



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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 26700

To cite this version:

Hautot, Anaïs. Les protéines WNTs et la maturation ovocytaire chez la jument : implication de WNT-2B. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 56 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

LES PROTEINES WNTS ET LA MATURATION OVOCYTAIRE CHEZ LA JUMENT : IMPLICATION DE WNT-2B

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*Présentée et soutenue le 18 septembre 2020 publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

HAUTOT, Anaïs

Née le 05 Février 1994 à ROUEN (76)

Directeur de thèse : Mme Nicole HAGEN

JURY

PRESIDENT :

Mr Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Nicole HAGEN

Mme Sylvie CHASTANT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mr Mouhamadou DIAW

Président adjoint à la Faculté Vétérinaire de Saint Hyacinthe,
Université de MONTREAL (Canada)

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- 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. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

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 **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD,

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Biologie du développement et de la reproduction

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de jury de cette thèse,
Hommage et remerciements respectueux.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse,
Qui m'a encadrée et accompagnée dans ce travail,
Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Sylvie CHASTANT-MAILLARD,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui me fait l'honneur de prendre part au jury de cette thèse,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Mouhamadou DIAW,

Professeur à la Faculté Vétérinaire de Montréal (Canada)

Reproduction des équidés

Qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire,
Qui m'a encadrée et accompagnée dans ce travail,
Une aide très précieuse,
Reconnaissance et remerciements les plus sincères.

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	6
Liste des illustrations	8
Liste des abréviations	9
Introduction	10
1. Etude des particularités physiologiques de la reproduction chez la jument	12
1.1 La jument : une espèce mono-ovulante à polyoestrus saisonnier.....	12
1.2 Le cycle œstral chez la jument et régulation hormonale du cycle.....	13
1.2.1 Le cycle œstral et les profils hormonaux.....	13
1.2.2 L'ovogenèse et la folliculogenèse in vivo chez la jument.....	14
1.2.3 La maturation ovocytaire	18
1.2.4 L'ovulation.....	20
2. Avancées technologiques sur la reproduction assistée chez la jument	21
2.1 La production d'embryons in vivo.....	22
2.1.1 La superovulation.....	22
2.1.2 Collecte et transfert d'embryons in vivo	22
2.2 production in vitro d'embryons.....	24
2.2.1 La récolte d'ovocytes in vivo (pour revue, Hinrichs 2018; Deleuze, Ponthier, et Hanzen 2009)	24
2.2.2 Le transfert d'ovocytes chez une jument porteuse inséminée	25
2.2.3 Fécondation in vitro et ICSI	26
2.2.4 La cryopréservation d'ovocytes	28
2.3 Utilisation des techniques de collecte d'ovocytes in vivo et ICSI en France.....	28
2.3.1 Intérêt de la pratique de production d'embryons in vitro	28
3. Implication des protéines WNTs dans la maturation ovocytaire in vitro.	31
3.1 Découverte des protéines WNTs	31
3.1.1 La voie de signalisation canonique WNT/ β -caténine	32
3.1.2 La voie de signalisation non canonique dépendante « PCP »	33
3.1.3 La voie de signalisation non canonique dépendante WNT/ Ca^{2+}	33
3.2 Implication des protéines WNTs dans la reproduction des femelles.....	34
3.3 Etude de l'expression des protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire in vitro chez la jument.....	36
3.3.1 Mise en évidence des gènes codant pour les protéines WNTs après 30h de maturation ovocytaire	36
3.3.2 Etude de l'expression des gènes codant pour 8 protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire.....	36
4. Effet de la protéine WNT-2b dans la maturation ovocytaire	37
4.1 Matériels et méthodes.....	37

4.1.1	Récupération des ovocytes	37
4.1.2	Sélection des ovocytes et préparation des milieux de culture.....	38
4.1.3	Evaluation de l'expansion des cellules du cumulus après 30h de maturation.....	39
4.2	<i>Analyses statistiques</i>	40
4.3	<i>Résultats</i>	40
5.	<i>Discussion</i>	42
5.1	<i>Conditions de l'expérience</i>	42
5.1.1	Collecte et transport des ovocytes.....	42
5.1.2	Milieu de maturation des ovocytes.....	42
5.1.3	Marqueurs de la maturation ovocytaire in vitro chez la jument	42
5.2	<i>Expression des protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire</i>	43
5.3	<i>Perspectives : caractérisation du mode d'action des protéines WNTs lors de la maturation ovocytaire in vitro chez la jument</i>	45
5.3.1	Evaluation des différentes voies de signalisation.....	45
5.3.2	Utilisation des protéines antagonistes à la famille des protéines WNTs	45
5.4	<i>Limites de la collecte d'ovocytes in vivo</i>	47
	<i>Conclusion</i>	49
	<i>Bibliographie</i>	51

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Variations hormonales au cours du cycle œstral chez la jument. (Page 13)

Figure 2 : Evolution anatomique d'un follicule au cours de la folliculogénèse. (Page 15)

Figure 3 : Représentation schématique de l'ovaire d'une jument. (Page 16)

Figure 4 : Evolution du nombre de donneuses d'embryons et de poulains nés par transfert d'embryons produits *in vivo* entre 1989 et 2014. (Page 23)

Figure 5 : Etapes de la réalisation de la technique ICSI chez la jument. (Page 27)

Figure 6 : Schéma représentant la voie de signalisation canonique des WNT. En a une protéine antagoniste aux WNTs empêche la transmission du signal et la β -catenin est inactivée puis dégradée. En b la protéine WNT est couplée à ses récepteurs et la β -catenin active agit dans le noyau et permet la transcription de gènes cibles. (Page 32)

Figure 7 : Schéma représentant les voies de signalisation non canonique des WNTs. (Page 34)

Figure 8 : Effet de l'ajout de la protéine WNT-2b sur la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument : répartition des ovocytes en fonction des grades d'expansion des cellules du cumulus pour différents groupes : Control, WNT0.25, WNT5 et WNT100, correspondant à des concentrations de WNT-2b de 0, 0.25, 5 et 100 ng/mL respectivement. (Page 40)

Figure 9 : Schéma représentant en a le mode d'action des protéines WNTs, en b l'interaction des protéines SFRPs avec les protéines WNTs ainsi qu'avec leurs récepteurs inhibant la transmission du signal de la voie canonique et non canonique, et en c la fixation de la protéine Dkk avec un des récepteurs des protéines WNTs inhibant la transmission du signal via la voie canonique tout en maintenant actives les voies de signalisation non canoniques. (Page 45)

Photographie 1 : Observation d'un groupe d'ovocytes après 30h de maturation dans un milieu de culture contenant 5 ng/mL de Wnt-2b et classification de l'expansion des cellules du cumulus. (Page 39)

Tableau 1 : Comparaison des coûts appliqués par le Haras de Bèlignieux pour les techniques de transfert d'embryons récoltés *in vivo* et OPU/ICSI avec implantation d'embryons congelés. Les tarifs sont tous exprimés en hors taxe avec l'application d'une TVA de 20%. (Page 29)

Tableau 2 : Effet de l'année sur la répartition des ovocytes en fonction des grades d'expansion des cellules du cumulus pour les différents groupes : Control, WNT0.25, WNT5 et WNT100, correspondant à des concentrations de WNT-2b de 0, 0.25, 5 et 100 ng/mL respectivement. (Page 40)

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPc : Adénoside Monophosphate Cyclique
APC : Polypose Adénomateuse du Colon
COC : Complexe Ovocyte-Cumulus
CRRF : Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité
Dsh : Protéine Dishevelled
EGF : Facteur de Croissance Epidermique
EPE : Glande Hypophysaire Equine
FBS : Sérum Fœtal Bovin
FEI : Fédération équestre internationale
FSH : Hormone Folliculo-Stimulante
Fz : Protéine Frizzled
GnRH : Hormone Gonadolibérine
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3 β
hCG : Hormone Chorionique Gonadotrope Humaine
ICSI : Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde
Ifce : Institut français du cheval et de l'équitation
IGF-1 : Insulin-Like Growth Factor 1
JNK : JUN N-Terminal Kinase
LEF : Lymphoid Enhancer Factor
LH : Hormone Lutéinisante
LRP : Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein
MPF : Maturation Promoting Factor
OPU : Collecte d'Ovocyte
PGF2 α : Prostaglandines F2 alpha
SIRE : Système d'Information Relatif aux Equidés
TCF : T Cell Factor
WNT : Protéine Wingless Type

INTRODUCTION

Les techniques de reproduction artificielles sont en pleine expansion chez la jument ces dernières décennies. Les recherches ont débuté tardivement comparé à d'autres espèces, en raison notamment des particularités anatomiques et physiologiques de la jument. Sa période de reproduction est saisonnière et au cours de chaque cycle œstral, généralement un seul follicule ovulera alors que les autres évolueront vers l'atrésie (Allen, 1982). Les techniques de reproduction assistée s'adressent particulièrement aux chevaux à fort potentiel génétique afin d'augmenter le nombre de poulains nés par an et par jument tout en maintenant sa carrière sportive.

Pour améliorer la production d'embryons *in vivo*, le véritable défi de la méthode de superovulation est de réduire l'atrésie folliculaire de façon à amener au cours d'un cycle œstral plusieurs follicules jusqu'à l'ovulation et à obtenir 1,5 à 2 embryons par cycle (Squires, McCue, 2007). Par la suite, d'autres techniques de production d'embryons *in vitro* ont été développées, elles utilisent des ovocytes collectés sur des follicules à différents stades (Hinrichs, 2018) . Après leur récolte, ces ovocytes doivent subir une maturation puis une fécondation *in vitro* avant d'être transférés dans l'utérus d'une mère porteuse. Les recherches se sont donc orientées vers l'élaboration d'un milieu de maturation du complexe ovocyte-cumulus (COC) équin ainsi que sur les conditions de transport de ces ovocytes (Grøndahl et al., 1995 ; Diaw et al., 2018 ; Lewis et al., 2016).

Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de facteurs de croissance au cours de la maturation ovocytaire, et plus particulièrement l'implication d'une famille de protéine, les protéines WNTs, chez différentes espèces de mammifères telles que la vache (Diaw, 2014), la souris (Lapointe, 2012), la truie (Spate et al., 2014) et également la femme (Goud et al., 1998). Chez la jument, le rôle des protéines WNTs dans la reproduction reste inconnu, cependant leur présence a été détectée au sein de l'endomètre (Atli et al., 2011).

A notre connaissance, l'implication des protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument n'a pas été étudiée.

Notre thèse présente tout d'abord une synthèse bibliographique sur les particularités physiologiques de la reproduction de la jument, les avancées des techniques de reproduction

assistée chez la jument ainsi que les recherches entreprises sur l'implication des protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire. Dans une deuxième partie expérimentale, une étude sur l'effet de la protéine WNT-2b au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument est présentée. Cette étude a été réalisée dans le Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité (CRRF) dirigé par le Professeur Mouhamadou Diaw, à la Faculté Vétérinaire de Montréal.

1. ETUDE DES PARTICULARITES PHYSIOLOGIQUES DE LA REPRODUCTION CHEZ LA JUMENT

1.1 LA JUMENT : UNE ESPECE MONO-OVULANTE A POLYOESTRUS SAISONNIER

L'activité sexuelle chez les mammifères débute à la puberté. Chez la jument, cette période se situe entre 10 et 24 mois selon la précocité de la race, la saison et l'environnement (Meyer, 2009). L'une des particularités de la jument est sa période de reproduction saisonnière en jours longs. En effet, l'activité sexuelle est dépendante de plusieurs facteurs environnementaux dont la photopériode, la température et l'état corporel (Nagy et al., 2000). Le signal photopériodique perçu par la rétine est traduit en un signal hormonal, la sécrétion de mélatonine. Cette hormone agit au niveau de l'hypothalamus et module, après un délai de 40 jours, la sécrétion de GnRH (Guillaume et al., 2010).

Au début de la saison sexuelle, l'activité ovarienne est caractérisée par une longue durée de l'œstrus et une persistance des follicules préovulatoires pouvant excéder 10 jours. Ils subissent ensuite une régression ou atresie. Une fois cette transition achevée, l'activité sexuelle de la jument devient cyclique avec un intervalle entre deux ovulations de 18 à 24 jours et un œstrus d'une durée de 4 à 7 jours (Ginther, 1992). La folliculogenèse aboutit généralement à une seule ovulation cependant, chez la jument, les doubles ovulations sont observées avec une incidence de 15 à 30% (Vagner, 2017). Au début de l'automne, la transition automnale est caractérisée par des cycles anormaux, les follicules sont de petite taille et le recrutement folliculaire n'aboutit pas à une ovulation. Cette période précède l'inactivité ovarienne lors de l'anoëstrus hivernal. Il faut cependant noter que certaines juments (non suitées et en bon état corporel) peuvent présenter une activité ovarienne cyclique tout au long de l'année (Ginther, 1992).

1.2 CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA JUMENT ET REGULATION HORMONALE DU CYCLE

1.2.1 Le cycle œstral et les profils hormonaux

Au cours de la saison de reproduction la jument présente des cycles œstraux qui sont physiologiquement divisés en deux périodes : l'œstrus d'une durée de 4 à 7 jours et le dioœstrus d'une durée de 15 jours en moyenne. L'œstrus, ou la phase folliculaire, comprend la croissance terminale du follicule préovulatoire, la maturation ovocytaire qui fait l'objet de notre étude, ainsi que l'ovulation. La durée de l'œstrus peut varier en fonction de la saison de reproduction, de l'âge de la jument ainsi que de sa race. Cette période est également caractérisée par des comportements de chaleurs de la jument et l'acceptation de la saillie. Elle est suivie par le dioœstrus, ou phase lutéale, caractérisée par la mise en place et le maintien du corps jaune.

Tous ces phénomènes ovariens qui ont lieu au cours du cycle œstral sont contrôlés par l'axe hypothalamo-hypophysaire et participent à la folliculogénèse ainsi qu'à l'ovogénèse terminale (Figure 1) (Ginther, 1992).

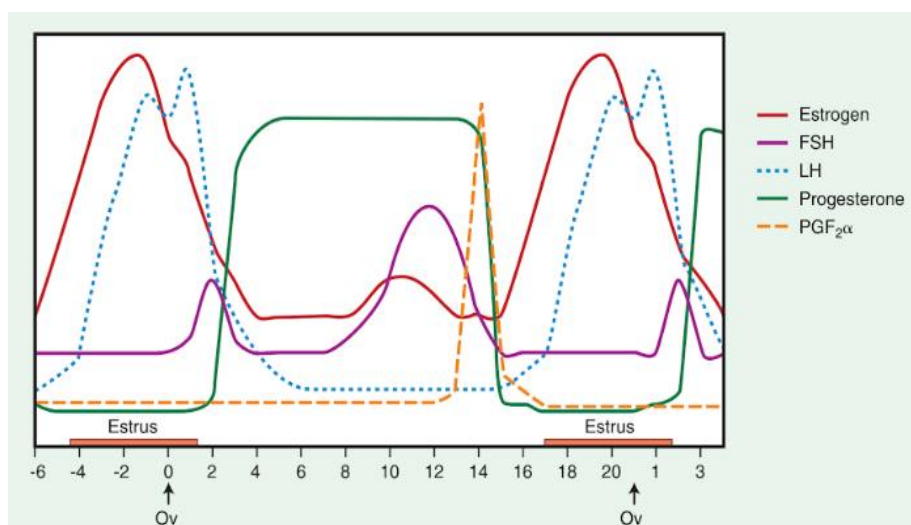


Figure 1 : Variations hormonales au cours du cycle œstral chez la jument
Source : Manual of Equine Reproduction, Brinsko and Blanchard 2011.

L'Hormone Folliculo-Stimulante (FSH) est produite par l'hypophyse antérieure et sa sécrétion est dépendante de la production de GnRH. Chez la jument, en moyenne deux pics de concentration de FSH ont lieu à 10-12 jours d'intervalle au cours du cycle œstral, l'un

apparaît en fin d'œstrus et l'autre apparaît au cours du diœstrus, 8 à 10 jours avant l'ovulation. Ces pics de FSH initient le recrutement folliculaire ainsi que la folliculogénèse terminale.

L'Hormone Lutéinisante (LH) est produite par l'hypophyse sous l'influence de la GnRH. Cette hormone est ensuite libérée dans la circulation systémique et agit sur l'ovocyte par l'intermédiaire de jonctions gap présentes dans les cellules de la granulosa. De nombreux mammifères présentent un pic de LH relativement marqué qui précède l'ovulation. Mais, chez la jument, l'augmentation de LH est plus progressive et un pic plus étalé est observé un jour après l'ovulation. La LH joue un rôle dans la maturation folliculaire, la sécrétion d'œstrogènes, l'ovulation et la lutéinisation (Ginther et al., 2008).

La progestérone est l'hormone du diœstrus, sa concentration augmente progressivement après l'ovulation chez la jument concomitamment à la formation du corps jaune. Cette hormone exerce un rétrocontrôle négatif sur la production de LH.

Les œstrogènes, principalement l'œstradiol 17β , sont des hormones produites au cours de la maturation folliculaire par les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa du follicule antral. La sécrétion d'œstradiol est stimulée par la LH.

En cas de non-gestation, les prostaglandines F 2α (PGF 2α) sont sécrétées par l'endomètre 14 à 15 jours post-ovulation. Elles entraînent la destruction du corps jaune (lutéolyse), provoquant ainsi la chute de la progestéronémie.

1.2.2 L'ovogénèse et la folliculogénèse in vivo chez la jument

L'ovogénèse constitue l'ensemble des mécanismes de différenciation des cellules germinales en ovogonies puis en pool de follicules primordiaux renfermant chacun un ovocyte primaire (Norris, Lopez, 2011). Chez la plupart des mammifères, elle se déroule lors du développement embryonnaire et foetal. C'est durant la différenciation des cellules germinales en ovogonies que celles-ci acquièrent leur capacité à entrer en division méiotique, ce phénomène est appelé compétence méiotique. Au stade ovogonie, celles-ci entrent en méiose pour former un ovocyte primaire bloqué en prophase I de méiose.

La folliculogénèse est le développement des follicules du stade primordial jusqu'à l'ovulation, elle se divise en deux phases : l'une indépendante des gonadotrophines, qui a lieu lors de la vie fœtale et néonatale de l'animal et l'autre qui se déroule à partir de la puberté et qui est influencée par les gonadotrophines (Figure 2).

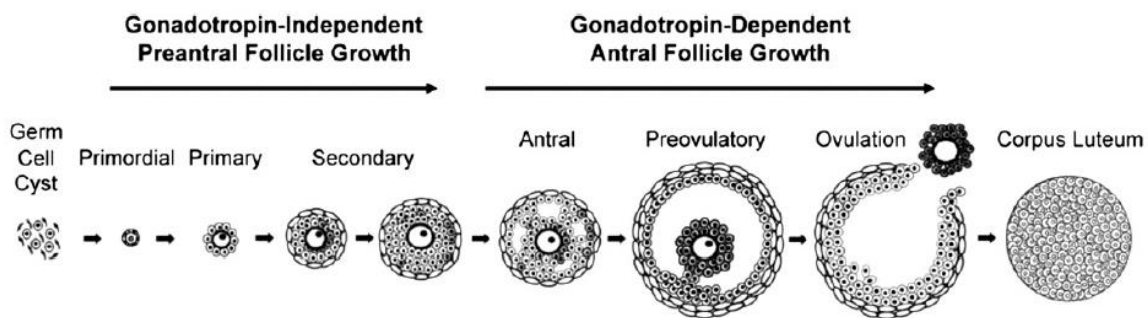


Figure 2 : Evolution anatomique d'un follicule au cours de la folliculogénèse
Source : The Endocrinology of the Mammalian Ovary, Norris et Lopez 2011.

La première phase, ou folliculogénèse basale, consiste en la formation de follicules pré-antraux. Elle débute lorsque les ovocytes bloqués en prophase I de méiose s'entourent d'une couche de cellules de granulosa ainsi que d'une lame basale aboutissant à la formation d'un « pool » de follicules primaires. De plus, au cours de la folliculogénèse basale, les cellules de la granulosa se multiplient, prennent une forme cuboïde et établissent des jonctions communicantes ('jonction gap') permettant à l'ovocyte de communiquer avec son milieu environnant.

Ce « pool » comprend environ 40 000 follicules primaires et constitue une réserve en ovocytes pour la jument car au cours de sa vie la majorité d'entre eux régresseront et seulement une centaine ovulera au cours des cycles œstraux (Raz et al, 2012).

La deuxième phase de la folliculogénèse, ou folliculogénèse terminale, est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Elle comprend le recrutement cyclique des follicules pré-antraux et leur croissance jusqu'à l'obtention d'un follicule apte à ovuler. Ce développement des follicules se déroule au centre de l'ovaire contrairement aux autres espèces et l'ovulation a lieu au niveau de la fosse ovulatoire (Figure 3).

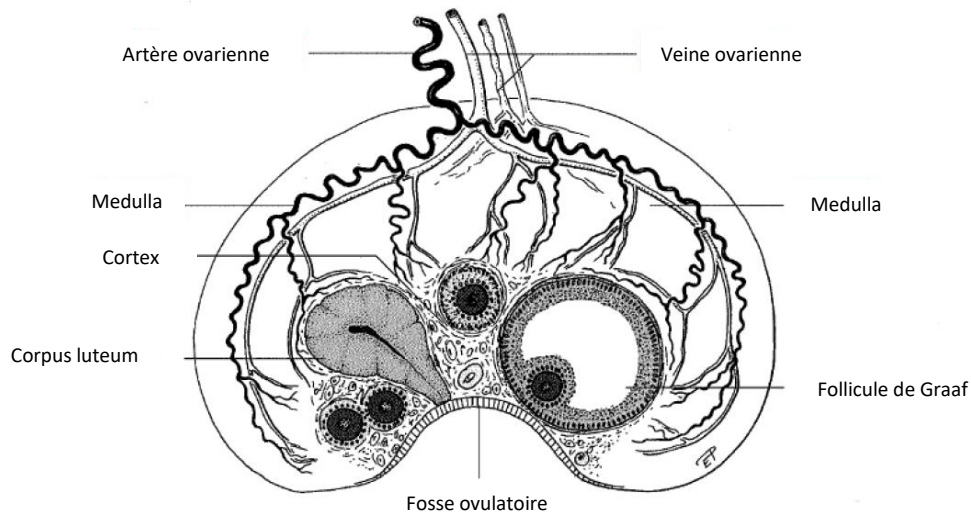


Figure 3 : Représentation schématique de l'ovaire d'une jument.
 Source : *Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas, König and Liebich, 2004*

La folliculogénèse terminale comprend plusieurs étapes :

a. Le recrutement folliculaire

La folliculogénèse basale se termine avec la formation d'un pool de follicules primaires ou pré-antraux mesurant approximativement 10mm. L'entrée en folliculogénèse terminale débute par le recrutement de follicules primaires devenus sensibles à l'action de FSH. La jument présente une à deux vagues folliculaires au cours du cycle œstral (Raz et al, 2012).

Lors d'un cycle avec deux vagues folliculaires, une vague anovulatoire suit l'œstrus, elle est communément appelée dans la littérature : seconde vague. Les follicules recrutés lors de cette vague ne libèrent pas d'ovule et s'atrophient. Il faut attendre la vague suivante, dite première vague, qui débute en milieu de diœstrus pour que le follicule dominant puisse évoluer vers une ovulation après la régression du corps jaune.

b. Formation des follicules secondaires et tertiaires

Après le recrutement des follicules pré-antraux, la maturation des follicules se poursuit comprenant de nombreux remaniements. Au cours de cette maturation plusieurs structures se forment : une seconde couche de cellules de la granulosa, l'antrum riche en glycoprotéines et les deux couches externes du follicules qui sont les thèques externe et interne. Cette

dernière acquiert les ultrastructures nécessaires à la synthèse de substances androgènes qui seront ensuite transformées en œstrogènes par les cellules de la granulosa qui ont un rôle déterminant dans cette croissance folliculaire. Ces oestrogènes permettront la multiplication des épithéliocytes folliculaires ainsi que l'expansion de l'antrum. Le follicule secondaire est ainsi un large follicule pré-antral avec différentes zones bien délimitées : une zone pellucide (ou corona radiata), les couches de cellules de granulosa accolées à l'ovocyte et deux couches plus externes. Le développement de ces zones tissulaires n'altère en rien les jonctions communicantes établies au cours de la folliculogénèse basale qui lient étroitement l'ovocyte à son milieu environnant.

Le follicule tertiaire se différencie de part son diamètre important, le développement de l'antrum sous l'influence d'une concentration élevée de FSH et la formation d'un cumulus oophorus entourant l'ovocyte et le rattachant fermement à la paroi folliculaire. Cet amas tissulaire est le résultat de l'épaississement et de la multiplication des cellules de la granulosa.

c. La déviation folliculaire

Chez une espèce mono-ovulante, la déviation folliculaire (ou sélection) est le processus par lequel un seul follicule est choisi au sein de la cohorte de follicules en croissance pour poursuivre son développement tandis que le reste des follicules deviendra atreétique (Diaw, 2014).

En effet, le développement folliculaire est le même pour tous les follicules pendant la phase de croissance commune, ce qui suggère qu'il n'y a pas de follicule prédestiné à ovuler lors du recrutement folliculaire (Raz et al, 2012). La dominance s'effectue lorsque qu'un premier follicule atteint un diamètre d'environ 25mm. Il s'établit alors un blocage du second plus large follicule et commence alors le phénomène de dégénérescence sur l'ensemble des follicules n'ayant pas atteint ce stade de développement. Des études menées sur le suivi des follicules ont montré que ce phénomène de dominance folliculaire a lieu 6 à 7 jours avant l'ovulation (Ginther, 1992).

1.2.3 La maturation ovocytaire

Après le recrutement et la sélection folliculaire, l'ovocyte ainsi que le follicule vont subir des modifications morphologiques afin que l'ovocyte soit apte à la fécondation.

La maturation ovocytaire débute par la reprise de la division méiotique qui était arrêtée en phase diplotène de prophase I depuis le stade embryonnaire. Au cours de cette maturation l'ovocyte va également subir des transformations cytoplasmiques ainsi qu'une différenciation nucléaire (Küpker, Diedrich, 2000). L'ovocyte sera de nouveau arrêté en métaphase II de méiose au moment de l'ovulation, c'est à ce stade qu'il est apte à la fécondation. Tous ces changements structuraux sont utilisés comme repères pour contrôler l'avancement de la maturation ovocytaire *in vitro*.

a. Facteurs impliqués dans le blocage de la division méiotique

Comme nous l'avons vu précédemment, depuis le développement embryonnaire, l'ovocyte est entouré de plusieurs couches de cellules très compactes qui forment le cumulus oophorus. Ces couches de cellules sont liées entre elles par des jonctions gap qui permettent d'établir une communication constante entre le milieu folliculaire et l'ovocyte (Barone, 1986). Des études menées chez les espèces humaine, bovine, porcine et chez les rongeurs ont démontré que ces jonctions gap participaient au maintien de ce blocage en prophase I (Buratini et al., 2017 ; Sen, Caiazza, 2013). En effet, ces jonctions permettent le passage de molécules d'AMPc (Adénoside Monophosphate Cyclique) produites par les cellules de la granulosa. Il en résulterait le maintien d'une forte concentration en AMPc et le blocage en prophase I de la méiose. Ces études ont démontré l'implication de récepteurs protéiques GPR3 et GPR12 dans le maintien d'une concentration élevée en AMPc dans l'ovocyte.

La taille de l'ovocyte joue également un rôle majeur dans le blocage de la division méiotique (Sen, Caiazza, 2013). Des études menées *in vitro* ont montré que la reprise de la division méiotique des ovocytes dépendait du diamètre seuil du follicule atteint. Chez la jument, la taille minimale du follicule dominant est de 22.5mm (Ginther et al., 2001).

b. Facteurs déclenchant la reprise de la maturation ovocytaire

La reprise de la compétence méiotique au cours de la maturation cellulaire est dépendante de l'environnement de l'ovocyte. L'augmentation de la concentration de LH avant l'ovulation joue un rôle primordial dans la maturation ovocytaire et dans la rupture de la vésicule germinale (Küpker, Diedrich, 2000 ; Sen, Caiazza, 2013). En effet, la LH provoque la phosphorylation des connexines qui composent les jonctions gap, conduisant ainsi à une désolidarisation des cellules du cumulus oophorus et au passage de l'ovocyte d'un état compact à un état expansé. La rupture de ces communications entraîne également une chute de la concentration en AMPc dans le milieu ovocytaire qui maintenait le blocage de la division méiotique.

Des études menées chez la vache et la truie (Mermillod, Marchal, 1999) ont montré que la reprise de la compétence méiotique nécessite également l'activation d'un complexe protéique appelé Maturation Promoting Factor (MPF). Suite à la rupture de la vésicule germinale, les MPF migrent au sein du noyau de l'ovocyte où se trouvent des complexes protéiques cdc2-cyclinB nécessaires à son activation. Ensuite, les MPF exerceraient leur rôle dans le remodelage du cytosquelette pour permettre la division méiotique.

c. Maturation de l'environnement ovocytaire

Le cytoplasme subit également une maturation, on observe une migration de granules corticaux vers la zone corticale avec un rassemblement des autres organites dans la région périnucléaire. Un remaniement du cytosquelette est également observé avec des changements métaboliques permettant le bon déroulement de la division méiotique. Ce remaniement cytoplasmique est visible par coloration fluorescente des chromosomes condensés, cela constitue donc un marqueur du déroulement de la division méiotique.

D'autres facteurs interviennent également au cours de la maturation ovocytaire. L'ovocyte sécrète des facteurs de croissance (GDF9 et BMP15) afin d'assurer une continuité dans la communication avec les cellules de la granulosa. Des études sur la vache ont mis en avant l'implication des facteurs de croissance épidermiques (EGF) dans le contrôle de la maturation ovocytaire, l'expansion du cumulus et l'inhibition de l'apoptose (Gandolfi et al.,

1996 ; Diaw, 2014). Chez la jument, la présence de récepteurs EGF au sein du follicule préovulatoire et l'action de ce facteur dans l'initiation de la maturation ovocytaire via son action paracrine dans le mécanisme de stimulation de la LH a été mis en évidence également (Lindbloom et al., 2008).

1.2.4 L'ovulation

La maturation ovocytaire à l'intérieur du follicule s'achève par un nouveau blocage de la division méiotique en métaphase II de méiose. Une fois la folliculogénèse achevée, les parois du follicule fusionnent avec la paroi de l'ovaire au niveau de la fosse ovulatoire, l'ovocyte mature est ainsi libéré dans l'oviducte et est prêt à être fécondé.

2. AVANCEES TECHNOLOGIQUES SUR LA REPRODUCTION ASSISTEE CHEZ LA JUMENT

Les biotechnologies de la reproduction chez la jument visent à produire des embryons sur une jument donneuse de haute valeur génétique qui seront ensuite remis en place dans une jument receveuse qui assurera la gestation.

La reproduction assistée est très utilisée pour les juments sportives qui ne peuvent combiner carrière sportive et reproduction. Du point de vue réglementaire, la Fédération équestre Internationale (FEI) interdit les juments de concourir après leur 4^e mois de gestation. Cependant, cette limite n'est pas clairement définie par les fédérations sportives françaises exceptée dans le domaine des courses. En effet, toute jument déclarée saillie ne peut courir les courses de trot. Pour les courses de galop, les juments gravides peuvent courir jusqu'à 4 mois de gestation et la saillie est déclarée et annoncée au parieur par un symbole (Launois, Bruyas, 2020). La longue durée de gestation est un facteur très handicapant pour les juments de haute valeur génétique et le calendrier des événements sportifs est inadapté à la gestion de la reproduction en haute saison. La recherche dans ces biotechnologies vise à faciliter la mise à la reproduction de ces juments mais également l'utilisation des étalons qui concourent afin de limiter l'impact de la reproduction sur leur carrière sportive.

Plusieurs facteurs retardent la recherche dans le domaine des biotechnologies de la reproduction. Les particularités du cycle œstral limitent fortement le nombre d'ovocytes fécondables par cycle et par an. De plus, les chercheurs utilisent dans un premier temps des ovaires prélevés sur des juments destinées à la consommation humaine. Cependant certains pays comme les Etats-Unis ont interdit l'abattage de chevaux sur leur territoire, les équipes de recherches doivent donc se fournir dans d'autres pays comme le Canada ce qui implique des contraintes de conservation des ovocytes équins au cours du transport (Lewis et al., 2016 ; Love et al., 2003 ; Diaw et al., 2018).

2.1 LA PRODUCTION D'EMBRYONS IN VIVO

2.1.1 *La superovulation*

La technique de superovulation consiste à augmenter significativement le nombre de follicules ovulatoires par cycle œstral en court-circuitant le phénomène d'atrésie. Chez la jument, l'injection répétée deux fois par jour d'extrait hypophysaire équine (EPE) a permis d'obtenir une moyenne de 3.8 ovulations par cycle et la récolte de 2 embryons viables par juments traitées (Squires et al., 1987 ; Squires, McCue, 2007). Ce traitement doit être instauré sur des femelles présentant des follicules de taille comprise entre 15 et 20mm. Les taux de bons embryons obtenus chez la jument restent bas comparativement à la vache qui est aussi une espèce monovulante. En effet, la superovulation chez la vache permet d'obtenir un nombre d'embryons viables supérieurs à 6,5 (Pelletier, 2014). Cette technique reste donc peu utilisée en routine chez la jument.

2.1.2 *Collecte et transfert d'embryons in vivo*

Actuellement, le transfert d'embryons est la biotechnologie la plus utilisée chez les éleveurs de chevaux de compétition. En France, les premiers transferts d'embryons ont été pratiqués en 1986 et c'est vers 1989 que la technique a été utilisée en routine. Le Système d'Information Relatif aux Equidés (SIRE) a recueilli environ 8700 déclarations de poulains nés en France d'un transfert d'embryon entre 1989 et 2014. La Figure 4 représente l'évolution du nombre de poulains nés par cette technique et du nombre de juments donneuses.

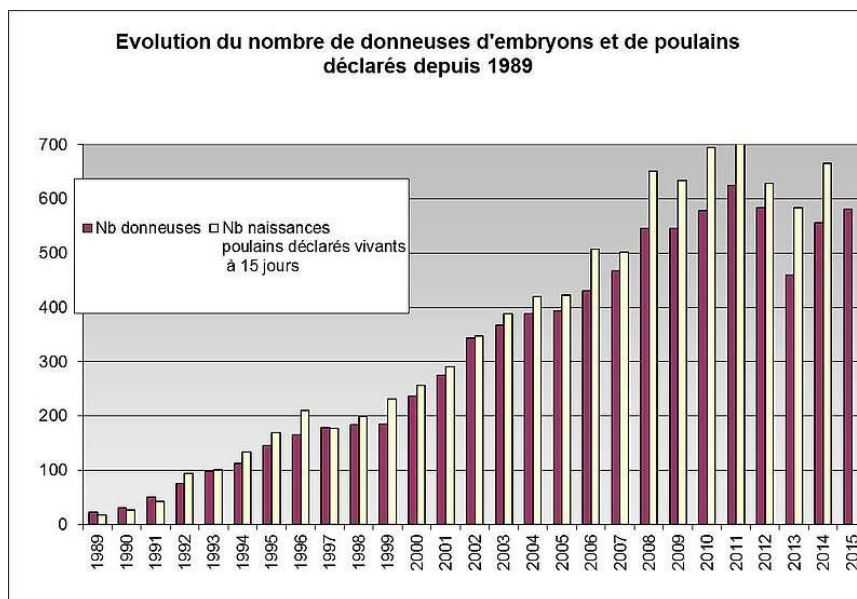


Figure 4 : Evolution du nombre de donneuses d'embryons et de poulains nés par transfert d'embryons produits *in vivo* entre 1989 et 2014.

Source : <https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/reproduction/transfert-d-embryons>

Cependant, chaque race équine répond aux exigences d'un Stud book ne permettant pas toujours la pratique de ce mode de reproduction. Le Stud book des races Selle français, Anglo-arabe et trait autorise la pratique du transfert d'embryon. Le Trotteur français a des autorisations particulières ne permettant qu'une gestation par an pour les juments donneuses à forte valeur génétique et après autorisation de la Commission du Stud book. Concernant les races Pur-sang et croisé Pur-sang, le Stud book n'autorise pas cette technique de reproduction.

La production d'embryons *in vivo* nécessite un suivi de reproduction rigoureux de la jument donneuse afin de connaître le jour précis de l'ovulation (Hinrichs, 2018). Ce suivi peut être effectué par examen échographique quotidien associé à l'induction de chaleurs. Cette technique requiert également que la jument donneuse présente un appareil reproducteur intègre, permettant le développement embryonnaire jusqu'à jour 7 post ovulation. Sept à huit jours post ovulation, l'utérus de la jument donneuse est lavé à de multiples reprises avec du liquide physiologique qui est ensuite récupéré par aspiration afin de collecter le ou les embryons. Le transfert embryonnaire a lieu entre un jour avant la date d'ovulation et trois jours après que la jument receveuse ait ovulé. Le taux de réussite pour la technique de transplantation embryonnaire *in vivo* chez la jument varie entre 56 et 66% (Hinrichs, 2018).

2.2 PRODUCTION IN VITRO D'EMBRYONS

2.2.1 *La récolte d'ovocytes in vivo (pour revue, Hinrichs 2018; Deleuze, Ponthier, et Hanzen 2009)*

Cette nouvelle technique de reproduction assistée offre de nouvelles perspectives dans la conservation de la génétique de jument présentant une folliculogénèse normale, mais des troubles de la reproduction liées à l'ovulation, à l'intégrité de l'oviducte ou de l'utérus. Cependant elle ne s'applique pas aux juments inaptes à produire des ovocytes de bonne qualité.

Les premières techniques de récupération d'ovocytes ont été réalisées dans les années 1980 avec des approches chirurgicales telles que la laparotomie, la colpotomie et la ponction échoguidée par le flanc. Les deux premières techniques ont rapidement été écartées au profit de la ponction échoguidée par voie transvaginale développée dans les années 1990. L'ovaire est amené manuellement sur la partie péritonéale du mur vaginal puis une sonde échographique munie d'un guide permettant le passage d'une aiguille est introduite dans le vagin de la jument. Ensuite, le manipulateur repère le follicule à prélever puis le transperce sous contrôle échographique à l'aide de l'aiguille au travers de la paroi vaginale. Le liquide folliculaire est aspiré puis le contenu folliculaire est rincé plusieurs fois et le manipulateur racle la paroi folliculaire avec l'aiguille afin de détacher l'ovocyte.

La taille des follicules à ponctionner a fait également l'objet de différentes études (pour revue, Hinrichs 2018; Deleuze, Ponthier, et Hanzen 2009). Les follicules préovulatoires (>25mm) ont l'avantage d'être facilement repérables en raison de leur grande taille et le COC est détaché de la paroi folliculaire rendant la collecte plus facile. Pour la récupération d'ovocytes provenant de ces follicules, deux techniques peuvent être utilisées : la ponction par les flancs ainsi que la voie transvaginale échoguidée. Les ovocytes provenant des follicules immatures (<25mm) sont plus difficiles d'accès. Leur taille étant plus petite, seule la technique transvaginale échoguidée est réalisable. De plus l'ovocyte est solidement attaché aux parois du follicule, il faut donc bien veiller à racler l'ensemble de la paroi pour récupérer l'ovocyte.

La collecte d'un ovocyte mature nécessite un suivi rigoureux du développement folliculaire et un recours potentiel au traitement simultané de GnRH (3 injections à 6h d'intervalle pour induire l'ovulation) et de hCG (1 injection 48h avant la date d'ovulation programmée). Si

l'ovocyte est destiné à être fécondé par l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), celui-ci doit être transporté au laboratoire dans les 12 heures suivant l'extraction (Hinrichs, 2018).

La récolte d'ovocytes provenant de follicules immatures offre de nombreux avantages : il n'est pas nécessaire d'avoir un suivi rigoureux du cycle, un premier suivi permet de repérer une vague folliculaire correspondant à un nombre important de follicules de taille comprise entre 5 et 10mm, il est ensuite possible de récolter les ovocytes tous les 14 jours. Le nombre d'ovocytes ainsi que le taux de compétence à la maturation sont similaires pour les ovocytes récoltés en dehors de la saison de reproduction par rapport à ceux récoltés en saison de reproduction (Choi et al., 2016). De plus, ces ovocytes arrêtés en prophase I sont moins fragiles à température ambiante ce qui facilite leur transport.

Cependant, les ovocytes issus de follicules préovulatoires présentent un taux d'obtention de blastocystes plus élevés que les ovocytes provenant de follicules immatures (Foss et al., 2013). Le choix de la provenance des ovocytes s'effectue donc en fonction de l'expérience du manipulateur, de l'accès au laboratoire pratiquant l'ICSI et enfin des objectifs de l'éleveur.

2.2.2 Le transfert d'ovocytes chez une jument porteuse inséminée

Une alternative à la fécondation *in vitro* est la fécondation *in vivo*, après remise en place des ovocytes maturés *in vitro* dans l'oviducte d'une jument porteuse. La technique de transfert consiste en une ouverture par les flancs permettant l'accès à l'ovaire. L'ovocyte est ensuite introduit dans l'ampoule de l'oviducte à l'aide d'une pipette (Riera et al., 2016). Afin que la réimplantation soit efficace, la jument receveuse doit se trouver sous imprégnation oestrogénique en présence d'un follicule préovulatoire dont le contenu est aspiré afin d'éviter la fécondation de son ovocyte. L'insémination avec de la semence fraîche ou réfrigérée est généralement réalisée après la mise en place de l'ovocyte dans la trompe utérine de la jument porteuse. L'âge ne modifiant pas la capacité de maturation des ovocytes (Riera et al., 2016), cette méthode permet la reproduction de juments âgées donneuses d'ovocytes. Cependant cette méthode est désormais peu utilisée car elle est remplacée par l'aspiration folliculaire.

2.2.3 Fécondation *in vitro* et ICSI

Une fois les ovocytes recueillis et maturés, l'étape suivante est la fécondation *in vitro* ainsi que la culture au laboratoire jusqu'à l'obtention d'un embryon viable. Le premier poulain issu d'une fécondation *in vitro* est né en 1991 en France (Cognié et al., 1992) à partir d'ovocytes matures et de semence fraîche.

Une alternative à la technique de fécondation *in vitro* classique, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), a été développée récemment dans l'espèce équine, à l'instar de ce qui est pratiqué couramment chez l'homme. Avant l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes, la motilité des spermatozoïdes est ralentie à l'aide d'une solution de polyvinylpyrrolidone, ils sont sélectionnés puis un spermatozoïde est injecté dans le cytoplasme de l'ovocyte. Les étapes de l'ICSI sont résumées dans la Figure 5.

Les étapes de l'Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)



Figure 5 : Etapes de la réalisation de la technique ICSI chez la jument.

Source : Site internet de l'ifce : <https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/reproduction/licsi-chez-la-jument>

Cette technique est très demandée lorsque le nombre de spermatozoïdes est limité, notamment pour un étalon décédé. Une étude menée sur le développement de 10 poulains nés après ICSI montre qu'aucun d'entre eux ne présentait d'anomalies au niveau du développement, de la taille et du poids (Valenzuela et al., 2018).

2.2.4 La cryopréservation d'ovocytes

Cette technique a pour objectif de préserver le matériel génétique des juments à fort potentiel génétique, notamment après leur mort, et de constituer une banque d'ovocytes pour les recherches en reproduction équine. La cryopréservation d'ovocytes est de nos jours assez bien maîtrisée chez l'homme avec des taux de fécondation et de formation de blastocystes équivalents à ceux des groupes contrôles (Garcia et al., 2011). Cependant chez la jument, les taux de blastocystes obtenus à partir d'ovocytes cryoconservés sont très faibles (1-15%) (Canesin et al., 2018), il n'est donc pas possible actuellement d'utiliser cette technique en routine.

2.3 UTILISATION DES TECHNIQUES DE COLLECTE D'OVOCYTES *IN VIVO* ET ICSI EN FRANCE

2.3.1 Intérêt de la pratique de production d'embryons *in vitro*

Le développement de ces nouvelles techniques est comparé au transfert d'embryons qui constitue actuellement la technique de référence de reproduction assistée chez la jument de compétition. Quelque soit la méthode, l'objectif principal est la naissance d'un poulain viable par une jument porteuse afin que la jument présentant une valeur génétique exceptionnelle puisse poursuivre son calendrier de compétition. La récolte d'ovocytes immatures présente de nombreux avantages. Elle permet aux juments dont l'intégrité de l'appareil reproducteur est altérée en raison de son âge ou de plusieurs manipulations antérieures de pouvoir produire des poulains. Cette technique présente également un intérêt pour les jeunes juments en pleine carrière sportive car la collecte d'ovocyte peut s'effectuer l'hiver lorsque le calendrier des compétitions est allégé. En effet, la récolte d'embryon *in vivo*

nécessite que la jument donneuse soit suitée en période de reproduction et qu'elle maintienne l'embryon 7 jours dans son appareil génital. La collecte d'ovocyte immatures, quant à elle, nécessite un suivi plus léger et peut s'effectuer à n'importe quel mois de l'année, il est donc plus facile d'adapter la récolte au calendrier des compétitions. La récolte d'ovocytes immatures présente également l'intérêt de prélever plusieurs ovocytes par session et donc d'augmenter le nombre d'embryons produits. Ces derniers sont ensuite congelés et peuvent être directement réimplantés après fécondation, conservés ou transportés dans le cadre de ventes d'embryons. Enfin, cette technique ne nécessite l'utilisation que d'un seul spermatozoïde mobile pour la fécondation des ovocytes matures permettant l'utilisation de la semence d'étalons peu fertiles et la préservation du matériel génétique d'étalons dont le stock de spermatozoïdes est limité.

Les techniques de collectes d'ovocyte par aspiration folliculaire et d'ICSI sont pratiquées dans plusieurs haras en France dont celui de Béliigneux (01960 Servas) qui propose aux éleveurs de prélever les ovocytes au centre d'insémination de Chatenay (01320 Le Moulin) afin de les envoyer à un laboratoire (Avantea, Italie) pour la pratique de l'ICSI. Les embryons ainsi produits sont ensuite envoyés congelés au centre d'insémination pour être implantés dans la jument porteuse.

Les rendements annoncés sur la brochure du haras de Béliigneux pour la période 2018-2019 pour les techniques OPU (Ovum Pick-Up)/ICSI sont de 2,1 embryons récoltés par ponction sur 60 juments donneuses. Le taux de gestation à 15 jours suite à l'implantation d'un embryon congelé est de 75% (12 embryons implantés et 9 gestations confirmées à 15 jours). Le taux de gestation est équivalent à celui du transfert d'embryon *in vivo*, du fait d'une sélection effectuée au laboratoire Avantea avant la congélation et le renvoi des embryons.

Le coût de revient de la technique d'OPU et ICSI pour l'éleveur est variable en fonction du nombre d'embryons obtenus et congelés. Le tableau 1 résume les tarifs appliqués par le Haras de Béliigneux pour les techniques de transfert d'embryon et d'OPU/ICSI. Les tarifs concernant la valeur génétique de la semence ne sont pas répertoriés dans ce tableau.

Tableau 1 : Comparaison des coûts appliqués par le Haras de Bélienx pour les techniques de transfert d'embryon récolté *in vivo* et OPU/ICSI avec implantation d'embryon congelé. Les tarifs sont tous exprimés en hors taxe avec l'application d'une TVA de 20%.

Source : <http://www.beligneuxleharas.com/icsi-opu-ponction-ovocytaire-embryon-centre-insemination-chacco-blue/>

Techniques	Transfert d'embryon	OPU et ICSI
Suivi gynécologique	64€ HT	80€ HT
Récolte d'embryon	192€ HT	
Implantation dans une jument receveuse	120€ HT	
Prélèvement sanitaire		45€ HT
Ponction ovocytaire		800€ HT
Expédition des ovocytes		150€ HT
Maturation de tous les ovocytes		150€ HT
ICSI de tous les ovocytes matures		380€ HT
Congélation d'un embryon		420€ HT
Importation d'un embryon		150€ HT
Pension sur place de la jument donneuse	11,64€ HT par jour	11,64€ HT par jour
Location d'une jument receveuse après implantation de l'embryon et 45j de gestation	2688€ HT	2688€ HT
Total pour l'implantation/congélation d'un embryon avec la location d'une jument receveuse (hors pension et suivi gynécologique) TVA 19%	3000€ HT	4737€ HT

Le coût de revient à l'embryon (hors location d'une jument porteuse, pension au centre et frais de génétique) est de 376€ HT pour la technique de transfert d'embryons *in vivo*. Le coût total pour une ponction ovocytaire suivi d'ICSI est dépendant du nombre d'embryon obtenus : 1605€ HT pour 0 embryon, 2175€ HT pour 1 embryon, 2745€ pour 2 embryons et 3315€ HT pour 3 embryons. D'un point de vue financier, le transfert d'embryons *in vivo* reste très avantageux. Divers partenariats sont en cours d'études pour réduire le coût des techniques d'OPU/ICSI pour les juments à valeur génétique exceptionnelle.

3. IMPLICATION DES PROTEINES WNTS DANS LA MATURATION OVOCYTAIRE IN VITRO.

La maturation ovocytaire *in vitro* constitue l'étape limitante des biotechnologies de production d'embryons *in vitro*. L'optimisation de cette étape de la reproduction assistée constitue un véritable enjeu pour la filière équine. Une voie prometteuse est l'utilisation de facteurs de croissance comme ceux de la famille des protéines WNTs.

3.1 DECOUVERTE DES PROTEINES WNTS

Les protéines WNTs ont été découvertes en 1982 chez les mammifères suite à une expérience menée sur des souris infectées par le virus de la tumeur mammaire de la souris (Nusse, Varmus, 1982). Elles développaient des tumeurs dans lesquelles le gène *Int1* était activé. Ce gène *Int-1* est analogue au gène *Wingless (Wg)* présent chez la drosophile et impliqué dans la délimitation des segments du corps (Wodarz, Nusse, 1998). La combinaison du nom des deux gènes a donné l'appellation WNT. Les gènes WNTs codent pour une large famille de 19 protéines qui sont impliquées dans divers mécanismes cellulaires comme l'induction embryonnaire, la différenciation, la prolifération, les migrations et l'apoptose cellulaires (Miller, 2002). Ces protéines sont également impliquées chez l'adulte dans le maintien de l'homéostasie et une modification de l'activation du signalment des WNTs peut conduire à des cancers (Cadigan, Nusse, 1997 ; Miller, 2002). Les voies de signalisations activées par ces protéines sont très complexes, il en existe trois : la principale qui est la voie dite « canonique » WNT/ β -caténine (aussi connue sous le nom de cadherin-associated protein- β), les deux autres voies sont dites « non canonique dépendante », il s'agit des voies « Planar Cell Polarity » (PCP) et WNT/ Ca^{2+} .

3.1.1 La voie de signalisation canonique WNT/ β -caténine

Les protéines WNTs agissent sur leurs cellules cibles en se liant à des récepteurs protéiques Frizzled (Fz) et avec le récepteur des lipoprotéines basse densité (Low-density-lipoprotein Receptor Related Protein) 5 ou 6 (LRP) localisés à la surface de la cellule (Logan, Nusse, 2004). La liaison des protéines WNTs entraîne l'hétérodimérisation des récepteurs. En l'absence de protéine WNT, la concentration en β -caténine dans le milieu cellulaire reste stable grâce au complexe protéique comprenant les protéines intracellulaires suivantes : glycogène synthase kinase-3 β (GSK3), Axin et la protéine de la polypose adénomateuse du colon (Adenomatous Polyposis Coli, APC). Ensemble, ces protéines phosphorylent la β -caténine la rendant inactive et conduisant à sa dégradation par un protéasome (Sedes, 2014). Lorsque la protéine WNT se fixe au complexe FZ/LRP, la protéine « Dishevelled » (Dsh) se lie au complexe et permet l'inactivation de la kinase GSK3 entraînant la dissociation du complexe APC/Axin/GSK3. Il en résulte l'augmentation de la concentration en β -caténine activée dans le cytoplasme de la cellule cible (Figure 6) (Logan, Nusse, 2004 ; Lapointe, 2012).

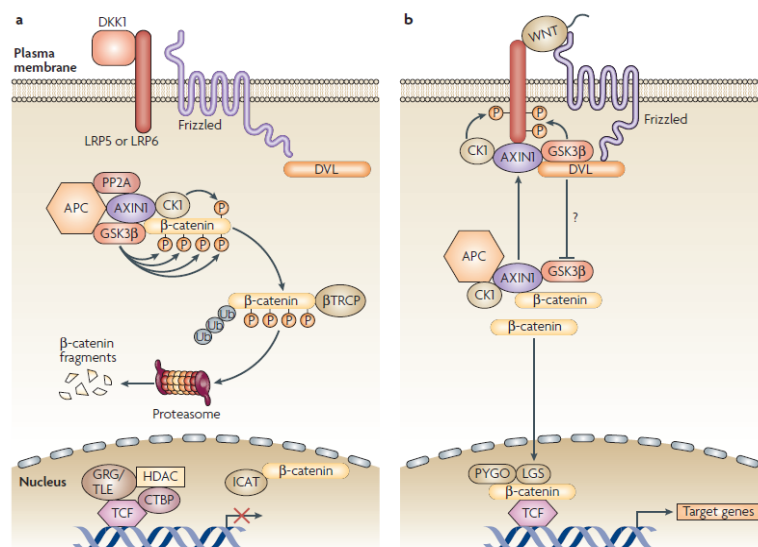


Figure 6 : Schéma représentant la voie de signalisation canonique des WNT. En a une protéine antagoniste aux WNTs empêche la transmission du signal et la β -caténine est inactivée puis dégradée. En b la protéine WNT est couplée à ses récepteurs et la β -caténine active agit dans le noyau et permet la transcription de gènes cibles.

Source : *WNT signalling in the immune system: Wnt is spreading its wings*, Staal 2008

Ensuite la β -caténine présente dans le cytoplasme se retrouve dans le noyau de la cellule et agit comme régulateur transcriptionnel en déplaçant des inhibiteurs qui sont liés aux facteurs

de transcription « T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor » (TCF/LEF) activant ainsi la production de certains gènes cibles. Le β -catenin entre dans la composition des jonctions serrées et du cytosquelette qui permettent l'adhésion intracellulaire ainsi que la migration cellulaire (Lapointe, 2012).

3.1.2 La voie de signalisation non canonique dépendante « PCP »

La voie de signalisation « Planar Cell Polarity » a un rôle majeur dans la régulation de la polarité cellulaire au travers de la réorganisation du cytosquelette. En effet, elle intervient dans le processus de contrôle des mouvements cellulaires de convergences et d'extension lors de la gastrulation (Wansleben, Meijlink, 2011). Cette voie est activée par la liaison des protéines WNTs à leurs récepteurs Fz sans nécessiter la présence de récepteurs LRPs ; Il s'en suit l'activation de facteurs protéiques entraînant une réorganisation du cytosquelette. Une autre activation est possible par cette voie aboutissant à l'activation de la voie « JUN N-terminal kinase » (JNK) qui a également un effet sur la réorganisation du cytosquelette et sur la transcription de certains gènes (Staal et al., 2008)(Figure 7).

3.1.3 La voie de signalisation non canonique dépendante WNT/Ca²⁺

La voie WNT/Ca²⁺ a été découverte plus récemment que les voies citées précédemment. Elle peut autant influencer la voie canonique que les voies non canoniques de signalisation des WNTs. La voie de signalisation WNT/Ca²⁺ a été mise en évidence suite à l'injection d'ARN messenger des protéines WNT-5a et WNT-11 au sein d'embryons de poissons zèbre augmentant la concentration en calcium des enveloppes entourant le blastocyste (Kohn, Moon, 2005). Elle est activée par la liaison de la protéine WNT à son récepteur Fz entraînant l'attachement de la protéine G au récepteur Fz. Il s'en suit l'activation de la phospholipase C (PLC) menant au clivage du « Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate » (PtdIns(4,5)P₂) en Inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycerol (DAG). La liaison de l'IP₃ avec son récepteur localisé sur le réticulum endoplasmique permet la libération des réserves de calcium dans le cytosol activant des facteurs impliqués dans la réorganisation du cytosquelette, l'activation de facteurs transcriptionnels inhibant la voie de signalisation canonique (Staal et al., 2008 ; Kohn,

Moon, 2005). Le calcium a ainsi le rôle de second messenger dans l'action biologique des protéines WNTs (Figure 7).

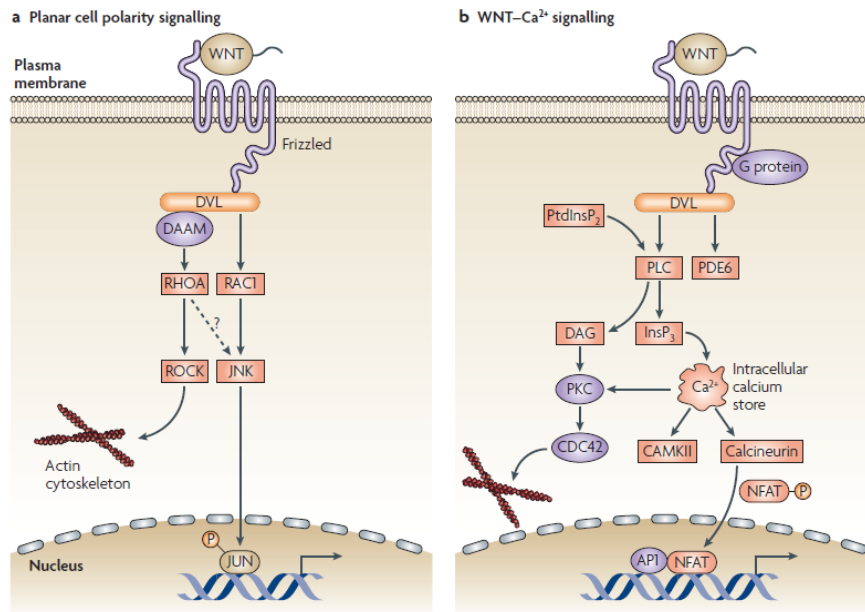


Figure 7 : Schéma représentant les voies de signalisation non canoniques des WNT.
 Source : *WNT signalling in the immune system: Wnt is spreading its wings*, Staal 2008

3.2 IMPLICATION DES PROTEINES WNTS DANS LA REPRODUCTION DES FEMELLES

L'implication de la protéine WNT dans la différenciation sexuelle a été démontré pour la première fois chez la souris en 1999. En effet, une masculinisation des voies génitales a été observée chez de jeunes souris femelles n'exprimant pas le gène codant pour la protéine WNT-4 (Vainio et al., 1999). Après cette découverte de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à cette famille de protéine et à leur action dans le développement ovarien et la maturation ovocytaire. L'expression des protéines WNTs a été mise en évidence dans la régulation de la stéroïdogenèse ovarienne chez la souris (Lapointe, Boerboom, 2011). Leur expression a été détectée au sein des cellules de la granulosa et du COC chez la souris, la femme et la vache (Abedini et al., 2016 ; Hsieh et al., 2002 ; Wang et al., 2010 ; Sanchez et al., 2014). Certaines d'entre elles sont impliquées dans le maintien des caractéristiques des cellules de la granulosa et dans le bon déroulement des échanges hormonaux entre l'ovocyte

et son environnement chez la souris via l'utilisation de la voie canonique (WNT/ β -catenin)(pour revue, Liu et al., 2010 ; Harwood et al., 2008). Il a également été décrit que la protéine WNT-2 a une action sur le développement du follicule antral et l'inhibition de l'atrésie folliculaire chez la souris (Wang et al., 2010 ; Sonderegger et al., 2010). Ces données suggèrent que ces protéines WNTs pourraient avoir une influence sur la maturation ovocytaire.

A notre connaissance, il y a peu de données sur l'implication des WNTs dans la maturation ovocytaire *in vitro*. Chez le porc, la protéine WNT-7a inhibe la croissance et l'expansion des cellules du cumulus (Spate et al., 2014). Chez la vache, l'expression du gène WNT-2b augmente au cours de la maturation *in vitro* suggérant son implication dans l'expansion du COC (Diaw, 2014). Enfin une autre étude menée chez la ratte a montré l'expression de la protéine WNT-2 dans les cellules de la granulosa et l'expression de la protéine WNT-2b sur les cellules épithéliales de l'ovaire (Ricken et al., 2002).

En ce qui concerne la jument, les recherches sur l'implication des protéines WNTs dans la fonction de reproduction ont débuté plus tardivement. C'est en 2011 que l'expression des gènes codant pour les protéines WNTs a été mise en évidence au sein de l'endomètre de jument dans un premier temps, puis dans l'embryon au cours des premiers stades de gestation (Atli et al., 2011). Ainsi l'expression de onze gènes WNT : WNT-2, WNT-2b, WNT-4, WNT-5a, WNT-5b, WNT-7a, WNT-8a, WNT-9b, WNT-10b, WNT-11 et WNT-16 ainsi que leurs antagonistes SFRP-1, SFRP-2, SFRP-5, DKK-1, DKK-2 et WIF-1 a été décrite. L'ensemble de ces données soulève la question du rôle éventuel des protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire chez cette espèce.

3.3 ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES WNTs AU COURS DE LA MATURATION OVOCYTAIRE *IN VITRO* CHEZ LA JUMENT

3.3.1 *Mise en évidence des gènes codant pour les protéines WNTs après 30h de maturation ovocytaire*

Récemment des gènes codant pour les protéines WNTs ont été identifiés dans les COCs au cours de la maturation ovocytaire chez la jument et leur durée d'expression mesurée (Diaw, communication personnelle). Pour ce faire, des ovocytes obtenus à partir d'ovaires provenant d'un abattoir local ont été placés dans un milieu de maturation (M199 medium with Earle's salts) complété avec 25µg/ml de gentamicine (Wisent Inc Multicell, Québec, QC, Canada), 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) (Wisent Inc Multicell, Québec, QC, Canada) et 5mU/ml FSH (Sioux Biochemicals, Sioux Center, IA, USA). Après 30h de maturation, les ovocytes ont été dénudés et leurs COCs récupérés pour effectuer une PCR en temps réel afin d'évaluer l'expression de 11 gènes WNTs (WNT-2, WNT-2b, WNT-4, WNT-5a, WNT-5b, WNT-7a, WNT-8a, WNT-9b, WNT-10b, WNT-11 et WNT-16). Les résultats de cette première expérience montrent l'expression de 8 gènes WNTs au cours de la maturation ovocytaire, il s'agit des gènes WNT-2b, WNT-4, WNT-5a, WNT-7a, WNT-9b, WNT-10b, WNT-11 et WNT-16. Les autres WNTs recherchées n'ont pas été détectées au sein des cellules du cumulus après 40 cycles de PCR.

3.3.2 *Etude de l'expression des gènes codant pour 8 protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire*

Une seconde expérience a été réalisée pour identifier le décours temporel d'expression de ces gènes au cours de la maturation ovocytaire (0, 1, 2, 6 et 30h). L'expression des protéines WNT-4, WNT-5a, WNT-7 et WNT-11 ne varie pas au cours de la maturation. Cependant, une augmentation significative de l'expression des gènes WNT-9b, WNT-10b et WNT-16 a été observé après 6h de maturation ainsi qu'une augmentation rapide et transitoire de l'expression du gène WNT-2b à 2h et 6h de maturation ovocytaire *in vitro* ce qui suggère son implication dans la maturation ovocytaire.

4. EFFET DE LA PROTEINE WNT-2B DANS LA MATURATION OVOCYTAIRE

Ces précédentes expériences confirment l'expression de la protéine WNT2b au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument. Notre objectif est donc de déterminer si son ajout dans un milieu classique de maturation, peut avoir une influence positive ou négative sur le déroulement de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument.

4.1 MATERIELS ET METHODES

4.1.1 *Récupération des ovocytes*

Les ovaires de juments adultes ont été récoltés au cours des saisons de reproduction 2017 et 2019 dans un abattoir situé à 40 km de distance de la faculté vétérinaire. Les ovaires ont été récupérés immédiatement après l'abattage puis ont été transportés dans une boîte isotherme permettant le maintien à une température ambiante autour de 22°C. L'âge, la race et le stade du cycle des juments ne sont pas connus.

La collecte des ovocytes est réalisée au sein du laboratoire de recherche à l'aide d'un système d'aspiration décrit précédemment (Canesin et al., 2017) avec des modifications mineures. Ce système permet la récupération des COCs immatures, ces derniers ayant la particularité d'être solidement attachés à la paroi folliculaire. Après avoir excisé les tissus entourant les ovaires, tous les follicules secondaires et tertiaires dont le diamètre est supérieur à 5mm et inférieurs à 35mm sont ouverts à l'aide d'une lame de scalpel. Leur contenu est aspiré puis leur paroi est raclée à l'aide d'une aiguille connectée à une bouteille en plastique stérile, elle-même reliée à la pompe réglée pour une aspiration à un débit de 40ml/min. Entre chaque aspiration folliculaire, le tuyau d'aspiration est rincé à l'aide d'une solution d'OPU (EquiPro OPU Recovery Medium; MOFA Global, Verona, WI, USA) (maintenue à 37°C). Une fois l'aspiration des follicules visibles effectuée, les ovaires sont découpés en tranches d'un centimètre afin d'aspirer l'ensemble des follicules présents dans l'ovaire. Les follicules contenant un liquide jaunâtre et visqueux ne sont pas aspirés et les ovaires présentant des lésions macroscopiques ont été écartés de l'étude.

Les liquides folliculaires recueillis sont ensuite filtrés au travers d'un filtre pour embryons ayant des pores de 65µm (Minitubes), le flacon est également rincé plusieurs fois à l'aide de la solution OPU qui est de nouveau filtrée. Le filtrat contenant les ovocytes et les cellules de la granulosa est isolé dans une boîte de Pétri et observé sous microscope. L'ensemble des ovocytes sont transférés dans une nouvelle boîte de Pétri contenant de la solution OPU avant d'être mis en culture dans les différents milieux de culture.

4.1.2 Sélection des ovocytes et préparation des milieux de culture

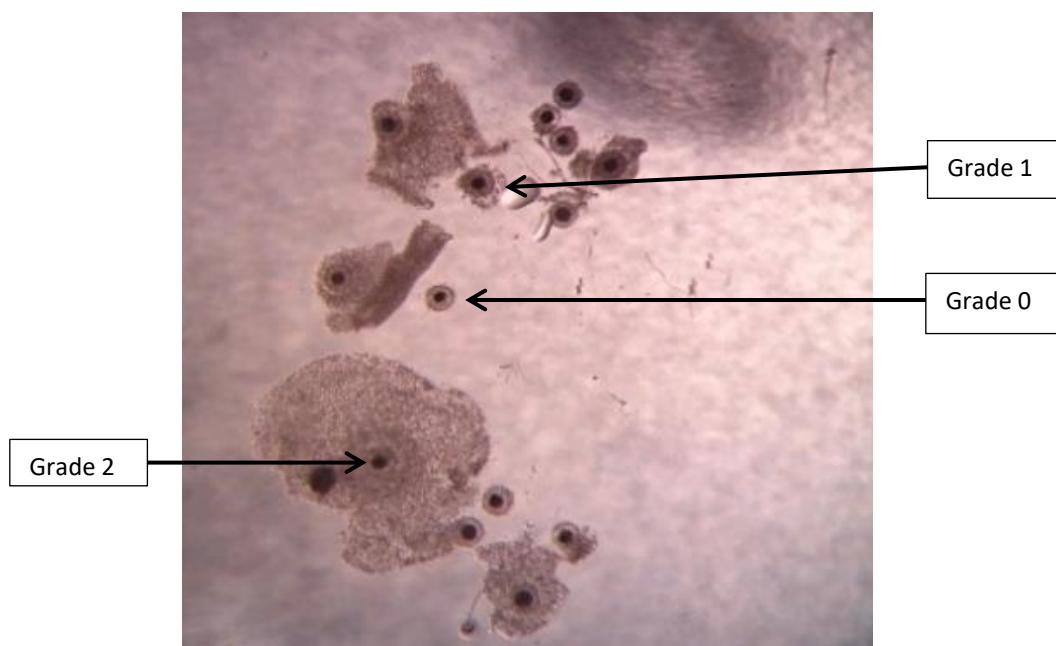
Après la collecte, les ovocytes sont répartis dans quatre milieux de culture différents. Ces milieux sont constitués du milieu M199 de Earle (Gibco, NY, USA) auquel est ajouté 25 µg/mL de gentamicine (Wisent Inc Multicell, Québec, QC, Canada), 10% de sérum de fœtus de bovin (FBS) (Wisent Inc Multicell, Québec, QC, Canada) et 5mU FSH/mL (Sioux Biochemicals, Sioux Center, IA, USA). La protéine WNT-2b a ensuite été diluée dans ce milieu de culture à trois concentrations : 100 ng/mL, 5 ng/mL et 0,25 ng/mL, ces milieux sont désignés respectivement WNT100, WNT5 et WNT0.25. Le groupe contrôle est constitué uniquement du milieu de culture sans ajout de WNT-2b. Ces concentrations de WNT-2b ont été choisies arbitrairement, la concentration la plus élevée 100 ng/mL a permis de vérifier qu'une forte concentration en WNT-2b dans le milieu de maturation n'était pas délétère à la maturation des ovocytes.

Ensuite les milieux de culture ont été répartis dans des boîtes de Pétri, 3 gouttes de 75µL par boîte, et ont ensuite été recouverts de 4mL d'huile minérale (Sigma-Aldrich, M5310-1L, Germany), puis par 3x75µL du milieu de culture. Chaque boîte contient donc au total trois gouttes de 150µL d'un milieu de culture donné et peut recevoir au maximum 15 ovocytes (un pour 10µL de solution). L'ensemble des préparations est effectué au minimum 4h avant l'ajout des ovocytes.

Les ovocytes présentant des anomalies morphologiques, telles que les ovocytes dénudés, ont été retirés de l'étude. Les ovocytes sélectionnés par groupe de quinze sont rincés deux fois dans deux gouttes du milieu de maturation et enfin transférés dans la troisième goutte présente dans la boîte de Pétri préparée pour la maturation ovocytaire. Les boîtes de Pétri sont ensuite mises dans l'incubateur à 37,5°C et à 5% de CO₂ pendant 30h.

4.1.3 Evaluation de l'expansion des cellules du cumulus après 30h de maturation

Après 30h de maturation, les ovocytes sont observés à la loupe binoculaire afin d'évaluer une étape clé de la maturation ovocytaire qui est l'expansion du cumulus. Une échelle inspirée de publications antérieures (Hinrichs, Williams, 1997 ; Caixeta et al., 2013) a été mise en place pour permettre la classification morphologique de l'expansion des cellules du cumulus en 4 stades de -1 à 2. Le grade -1 correspond aux ovocytes dégénérés, le grade 0 correspond à une expansion nulle et des cellules de la granulosa compactes, le grade 1 correspond à une expansion modérée des cellules de la granulosa avec l'observation de cellules individuelles tout en gardant une conformation circulaire, le grade 2 correspond à une expansion complète des cellules du cumulus avec des cellules bien visibles et désorganisées (Photographie 1).



Photographie 1: Observation d'un groupe d'ovocytes après 30h de maturation dans un milieu de culture contenant 5ng/mL de Wnt-2b et classification de l'expansion des cellules du cumulus.

4.2 ANALYSES STATISTIQUES

Les effets du traitement WNT-2b sur la distribution des ovocytes dans les différents groupes de maturation ovocytaire ont été évalués par le test Cochran-Mantel-Haenszel. Ce test prend en compte la variation d'un replicat à l'autre (facteur journée, observateur...). Chaque groupe a ensuite été comparé au groupe contrôle.

4.3 RESULTATS

La Figure 8 présente la répartition des ovocytes en fonction des grades d'expansion des cellules du cumulus pour les quatre traitements correspondant à différentes concentrations de WNT-2b. La protéine WNT-2b a eu un effet significatif ($p=0,019$) sur l'expansion des cellules du cumulus au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument. Ainsi, les ovocytes incubés en présence de WNT-2b ont présenté un grade de maturation ovocytaire plus avancé, avec 31% et 35% d'ovocytes présentant une expansion complète des cellules du cumulus pour les concentrations de WNT-2b de 0,25 et 5 ng/mL respectivement, comparativement au groupe contrôle (24%, $p=0,009$ et $p=0,016$). En revanche, la répartition des ovocytes dans les grades de maturation ovocytaire n'est pas différente entre le groupe WNT100 et le groupe contrôle.

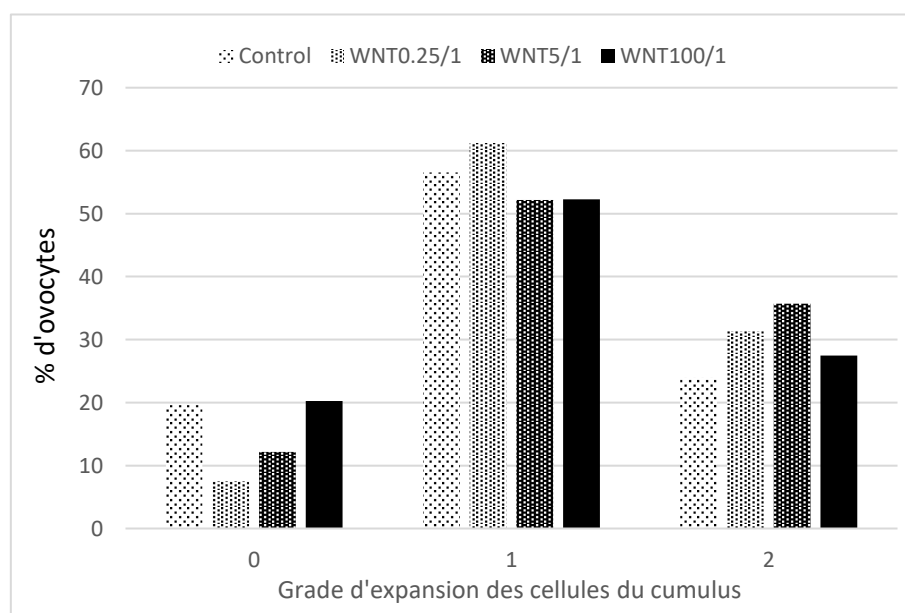


Figure 8 : Effet de l'ajout de la protéine WNT-2b sur la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument : répartition des ovocytes en fonction des grades d'expansion des cellules du cumulus pour différents groupes : Control, WNT0.25, WNT5 et WNT100, correspondant à des concentrations de WNT-2b de 0, 0.25, 5 et 100 ng/mL respectivement.

Le tableau 2 présente les grades d'expansion des cellules du cumulus obtenus sur les deux années 2017 et 2019. En effet, nous avons noté des différences de pourcentage d'ovocytes en fonction des années, principalement pour les grades 0 et 1.

Tableau 2 : Effet de l'année sur la répartition des ovocytes en fonction des grades d'expansion des cellules du cumulus pour les différents groupes : Control, WNT0.25, WNT5 et WNT100, correspondant à des concentrations de WNT-2b de 0, 0.25, 5 et 100 ng/mL respectivement.

Grade	0		1		2	
Control	11	35	70	33	19	33
WNT0.25	1	19	68	49	31	32
WNT5	7	22	60	37	33	41
WNT100	13	35	60	35	27	29

% d'ovocytes en 2017 sur un total de 372 ovocytes	% d'ovocytes en 2019 sur un total de 193 ovocytes
---	---

5. DISCUSSION

5.1 CONDITIONS DE L'EXPERIENCE

5.1.1 *Collecte et transport des ovocytes*

Les ovocytes immatures utilisés pour cette étude sont issus d'ovaires équins provenant d'un abattoir local. La conservation des ovaires pendant le transport de l'abattoir au laboratoire est un élément clé pour maintenir la compétence de maturation des ovocytes. Des travaux antérieurs menés sur la durée et les conditions de transport des ovaires ont montré qu'une durée de transport des ovaires inférieure à 7h et à une température inférieure à 37°C, ce qui était le cas pour notre expérience, n'affectait pas l'aptitude des ovocytes à la maturation *in vitro* (Love et al., 2003 ; Lewis et al., 2016).

5.1.2 *Milieu de maturation des ovocytes*

Le taux de maturation ovocytaire peut varier en fonction des milieux de culture et des conditions d'incubation. Dans notre étude, nous avons utilisé des milieux de maturation classique ainsi que des modalités d'incubation utilisées dans de nombreuses études sur la maturation ovocytaire de jument (Hinrichs et al., 2002 ; Deleuze et al., 2009 ; Li et al., 2004).

L'utilisation de ces milieux permet d'atteindre un taux de maturation jusqu'au stade de métaphase II de l'ordre de 40 à 80 % (Deleuze et al., 2009 ; Diaw et al., 2018). Lorsque les ovocytes sont issus de follicules de juments récupérés à l'abattoir les taux sont autour de 40-50% alors que lorsqu'ils proviennent de juments vivantes les taux sont plus élevés de 70-80% (Diaw et al., 2018).

5.1.3 *Marqueurs de la maturation ovocytaire in vitro chez la jument*

L'un des marqueurs facilement observables de la maturation ovocytaire est l'expansion du cumulus oophorus autour de l'ovocyte. Cette évaluation repose sur des critères morphologiques qualitatifs, pour lesquels, il pourrait y avoir une certaine variation interindividuelle d'appréciation. Afin d'homogénéiser les observations, nous avons utilisé une

échelle d'expansion des COCs avec des critères de classification inspirés de l'étude menée par l'équipe de recherche de K. Hinrichs et de E. Caixeta (Hinrichs, Williams, 1997 ; Caixeta et al., 2013). Cependant, nous n'avons pas établi au cours de notre étude la variation intra- ou interindividuelle de cette classification, qui pourrait en partie expliquer les variations des résultats entre l'année 2017 et 2019.

En effet, en raison des contraintes liées au cursus universitaire, ces expériences se sont déroulées sur deux années, 2017 et 2019 avec un opérateur différent. Les modes opératoires de récupération et de culture des ovocytes étaient identiques et la classification des ovocytes dans chaque grade a été effectuée par le même opérateur à l'aide de clichés photographiques.

Le but de cette maturation ovocytaire *in vitro* est d'obtenir des ovocytes aptes à la fécondation. Des études non publiées menées au sein du CRRF ont mis en évidence qu'une expansion optimale des cellules du cumulus oophorus ne suffisait pas à obtenir un taux élevé d'ovocytes fécondables. Comme nous avons pu le voir précédemment, un ovocyte fécondable est un ovocyte ayant subi des remaniements nucléaire, cytoplasmique, cytosquelettique ainsi qu'une reprise de la méiose avec un blocage en métaphase II. Or les protéines WNTs peuvent agir sur plusieurs mécanismes cellulaires complexes (cytosquelette, apoptose...). Ainsi, l'évaluation de l'expansion des cellules du cumulus, à elle seule, ne constitue pas un critère suffisant pour évaluer la maturation ovocytaire. D'autres marqueurs de la maturation comme la coloration chromosomique du noyau et l'observation de la reprise de la compétence méiotique après les 30h de maturation pourraient être utilisés pour évaluer l'action des WNTs.

5.2 EXPRESSION DES PROTEINES WNTS AU COURS DE LA MATURATION OVOCYTAIRE

Les récentes études ont permis de démontrer l'expression des protéines WNT-4, WNT-5a, WNT-7 et WNT-11 au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument (Diaw, communication personnelle), ce qui est cohérent avec l'implication de ces protéines dans les ovaires chez plusieurs espèces. En effet, la protéine WNT-4 est exprimée au sein des cellules du cumulus des ovocytes de souris et pourrait être impliquée dans le développement folliculaire (Hsieh et al., 2002 ; Lapointe, Boerboom, 2011). WNT-5a et WNT-11 sont également exprimées au sein des cellules de la granulosa chez la souris et permettent

l'activation de la voie de signalisation WNT/Ca²⁺ pour la protéine WNT-11 et l'inhibition de la voie canonique pour WNT-5a (Harwood et al., 2008 ; Abedini et al., 2016). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré la présence des protéines WNT-7a et WNT-7b au sein de l'ovaire des souris (Harwood et al., 2008). Cependant, nous n'avons pas démontré d'expression de la protéine WNT-2 au sein des cellules du cumulus chez la jument alors que son effet sur la folliculogenèse a été largement décrit chez différentes espèces (Ricken et al., 2002 ; Gomez et al., 2018 ; Wang et al., 2010). En revanche, le profil d'expression du gène codant pour la protéine WNT-2b au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument est relativement similaire à celui rapporté précédemment chez la vache par la même équipe (Diaw, 2014) ce qui suggère l'implication de cette protéine dans l'expansion des cellules du cumulus au cours de la maturation ovocytaire. C'est la raison pour laquelle, nous avons étudié l'effet de cette protéine WNT-2b sur la maturation ovocytaire.

Dans cette étude, nous avons démontré que WNT-2b améliore la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument à de faibles concentrations (0,25 et 5ng/mL). Il en résulte un gain d'ovocyte mûr de 7 et 11%. En revanche, à forte concentration (100ng/mL), nous n'avons pas observé d'effet de WNT-2b sur la maturation ovocytaire, en prenant en compte le critère d'expansion des cellules du cumulus. Il a été démontré récemment chez la vache (Hatzirodos et al., 2014) que lors de la croissance du follicule tertiaire, la voie de signalisation des WNTs est inhibée dans la thèque interne en raison de la faible expression de la protéine WNT-2b et de la forte expression en protéines antagonistes des WNTs. Dans notre expérience, nous obtenons une augmentation de l'expansion des cellules de la granulosa en présence d'une faible concentration en WNT-2b dans le milieu de culture. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le même mécanisme s'applique au cours de la croissance folliculaire chez la jument.

5.3 PERSPECTIVES : CARACTERISATION DU MODE D'ACTION DES PROTEINES WNTs LORS DE LA MATURATION OVOCYTAIRE IN VITRO CHEZ LA JUMENT

5.3.1 Evaluation des différentes voies de signalisation

Notre étude a permis de mettre en évidence l'expression des protéines WNTs au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument. Nous avons également montré que la protéine WNT-2b augmente le pourcentage des COCs expansés. Cependant, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur son mode d'action par comparaison avec les études menées chez la vache. Une des perspectives de cette étude serait d'identifier la voie de signalisation impliquée dans la régulation de la maturation ovocytaire chez la jument en évaluant la présence de β -catenin, une augmentation de calcium intra-cellulaire ou bien la présence de la protéine JNK au sein des cellules de la granulosa ou de l'ovocyte notamment par l'utilisation de Western Blot.

5.3.2 Utilisation des protéines antagonistes à la famille des protéines WNTs

De nombreux travaux ont utilisé des protéines antagonistes aux protéines WNTs pour comprendre le mécanisme d'action des WNTs. Actuellement, deux classes de protéines antagonistes des WNTs sont décrites, il s'agit des SFRP et Dickkopf (Dkk) dont le mode d'action diffère (Figure 9).

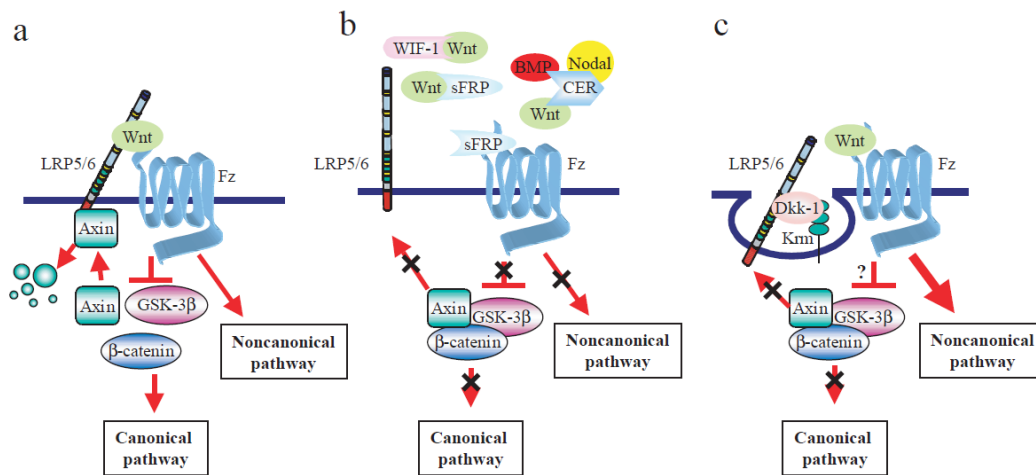


Figure 9 : Schéma représentant en a le mode d'action des protéines WNTs, en b l'interaction des protéines SFRPs avec les protéines WNTs ainsi qu'avec leurs récepteurs inhibant la transmission du signal de la voie canonique et non canonique, et en c la fixation de la protéine Dkk avec un des récepteurs des protéines WNTs inhibant la transmission du signal via la voie canonique tout en maintenant actives les voies de signalisation non canoniques

Source : *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway*, Kawano, 2003

Les premières protéines SFRP/FRZB ont été découvertes en 1996 (Hoang et al., 1996) ainsi que leur implication dans le développement du squelette chez la drosophile. Chez les mammifères, cinq membres de la famille des SFRPs : SFRP-1 ; SFRP-2 ; FRZB/SFRP-3 ; SFRP-4 et SFRP-5 ont été décrits. Ces protéines agissent en se liant aux protéines WNTs ainsi qu'à leurs récepteurs empêchant toute fixation des protéines WNTs aux protéines membranaires Fz/LRP inhibant ainsi la transmission du signal provenant de la voie canonique et des voies non canoniques (Kawano, Kypta, 2003).

L'implication de protéines de la famille des SFRPs dans la régulation de la reproduction chez la souris ainsi que chez la jument a fait l'objet de deux études. Chez la souris, l'expression de la protéine SFRP-4 est stimulée par les gonadotropines dans les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires (Hsieh et al., 2003). Chez la jument, l'expression des gènes codant les protéines SFRP-1, SFRP-2 et SFRP-5 a été mise en évidence dans les cellules de l'endomètre (Atli et al., 2011), cependant leur mode d'action n'a pas été évalué. Des expériences non publiées menées en parallèle de notre étude au sein du CRRF à l'Université de Montréal ont permis de mettre en évidence l'expression des protéines SFRP-1, SFRP-2 et SFRP-4 au sein des cellules du cumulus des ovocytes de jument après 30h de maturation, avec notamment des variations de niveau d'expression en fonction des concentrations en WNT-2b utilisées dans notre étude. Ces résultats permettent de renforcer l'hypothèse d'une éventuelle implication des protéines SFRPs au cours de la maturation ovocytaire permettant ainsi la régulation de

l'action des protéines WNT-2b au cours de la maturation ovocytaire. Par ailleurs, le mode d'action des protéines SFRPs, autre que leur action inhibitrice sur la voie de signalisation canonique (Mii, Taira, 2009), nécessite des investigations complémentaires.

La seconde famille des antagonistes aux protéines WNTs est la famille de protéines Dkks, comprenant quatre protéines chez les mammifères : Dkk-1, Dkk-2, Dkk-3 et Dkk-4. Dkk-1 et Dkk-4 bloquent la transmission du signal de la voie canonique en se fixant aux récepteurs LRP5/6 mais n'ont pas d'effet de blocage sur les voies de signalisation non canoniques (Zorn, 2001). Les Dkks figurent également dans la liste des protéines s'exprimant dans l'endomètre équin (Atli et al., 2011). L'addition de cette protéine au milieu de maturation des ovocytes équins pourrait permettre d'évaluer si la protéine WNT est impliquée dans le processus d'expansion des cellules du cumulus via la voie de signalisation canonique.

5.4 LIMITES DE LA COLLECTE D'OVOCYTES *IN VIVO*

Les premiers résultats de l'OPU et ICSI sont assez prometteurs mais soulèvent plusieurs questionnements, notamment sur la répétabilité de la collecte d'ovocytes et le suivi des poulains nés de ces techniques. Une étude a évalué les effets de l'aspiration répétée des follicules pour la collecte d'ovocytes (Velez et al., 2012). De rares cas d'abcès ovariens et des saignements rectaux pouvant altérer l'état général de la jument et la reprise sportive, ont été rapportés. Cependant, la qualité de la croissance des vagues folliculaires ainsi que de la maturation des ovocytes ne semble pas être altérées par des aspirations folliculaires répétées. Le Haras de Bèlignieux rapporte également quelques cas de saignements rectaux (18 cas sur 177 juments soit 2,8%), de saignements péri-ovarique (5 cas soit 0,8%) et des coliques (2 cas soit 0,3%). Ces techniques étant très récentes, il est important de mentionner le manque de recul quant au devenir des poulains en terme de fertilité, performance sportive et longévité.

CONCLUSION

Les avancées des techniques de reproduction assistées chez la jument sont très prometteuses. En effet, les méthodes de collecte d'ovocytes matures et immatures sont de plus en plus performantes et la cryopréservation d'ovocyte est en cours de développement. En revanche, les résultats des techniques de maturation ovocytaire *in vitro* sont très variables allant de 40 à 80% d'ovocytes matures et aptes à la fécondation. C'est pourquoi une meilleure compréhension de cette étape clé constitue un des enjeux majeurs de la réussite de ces techniques de reproduction assistée.

Les études menées sur la recherche d'un facteur de croissance potentiel de la maturation ovocytaire, les protéines WNTs, ont apporté des résultats prometteurs. Elles ont notamment permis de mettre en évidence l'expression de certains membres de la famille des protéines WNTs dans les cellules du cumulus au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument. L'expression de ces protéines a ensuite été étudiée au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* et un pic d'expression à 2h post incubation pour la protéine WNT2b a été observé. L'ajout de cette protéine à un milieu standard de culture a permis d'obtenir un taux plus élevé d'expansion des COCs pour des concentrations de 0,25 et 5 ng/mL, l'effet n'étant plus observé à de fortes concentrations. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que la protéine WNT-2b pourrait réguler le bon déroulement de la maturation de l'ovocyte comme cela a été montré chez d'autres espèces.

Des études sont nécessaires pour approfondir le mode d'action de cette protéine, notamment la voie de signalisation impliquée dans la maturation ovocytaire chez la jument. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra in fine d'améliorer les milieux de maturation, l'obtention de taux d'ovocytes matures et ainsi l'efficacité des techniques de reproduction assistée chez la jument.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné(e), Nicole HAGEN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Anaïs HAUTOT intitulée « **Les protéines WNTs et la maturation ovocytaire chez la jument : implication de WNT2b** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

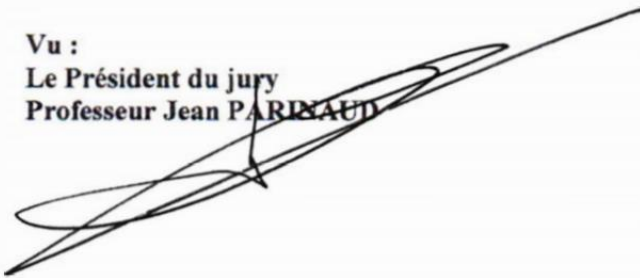
Fait à Toulouse, le 18 Juin 2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Nicole HAGEN



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu :
Le Président du jury
Professeur Jean PARINAUD



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO



Mme Anaïs HAUTOT
a été admis(c) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le : 18/06/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

ABEDINI, A, ZAMBERLAM, Gustavo, LAPOINTE, E, TOURIGNY, C, BOYER, A, PAQUET, M, HAYASHI, K, HONDA, H, KIKUCHI, A, PRICE, C et BOERBOOM, D, 2016. WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. In : *The FASEB Journal*. avril 2016. Vol. 30, n° 4, p. 1534-1547. DOI 10.1096/fj.15-280313.

ALLEN, W. R., 1982. Embryo transfer in the horse. In : *Mammalian egg transfer*. 1982. p. 135-154.

ATLI, M.O, GUZELOGLU, A et DINC, D.A, 2011. Expression of wingless type (WNT) genes and their antagonists at mRNA levels in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. In : *Animal Reproduction Science*. mai 2011. Vol. 125, n° 1-4, p. 94-102. DOI 10.1016/j.anireprosci.2011.04.001.

BARONE, R, 1986. *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Paris : Vigot Frères. ISBN 978-2-7114-9160-5.

BURATINI, J., SOARES, A. C. S. et BARROS, R. G., 2017. Follicular environment and oocyte maturation: roles of local peptides and steroids. In : *Animal Reproduction*. 2017. Vol. 14, n° 3, p. 601-606. DOI 10.21451/1984-3143-AR1003.

CADIGAN, K.M et NUSSE, R, 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. In : *Genes & Development*. 15 décembre 1997. Vol. 11, n° 24, p. 3286-3305. DOI 10.1101/gad.11.24.3286.

CAIXETA, Ester S., SUTTON-MCDOWALL, Melanie L., GILCHRIST, Robert B., THOMPSON, Jeremy G., PRICE, Christopher A., MACHADO, Mariana F., LIMA, Paula F. et BURATINI, José, 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. In : *Reproduction (Cambridge, England)*. juillet 2013. Vol. 146, n° 1, p. 27-35. DOI 10.1530/REP-13-0079.

CANESIN, Heloísa S., BROM-DE-LUNA, Joao Gatto, CHOI, Young-Ho, ORTIZ, Isabel, DIAW, Mouhamadou et HINRICHES, Katrin, 2017. Blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes vitrified at the germinal-vesicle stage. In : *Cryobiology*. avril 2017. Vol. 75, p. 52-59. DOI 10.1016/j.cryobiol.2017.02.004.

CANESIN, Heloísa Siqueira, BROM-DE-LUNA, Joao Gatto, CHOI, Young-Ho, PEREIRA, Amanda Macedo, MACEDO, Gustavo Guerino et HINRICHES, Katrin, 2018. Vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes: Effect of cryoprotectant exposure time on in-vitro embryo production. In : *Cryobiology*. 1 avril 2018. Vol. 81, p. 185-191. DOI 10.1016/j.cryobiol.2018.01.001.

CHOI, Young-Ho, VELEZ, Isabel C., MACÍAS-GARCÍA, Beatriz, RIERA, Fernando L., BALLARD, Catherine S. et HINRICHES, Katrin, 2016. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. In : *Theriogenology*. 15 avril 2016. Vol. 85, n° 7, p. 1289-1296. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.12.015.

COGNIÉ, Y, CROZET, N, GUÉRIN, Y, POULIN, N, BÉZARD, J, DUCHAMP, G, MAGISTRINI, M et PALMER, E, 1992. Fécondation in vitro chez les ovins, caprins et équins. In : *Annales de zootechnie*. 1992. Vol. 41, n° 3-4, p. 353-359.

DELEUZE, Stefan, PONTHER, Jérôme et HANZEN, Christian, 2009. Reproduction assistée dans l'espèce équine : collecte, évaluation, maturation et utilisations d'ovocytes équins. In : *Annales de Médecine Vétérinaire* [en ligne]. 2009. Vol. 153, n° 1. [Consulté le 5 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://orbi.uliege.be/handle/2268/34666>.

DIAW, Mouhamadou, 2014. *Expression et effets des WNTs sur l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte chez la vache*. Mémoire Universitaire. Saint-Hyacinthe : Université de Montréal.

DIAW, Mouhamadou, SALGADO, Renato M., CANESIN, Heloísa S., GRIDLEY, Nell et HINRICH, Katrin, 2018. Effect of different shipping temperatures (~22 °C vs. ~7 °C) and holding media on blastocyst development after overnight holding of immature equine cumulus-oocyte complexes. In : *Theriogenology*. 15 avril 2018. Vol. 111, p. 62-68. DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.12.044.

FOSS, R., ORTIS, H. et HINRICH, K., 2013. Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. In : *Equine Veterinary Journal. Supplement*. décembre 2013. n° 45, p. 39-43. DOI 10.1111/evj.12159.

GANDOLFI, F., POCAR, P., LUCIANO, A. M. et RIEGER, D., 1996. Effects of EGF and IGF-1 during in-vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. In : *Theriogenology*. 1996. Vol. 1, n° 45, p. 277.

GARCIA, J. I., NORIEGA-PORTELLA, L. et NORIEGA-HOCES, L., 2011. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. In : *Human Reproduction*. 1 avril 2011. Vol. 26, n° 4, p. 782-790. DOI 10.1093/humrep/der008.

GINTHER, 1992. *reproductive biology of the mare basic and applied aspects second edition*. S.l. : s.n.

GINTHER, O. J., BEG, M. A., BERGFELT, D. R., DONADEU, F. X. et KOT, K., 2001. Follicle selection in monovular species. In : *Biology of Reproduction*. septembre 2001. Vol. 65, n° 3, p. 638-647. DOI 10.1095/biolreprod65.3.638.

GINTHER, O. J., GASTAL, E. L., GASTAL, M. O. et BEG, M. A., 2008. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? In : *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 août 2008. Vol. 28, n° 8, p. 454-460. DOI 10.1016/j.jevs.2008.07.008.

GOMEZ, Belinda I., ALOQAILY, Bahaa H., GIFFORD, Craig A., HALLFORD, Dennis M. et HERNANDEZ GIFFORD, Jennifer A., 2018. WNTs role in bovine folliculogenesis and estrogen production. In : *Journal of Animal Science*. 2018.

GOUD, P. T., GOUD, A. P., QIAN, C., LAVERGE, H., VAN DER ELST, J., DE SUTTER, P. et DHONT, M., 1998. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. In : *Human Reproduction*. 1 juin 1998. Vol. 13, n° 6, p. 1638-1644. DOI 10.1093/humrep/13.6.1638.

GRØNDAHL, C., HØST, T., BRÜCK, I., VIUFF, D., BEZARD, J., FAIR, T., GREVE, T. et HYTTEL, P., 1995. In Vitro Production of Equine Embryos1. In : *Biology of Reproduction*. 1 janvier 1995. Vol. 52, n° monograph_series1, p. 299-307. DOI 10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.299.

GUILLAUME, D, SALAZAR-ORTIZ, J, MENASSOL, J.B, MALPAUX, B et CHEMINEAU, P, 2010. Photopériode, Métabolisme et Reproduction : Intérêt du Modèle Equin. In : . 21 janvier 2010. Vol. 163, n° 1, p. 5-18.

- HARWOOD, Benjamin N., CROSS, Sophia K., RADFORD, Emily E., HAAC, Bryce E. et DE VRIES, Wilhelmine N., 2008. Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos. In : *Developmental Dynamics*. avril 2008. Vol. 237, n° 4, p. 1099-1111. DOI 10.1002/dvdy.21491.
- HATZIRODOS, Nicholas, HUMMITZSCH, Katja, IRVING-RODGERS, Helen F. et RODGERS, Raymond J., 2014. Transcriptome Profiling of the Theca Interna in Transition from Small to Large Antral Ovarian Follicles. In : *PLOS ONE*. 15 mai 2014. Vol. 9, n° 5, p. e97489. DOI 10.1371/journal.pone.0097489.
- HINRICHS, K., LOVE, C.C., BRINSKO, S.P., CHOI, Y.H. et VARNER, D.D., 2002. In Vitro Fertilization of In Vitro-Matured Equine Oocytes: Effect of Maturation Medium, Duration of Maturation, and Sperm Calcium Ionophore Treatment, and Comparison with Rates of Fertilization In Vivo after Oviductal Transfer1. In : *Biology of Reproduction*. 1 juillet 2002. Vol. 67, n° 1, p. 256-262. DOI 10.1095/biolreprod67.1.256.
- HINRICHS, K. et WILLIAMS, K. A., 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. In : *Biology of Reproduction*. août 1997. Vol. 57, n° 2, p. 377-384. DOI 10.1095/biolreprod57.2.377.
- HINRICHS, Katrin, 2018. Assisted reproductive techniques in mares. In : *Reproduction in Domestic Animals*. septembre 2018. Vol. 53, p. 4-13. DOI 10.1111/rda.13259.
- HOANG, Bang, MOOS, Malcolm, VUKICEVIC, Slobodan et LUYTEN, Frank P., 1996. Primary Structure and Tissue Distribution of FRZB, a Novel Protein Related to *Drosophila* Frizzled, Suggest a Role in Skeletal Morphogenesis. In : *Journal of Biological Chemistry*. 18 octobre 1996. Vol. 271, n° 42, p. 26131-26137. DOI 10.1074/jbc.271.42.26131.
- HSIEH, Minnie, JOHNSON, Mac A., GREENBERG, Norman M. et RICHARDS, JoAnne S., 2002. Regulated Expression of Wnts and Frizzleds at Specific Stages of Follicular Development in the Rodent Ovary. In : *Endocrinology*. 1 mars 2002. Vol. 143, n° 3, p. 898-908. DOI 10.1210/endo.143.3.8684.
- HSIEH, Minnie, MULDER, Sabine M., FRIIS, Robert R., DHARMARAJAN, Arun et RICHARDS, JoAnne S., 2003. Expression and Localization of Secreted Frizzled-Related Protein-4 in the Rodent Ovary: Evidence for Selective Up-Regulation in Luteinized Granulosa Cells. In : *Endocrinology*. octobre 2003. Vol. 144, n° 10, p. 4597-4606. DOI 10.1210/en.2003-0048.
- KAWANO, Yoshiaki et KYPTA, Robert, 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. In : *Journal of Cell Science*. 1 juillet 2003. Vol. 116, n° 13, p. 2627-2634. DOI 10.1242/jcs.00623.
- KOHN, Aimee D. et MOON, Randall T., 2005. Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. In : *Cell Calcium*. septembre 2005. Vol. 38, n° 3-4, p. 439-446. DOI 10.1016/j.ceca.2005.06.022.
- KÜPKER, W. et DIEDRICH, K., 2000. Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro: Principles of Regulation. In : RABE, Thomas, DIEDRICH, Klaus et STROWITZKI, Thomas (éd.), *Manual on Assisted Reproduction* [en ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. p. 503-516. [Consulté le 3 octobre 2019]. ISBN 978-3-642-58341-4. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1007/978-3-642-58341-4_20.
- LAPOINTE, E. et BOERBOOM, D., 2011. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. In : *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. janvier 2011. Vol. 3, p. 276-285. DOI 10.2741/s151.
- LAPOINTE, Evelyne, 2012. *Régulation de la fonction ovarienne par la voie de signalisation des WNTs*. S.l. : Université de Montréal.

- LAUNOIS, Thomas et BRUYAS, Jean-François, 2020. Gestion de la carrière de reproducteur d'un cheval de sport. In : *Le nouveau praticien vétérinaire équine*. juin 2020. Vol. 52, n° 206, p. 6-15.
- LEWIS, N, HINRICHS, K, SCHNAUFFER, K, MORGANTI, M et ARGO, C McG, 2016. Effect of oocyte source and transport time on rates of equine oocyte maturation and cleavage after fertilization by ICSI, with a note on the validation of equine embryo morphological classification. In : . 2016. p. 16.
- LI, Xihe, DAI, Yanfeng et ALLEN, W. R., 2004. Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes in vitro and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. In : *Biology of Reproduction*. octobre 2004. Vol. 71, n° 4, p. 1391-1396. DOI 10.1095/biolreprod.104.029066.
- LINDBLOOM, S. M., FARMERIE, T. A., CLAY, C. M., SEIDEL, G. E. et CARNEVALE, E. M., 2008. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. In : *Animal Reproduction Science*. 15 janvier 2008. Vol. 103, n° 1, p. 187-192. DOI 10.1016/j.anireprosci.2007.04.006.
- LIU, Chia-Feng, LIU, Chang et YAO, Humphrey H.-C., 2010. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. In : *Current Topics in Developmental Biology*. 2010. Vol. 90, p. 263-290. DOI 10.1016/S0070-2153(10)90007-0.
- LOGAN, Catriona Y. et NUSSE, Roel, 2004. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2004. Vol. 20, n° 1, p. 781-810. DOI 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- LOVE, Linda B, CHOI, Young Ho, LOVE, Charles C, VARNER, Dickson D et HINRICHS, Katrin, 2003. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. In : *Theriogenology*. 1 février 2003. Vol. 59, n° 3, p. 765-774. DOI 10.1016/S0093-691X(02)01133-0.
- MERMILLOD, P et MARCHAL, R., 1999. La maturation de l'ovocyte de mammifères : Endocrinologie de la reproduction : l'ovaire dans tous ses états. In : *La maturation de l'ovocyte de mammifères : Endocrinologie de la reproduction : l'ovaire dans tous ses états*. 1999. Vol. 15, n° 2, p. 148-156.
- MEYER, Christian, 2009. *La Reproduction et l'insiméation artificielle du cheval, note bibliographique*. mai 2009. S.I. : CIRAD.
- MII, Y. et TAIRA, M., 2009. Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. In : *Development*. 15 décembre 2009. Vol. 136, n° 24, p. 4083-4088. DOI 10.1242/dev.032524.
- MILLER, Jeffrey R., 2002. The Wnts. In : *Genome Biology*. 2002. Vol. 3, n° 1, p. REVIEWS3001. DOI 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001.
- NAGY, P., GUILLAUME, D. et DAELS, P., 2000. Seasonality in mares. In : *Animal Reproduction Science*. 2 juillet 2000. Vol. 60-61, p. 245-262. DOI 10.1016/s0378-4320(00)00133-0.
- NORRIS, David O. et LOPEZ, Kristin H., 2011. The Endocrinology of the Mammalian Ovary. In : *Hormones and Reproduction of Vertebrates* [en ligne]. S.I. : Elsevier. p. 59-72. [Consulté le 17 novembre 2018]. ISBN 978-0-12-374928-4. Disponible à l'adresse : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749284100045>.

NUSSE, R. et VARMUS, H. E., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. In : *Cell*. novembre 1982. Vol. 31, n° 1, p. 99-109. DOI 10.1016/0092-8674(82)90409-3.

PELLETIER, Jean-Philippe, 2014. Superovulation chez la vache laitière : impact de la progestéronémie. In : [en ligne]. 3 mars 2014. [Consulté le 7 novembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/10772>.

RAZ ET AL, 2012. Ovarian Follicular Dynamics During the Estrus Cycle in the Mare. In : *Israel Journal of Veterinary Medicine*. mars 2012. Vol. 67, p. 2.

RICKEN, Albert, LOCHHEAD, Paul, KONTOGIANNEA, Maria et FAROOKHI, Riaz, 2002. Wnt Signaling in the Ovary: Identification and Compartmentalized Expression of wnt-2, wnt-2b, and Frizzled-4 mRNAs. In : *Endocrinology*. 1 juillet 2002. Vol. 143, n° 7, p. 2741-2749. DOI 10.1210/endo.143.7.8908.

RIERA, Fernando L., ROLDÁN, Jaime E., GOMEZ, José et HINRICHS, Katrin, 2016. Factors affecting the efficiency of foal production in a commercial oocyte transfer program. In : *Theriogenology*. 1 avril 2016. Vol. 85, n° 6, p. 1053-1062. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.11.016.

SANCHEZ, Ana M., VIGANÒ, Paola, QUATTRONE, Federica, PAGLIARDINI, Luca, PAPALEO, Enrico, CANDIANI, Massimo et PANINA-BORDIGNON, Paola, 2014. The WNT/ β -catenin signaling pathway and expression of survival promoting genes in luteinized granulosa cells: endometriosis as a paradigm for a dysregulated apoptosis pathway. In : *Fertility and Sterility*. 1 juin 2014. Vol. 101, n° 6, p. 1688-1696. DOI 10.1016/j.fertnstert.2014.02.040.

SEDES, Lauriane, 2014. *Voie de signalisation et gènes cibles de l'AMH dans le tractus génital femelle*. 3 avril 2014. S.l. : s.n.

SEN, Aritro et CAIAZZA, Francesco, 2013. Oocyte maturation: a story of arrest and release. In : *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 1 janvier 2013. Vol. 5, p. 451-477.

SONDEREGGER, S., POLLHEIMER, J. et KNÖFLER, M., 2010. Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation – Review. In : *Placenta*. octobre 2010. Vol. 31, n° 10, p. 839-847. DOI 10.1016/j.placenta.2010.07.011.

SPATE, Lee D., BROWN, Alana N., REDEL, Bethany K., WHITWORTH, Kristin M., MURPHY, Clifton N. et PRATHER, Randall S., 2014. Dickkopf-Related Protein 1 Inhibits the WNT Signaling Pathway and Improves Pig Oocyte Maturation. In : SUN, Qing-Yuan (éd.), *PLoS ONE*. 16 avril 2014. Vol. 9, n° 4, p. e95114. DOI 10.1371/journal.pone.0095114.

SQUIRES, E. L. et MCCUE, P. M., 2007. Superovulation in mares. In : *Animal Reproduction Science*. 1 mai 2007. Vol. 99, n° 1, p. 1-8. DOI 10.1016/j.anireprosci.2006.04.054.

SQUIRES, E. L., MCKINNON, A. O., CARNEVALE, E. M., MORRIS, R. et NETT, T. M., 1987. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. In : *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 1987. Vol. 35, p. 399-403.

STAAL, Frank J. T., LUIS, Tiago C. et TIEMESSEN, Machteld M., 2008. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. In : *Nature Reviews Immunology*. août 2008. Vol. 8, n° 8, p. 581-593. DOI 10.1038/nri2360.

VAGNER, Ingrid, 2017. Comment diagnostiquer, suivre et gérer des gestations gémellaires chez la jument. In : *Le nouveau praticien vétérinaire équine*. novembre 2017. Vol. 12/n°44, p. 24-28.

VAINIO, Seppo, HEIKKILÄ, Minna, KISPERT, Andreas, CHIN, Norman et MCMAHON, Andrew P., 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. In : *Nature*. février 1999. Vol. 397, n° 6718, p. 405-409. DOI 10.1038/17068.

VALENZUELA, Orlando A., COUTURIER-TARRADE, Anne, CHOI, Young-Ho, AUBRIÈRE, Marie-Christine, RITTHALER, Justin, CHAVATTE-PALMER, Pascale et HINRICHS, Katrin, 2018. Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with in vitro culture and embryo transfer) on placenta and foal morphometry and placental gene expression. In : *Reproduction, Fertility and Development*. 30 janvier 2018. Vol. 30, n° 2, p. 371-379. DOI 10.1071/RD16536.

VELEZ, I. C., ARNOLD, C., JACOBSON, C. C., NORRIS, J. D., CHOI, Y. H., EDWARDS, J. F., HAYDEN, S. S. et HINRICHS, K., 2012. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status: Effect of transvaginal aspiration on health. In : *Equine Veterinary Journal*. décembre 2012. Vol. 44, p. 78-83. DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00606.x.

WANG, Hong-Xing, LI, Tony Y. et KIDDER, Gerald M., 2010. WNT2 Regulates DNA Synthesis in Mouse Granulosa Cells Through Beta-Catenin1. In : *Biology of Reproduction*. 1 mai 2010. Vol. 82, n° 5, p. 865-875. DOI 10.1095/biolreprod.109.080903.

WANSLEEBEN, Carolien et MEIJLINK, Frits, 2011. The planar cell polarity pathway in vertebrate development. In : *Developmental Dynamics*. mars 2011. Vol. 240, n° 3, p. 616-626. DOI 10.1002/dvdy.22564.

WODARZ, Andreas et NUSSE, Roel, 1998. Mechanisms of Wnt Signaling in Development. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1998. Vol. 14, n° 1, p. 59-88. DOI 10.1146/annurev.cellbio.14.1.59.

ZORN, Aaron M, 2001. Wnt signalling: Antagonistic Dickkopfs. In : *Current Biology*. 7 août 2001. Vol. 11, n° 15, p. R592-R595. DOI 10.1016/S0960-9822(01)00360-8.

NOM : HAUTOT

PRENOM : Anaïs

LES PROTEINES WNTS ET LA MATURATION OVOCYTAIRE CHEZ LA JUMENT : IMPLICATION DE WNT-2B

RESUME :

La maîtrise de la maturation des ovocytes *in vitro* constitue une étape clé de l'avancée des biotechnologies de reproduction chez la jument. L'implication des protéines WNTs dans la folliculogenèse a été démontrée chez plusieurs espèces de mammifères et pourrait constituer une voie prometteuse d'amélioration des taux de maturation ovocytaire. L'expression de protéines de la famille des WNTs a été mise en évidence durant la maturation ovocytaire *in vitro* chez la jument (WNT-2b, WNT-4, WNT-5a, WNT-7a, WNT-9b, WNT-10b, WNT-11 et WNT-16). La protéine WNT-2b a présenté un pic d'expression au cours de la maturation ovocytaires. L'ajout de cette protéine à de faibles concentrations (0,25 et 5 ng/mL) a permis d'augmenter le taux d'ovocytes avec une expansion des cellules du cumulus. Son utilisation pourrait permettre d'accroître l'efficacité de la production d'embryons *in vitro*.

MOTS CLES : Maturation ovocytaire, WNT, Ovocyte, Jument, Reproduction assistée

WNTS PROTEINS AND MARE OOCYTE MATURATION: WNT-2B INVOLVEMENT

SUMMARY:

The *in vitro* oocyte maturation control is a key step in the improvement of mare reproduction biotechnologies. WNTs involvement in folliculogenesis was demonstrated in several species and establish an hopeful way of oocyte maturation rate improvement. WNT proteins expression was identified during oocyte maturation of the mare: WNT-2b, WNT-4, WNT-5a, WNT-7a, WNT-9b, WNT-10b, WNT-11 and WNT-16. A time course PCR showed a high expression of WNT-2b protein during the oocyte maturation. The addition of this protein to a conventional culture media increased the cumulus-oocyte complex (COC) expansion at a low concentration (0,25 and 5ng/ml). Its use could improve the efficiency of *in vitro* embryo production.

KEY WORDS: Oocyte maturation, WNT, COC, Oocyte, Mare, Reproduction