>ab,A</sup> [13-35%]	3,0% <sup>a,A</sup> [0-11%]	N=66
<b>Antral</b>	18,5% <sup>b,A</sup> [9-31%]	50,0% <sup>b,B</sup> [36-64%]	27,8% <sup>b,B</sup> [16-42%]	3,7% <sup>a,AB</sup> [0-13%]	N=54
<b>Total</b>	N=73	N=56	N=36	N=4	

## Annexe 2 : Marquage pour le facteur BMP-15 en fonction du stade folliculaire

a,b,c : Les valeurs sans exposant en commun pour une intensité donnée (Forte/Moyenne/Faible/Nulle) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donné (Primordial/Primaire/Secondaire/Antral) et pour une catégorie de cellules donnée (ovocyte/follicules) sont significativement différentes ( $p < 0,004$ ).

Les chiffres entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

### A - Ovocyte

Stade folliculaire	Intensité de marquage pour BMP-15				Total
	Forte	Moyenne	Faible	Nulle	
Primordial	64,0% <sup>a,A</sup> [43-82%]	36,0% <sup>a,B</sup> [18-57%]	0,0% <sup>a,C</sup> [0-14%]	0,0% <sup>a,ABC</sup> [0-14%]	N=25
Primaire	12,5% <sup>ab,A</sup> [0-53%]	62,5% <sup>a,A</sup> [24-91%]	25,0% <sup>ab,A</sup> [3-65%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-37%]	N=8
Secondaire	5,4% <sup>b,A</sup> [1-15%]	37,5% <sup>a,AB</sup> [25-51%]	55,4% <sup>b,B</sup> [41-69%]	1,8% <sup>a,AB</sup> [0-10%]	N=56
Antral	13,5% <sup>b,A</sup> [5-29%]	48,6% <sup>a,A</sup> [32-66%]	32,4% <sup>b,A</sup> [18-50%]	5,4% <sup>a,A</sup> [1-18%]	N=37
Total	N=25	N=53	N=45	N=3	

### B - Follicules

Stade folliculaire	Intensité de marquage pour BMP-15				Total
	Forte	Moyenne	Faible	Nulle	
Primordial	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	80,0% <sup>a,A</sup> [28-99%]	20,0% <sup>a,A</sup> [1-72%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=5
Primaire	0,0% <sup>a,A</sup> [0-23%]	50,0% <sup>a,A</sup> [23-77%]	50,0% <sup>a,A</sup> [23-77%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-23%]	N=14
Secondaire	6,1% <sup>a,A</sup> [2-15%]	36,4% <sup>a,A</sup> [25-49%]	57,6% <sup>a,A</sup> [45-70%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-5%]	N=66
Antral	13,2% <sup>a,A</sup> [3-20%]	42,1% <sup>a,A</sup> [18-44%]	42,1% <sup>a,A</sup> [18-44%]	2,6% <sup>a,A</sup> [0-10%]	N=54
Total	N=9	N=51	N=62	N=1	

**Annexe 3 : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les ovocytes en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire**

a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les chiffres entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

		Stade du cycle œstral			Total	
		Proœstrus/Œstrus	Diœstrus	Anœstrus		
Stade folliculaire	Primordial	Fort	85,2% <sup>a,A</sup> [66-96%]	76,9% <sup>a,A</sup> [46-95%]	100,0% <sup>a,A</sup> [69-100]	N=43
		Moyen	11,1% <sup>a,A</sup> [2-29%]	23,1% <sup>a,A</sup> [5-54%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-31%]	N=6
		Faible	3,7% <sup>a,A</sup> [0-19%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-25%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-31%]	N=1
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-13%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-25%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-31%]	N=0
		Total	N=27	N=13	N=10	
	Primaire	Fort	0,0% <sup>AB</sup>	100,0% <sup>a,A</sup> [69-100]	28,6% <sup>a,B</sup> [4-71%]	N=12
		Moyen	0,0% <sup>A</sup>	0,0% <sup>a,A</sup> [0-31%]	57,1% <sup>a,A</sup> [18-90%]	N=4
		Faible	0,0% <sup>A</sup>	0,0% <sup>a,A</sup> [0-31%]	14,3% <sup>a,A</sup> [0-58%]	N=1
		Nul	0,0% <sup>A</sup>	0,0% <sup>a,A</sup> [0-31%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-41%]	N=0
		Total	N=0	N=10	N=7	
	Secondaire	Fort	61,9% <sup>a,A</sup> [38-82%]	84,2% <sup>a,A</sup> [60-97%]	65,0% <sup>a,A</sup> [41-85%]	N=42
		Moyen	28,6% <sup>a,A</sup> [11-52%]	15,8% <sup>a,A</sup> [3-40%]	10,0% <sup>a,A</sup> [1-32%]	N=11
		Faible	9,5% <sup>a,A</sup> [1-30%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-18%]	25,0% <sup>a,A</sup> [9-49%]	N=7
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-16%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-18%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-17%]	N=0
		Total	N=21	N=19	N=20	
	Antral	Fort	41,2% <sup>a,A</sup> [18-67%]	72,7% <sup>a,A</sup> [39-94%]	30,8% <sup>a,A</sup> [14-52%]	N=23
Moyen		47,1% <sup>a,A</sup> [23-72%]	27,3% <sup>a,A</sup> [6-61%]	65,4% <sup>a,A</sup> [44-83%]	N=28	
Faible		11,8% <sup>a,A</sup> [1-36%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-28%]	3,8% <sup>a,A</sup> [0-20%]	N=3	
Nul		0,0% <sup>a,A</sup> [0-20%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-28%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-13%]	N=0	
Total		N=17	N=11	N=26		
<b>Total</b>		N=65	N=53	N=63		

**Annexe 4 : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire**

a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les chiffres entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

		Stade du cycle œstral			Total	
		Proœstrus/Œstrus	Diœstrus	Anœstrus		
Stade folliculaire	Primordial	Fort	95,2% <sup>a,A</sup> [76-100%]	100,0% <sup>a,A</sup> [3-100%]	0,0% <sup>A</sup>	N=21
		Moyen	4,8% <sup>a,A</sup> [0-24%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-98%]	0,0% <sup>A</sup>	N=1
		Faible	0,0% <sup>a,A</sup> [0-16%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-98%]	0,0% <sup>A</sup>	N=0
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-16%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-98%]	0,0% <sup>A</sup>	N=0
		Total	N=21	N=1	N=0	
	Primaire	Fort	100,0% <sup>a,A</sup> [40-100%]	81,2% <sup>a,A</sup> [54-96%]	0,0% <sup>a,B</sup> [0-41%]	N=17
		Moyen	0,0% <sup>a,A</sup> [0-60%]	18,8% <sup>ab,A</sup> [4-46%]	14,3% <sup>ab,A</sup> [0-58%]	N=4
		Faible	0,0% <sup>a,AB</sup> [0-60%]	0,0% <sup>b,A</sup> [0-21%]	85,7% <sup>b,B</sup> [42-100%]	N=6
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-60%]	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-21%]	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-41%]	N=0
		Total	N=4	N=16	N=7	
	Secondaire	Fort	22,7% <sup>a,A</sup> [8-45%]	47,8% <sup>a,A</sup> [27-69%]	42,9% <sup>a,A</sup> [22-66%]	N=25
		Moyen	59,1% <sup>a,A</sup> [36-69%]	21,7% <sup>a,A</sup> [7-44%]	28,6% <sup>a,A</sup> [11-52%]	N=24
		Faible	18,2% <sup>a,A</sup> [5-40%]	21,7% <sup>a,A</sup> [7-44%]	28,6% <sup>a,A</sup> [11-52%]	N=15
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-15%]	8,7% <sup>a,A</sup> [1-28%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-16%]	N=2
		Total	N=22	N=23	N=21	
	Antral	Fort	17,6% <sup>a,A</sup> [4-43%]	27,3% <sup>a,A</sup> [6-61%]	12,0% <sup>a,A</sup> [3-31%]	N=9
Moyen		41,2% <sup>a,A</sup> [18-67%]	45,5% <sup>a,A</sup> [17-77%]	60,0% <sup>a,A</sup> [39-79%]	N=27	
Faible		41,2% <sup>a,A</sup> [18-67%]	9,1% <sup>a,A</sup> [0-41%]	28,0% <sup>a,A</sup> [12-49%]	N=15	
Nul		0,0% <sup>a,A</sup> [0-20%]	18,2% <sup>a,A</sup> [2-52%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-14%]	N=2	
Total		N=17	N=11	N=25		
<b>Total</b>		N=64	N=51	N=53		

**Annexe 5 : Marquage pour le facteur BMP-15 dans les ovocytes en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire**

a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les chiffres entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

		Stade du cycle œstral			Total	
		Proœstrus/Œstrus	Diœstrus	Anœstrus		
Stade folliculaire	Primordial	Fort	100,0% <sup>a,A</sup> [72-100%]	35,7% <sup>a,B</sup> [13-65%]	0,0% <sup>AB</sup>	N=16
		Moyen	0,0% <sup>b,A</sup> [0-28%]	64,3% <sup>b,B</sup> [35-87%]	0,0% <sup>AB</sup>	N=9
		Faible	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-28%]	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-23%]	0,0% <sup>A</sup>	N=0
		Nul	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-28%]	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-23%]	0,0% <sup>A</sup>	N=0
		Total	N=11	N=14	N=0	
	Primaire	Fort	33,3% <sup>a,A</sup> [1-91%]	0,0% <sup>a,A</sup>	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=1
		Moyen	33,3% <sup>a,A</sup> [1-91%]	0,0% <sup>a,A</sup>	80,0% <sup>a,A</sup> [28-99%]	N=5
		Faible	33,3% <sup>a,A</sup> [1-91%]	0,0% <sup>a,A</sup>	20,0% <sup>a,A</sup> [1-72%]	N=2
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-71%]	0,0% <sup>a,A</sup>	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=0
		Total	N=3	N=0	N=5	
	Secondaire	Fort	10,7% <sup>a,A</sup> [2-28%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-25%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-22%]	N=3
		Moyen	39,3% <sup>a,A</sup> [22-59%]	30,8% <sup>a,A</sup> [9-61%]	40,0% <sup>a,A</sup> [16-68%]	N=21
		Faible	50,0% <sup>a,A</sup> [31-69%]	61,5% <sup>a,A</sup> [32-86%]	60,0% <sup>a,A</sup> [32-84%]	N=31
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-12%]	7,7% <sup>a,A</sup> [0-36%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-22%]	N=1
		Total	N=28	N=13	N=15	
	Antral	Fort	16,7% <sup>a,A</sup> [4-41%]	20,0% <sup>a,A</sup> [1-72%]	7,1% <sup>a,A</sup> [0-34%]	N=5
Moyen		55,6% <sup>a,A</sup> [31-78%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	57,1% <sup>a,A</sup> [29-82%]	N=18	
Faible		22,2% <sup>a,A</sup> [6-48%]	60,0% <sup>a,A</sup> [15-95%]	35,7% <sup>a,A</sup> [13-65%]	N=12	
Nul		5,6% <sup>a,A</sup> [0-27%]	20,0% <sup>a,A</sup> [1-72%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-23%]	N=2	
Total		N=18	N=5	N=14		
<b>Total</b>		N=60	N=32	N=34		

**Annexe 6 : Marquage pour le facteur GDF-9 dans les follicules en fonction du stade du cycle œstral et du stade folliculaire**

a,b : Les valeurs sans exposant en commun pour une étape du cycle œstral donnée et pour un stade folliculaire donné sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

A,B : Les valeurs sans exposant en commun pour un stade folliculaire donnée et pour une intensité de marquage donnée (Fort, Moyen, Faible, Nul) sont significativement différentes ( $p < 0,005$ ).

Les chiffres entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque pourcentage.

		Stade du cycle œstral			Total	
		Proœstrus/Œstrus	Dioœstrus	Anœstrus		
Stade folliculaire	Primordial	Fort	0,0% <sup>a,A</sup> [0-98%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-60%]	0,0% <sup>A</sup>	N=0
		Moyen	0,0% <sup>a,A</sup> [0-98%]	100,0% <sup>a,A</sup> [40-100%]	0,0% <sup>A</sup>	N=4
		Faible	100,0% <sup>a,A</sup> [3-100%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-60%]	0,0% <sup>A</sup>	N=1
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-98%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-60%]	0,0% <sup>A</sup>	N=0
		Total	N=1	N=4	N=0	
	Primaire	Fort	0,0% <sup>a,A</sup> [0-71%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-46%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=0
		Moyen	33,3% <sup>a,AB</sup> [1-91%]	100,0% <sup>ab,A</sup> [54-100%]	0,0% <sup>a,B</sup> [0-52%]	N=7
		Faible	66,7% <sup>a,AB</sup> [9-99%]	0,0% <sup>b,A</sup> [0-46%]	100,0% <sup>a,B</sup> [48-100%]	N=7
		Nul	0,0% <sup>a,A</sup> [0-71%]	0,0% <sup>ab,A</sup> [0-46%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=0
		Total	N=3	N=6	N=5	
	Secondaire	Fort	13,3% <sup>a,A</sup> [4-31%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-15%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=4
		Moyen	16,7% <sup>a,A</sup> [6-35%]	54,5% <sup>a,B</sup> [32-76%]	40,0% <sup>a,AB</sup> [5-85%]	N=19
		Faible	66,7% <sup>a,A</sup> [47-83%]	45,5% <sup>a,A</sup> [24-68%]	60,0% <sup>a,A</sup> [15-95%]	N=33
		Nul	3,3% <sup>a,A</sup> [0-17%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-15%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	N=1
		Total	N=30	N=22	N=5	
	Antral	Fort	26,3% <sup>a,A</sup> [9-51%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-23%]	N=5
		Moyen	36,8% <sup>a,A</sup> [16-62%]	20,0% <sup>a,A</sup> [1-72%]	57,1% <sup>a,A</sup> [29-82%]	N=16
		Faible	31,6% <sup>a,A</sup> [13-57%]	80,0% <sup>a,A</sup> [28-99%]	42,9% <sup>a,A</sup> [18-71%]	N=16
		Nul	5,3% <sup>a,A</sup> [0-26%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-52%]	0,0% <sup>a,A</sup> [0-23%]	N=1
Total		N=19	N=5	N=14		
<b>Total</b>		N=53	N=37	N=24		

**NOM** : MAUPEU

**PRENOM** : DIANE

**TITRE** : Expression des facteurs de croissance GDF-9 et BMP-15 au cours de la folliculogénèse chez la chienne

**RESUME** :

GDF-9 et BMP-15, membres des TGF $\beta$ , ont été décrits chez plusieurs espèces comme des facteurs clés pour la folliculogénèse. Le but de cette étude était d'analyser chez la chienne la localisation de GDF-9 et BMP-15 dans les cellules folliculaires et les ovocytes au cours de la folliculogénèse, et d'étudier les variations d'expression selon le stade folliculaire et l'étape du cycle œstral. Des sections de 14 ovaires de 14 chiennes à différents stades du cycle œstral (proœstrus/œstrus n=5; diœstrus n=5; anœstrus n=4) ont été analysées par immunohistochimie et observées avec un microscope à lumière inversée. Les résultats montrent que GDF-9 et BMP-15 sont exprimés dans les cellules folliculaires et les ovocytes à tous les stades folliculaires. Leur expression diminue au cours de la folliculogénèse, suggérant un rôle principalement durant la folliculogénèse basale. Les follicules primordiaux et primaires semblent contenir plus de GDF-9 et BMP-15 durant le proœstrus/œstrus et le diœstrus, mais ces résultats sont à approfondir avec d'autres études.

**MOTS CLES** : Follicule - Ovaire - Ovocyte - GDF-9 - BMP-15 – Chienne

---

**TITLE** : Expression of growth factors GDF-9 and BMP-15 during folliculogenesis in the dog

**ABSTRACT** :

GDF-9 and BMP-15, members of TGF $\beta$ , have been described in many species as key mediators for folliculogenesis. The aim of this study was to analyse in canines the localization of GDF-9 and BMP-15 in follicle cells and oocytes during follicle development, and to study the variation of expression taking into account the follicular stage and the stage of oestrous cycle. Sections of 14 ovaries obtained from 14 bitches at different stage of oestrous cycle (proestrus-oestrus n=5; diestrus n=5; anestrus n=4) were processed to perform immunohistochemistry and examined using an inverted microscope. The results showed that GDF-9 and BMP-15 were expressed in follicular cells and oocytes for all stages of follicular growth. Both GDF-9 and BMP-15 expression decreased during follicular growth, suggesting a mainly role during early folliculogenesis. Primordial and primary follicles seemed to contain more GDF-9 and BMP-15 during proœstrus/œstrus and diœstrus, but these results need to be confirmed with other studies.

**KEY WORDS** : Ovarian follicle – Ovary – Oocyte - GDF-9 - BMP-15 - Dog