

Université de Montréal

EXPRESSION ET EFFETS DES WNTs SUR L'EXPANSION DU CUMULUS
ET LA MATURATION DE L'OVOCYTE CHEZ LA VACHE

par MOUHAMADOU DIAW

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de
l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires option Reproduction

Décembre 2014

©Mouhamadou Diaw, 2014

Résumé

Les WNTs sont une famille de glycoprotéines qui, secrétées dans le milieu extracellulaire, jouent un rôle important dans l'embryogenèse. Chez l'adulte, leur dérégulation va entraîner diverses affections incluant des troubles du développement accompagnés ou non de malformations mais aussi des cancers. Au niveau de l'ovaire, le rôle des WNTs demeure peu défini même si des études chez l'humain et la souris prouvent l'implication de certains membres de cette famille dans le développement ovarien ainsi que dans les processus de maturation folliculaire et d'ovulation. Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer l'expression de quelques membres de la famille des WNTs (-2, -2b, -4, -5a et -5b) durant l'expansion des cellules du cumulus et évaluer l'effet de certains d'entre eux sur le COC ainsi que la maturation de l'ovocyte chez la vache. Les COCs bovins étaient placés dans une solution de maturation *in vitro* pendant 0, 6, 12 et 22h et les niveaux d'ARNm mesurés par PCR en temps réel. L'abondance de l'ARNm pour WNT-2b était significativement plus élevée après 6h de maturation comparée aux COCs immatures (à 0h), alors que l'ARNm codant pour WNT-2, -4, -5a et -5b n'augmentait qu'en fin de culture. L'addition d'EGF provoquait l'expansion du COC et la progression de l'ovocyte vers la métaphase II (MII) comme nous l'espérions mais, à notre grande surprise, l'ajout de WNT-2b au milieu de maturation provoquait également l'expansion du COC (82% et 69% pour EGF et WNT-2b respectivement) et la progression de l'ovocyte vers le stade MII (62% et 56% EGF et WNT-2b respectivement). La combinaison d'EGF et WNT-2b n'a pas produit de meilleurs résultats. Notre étude met en lumière l'implication des WNTs

dans la maturation du COC chez la vache. Leurs voies d'activation restent toutefois à déterminer.

Mots clés : Maturation COC, WNTs, EGF, vache

Abstract

The Wnts comprise a large family of secreted glycoproteins which, when secreted in the extracellular space, play a key role in embryonic development. In adults, Wnts play a role in homeostasis and their deregulation likely causes several problems including developmental abnormalities with or without deformities, and cancer. The role of Wnts in the ovaries is not clearly defined although studies in humans and mice show the involvement of some Wnts in ovarian development, follicular maturation and in the process of ovulation. In this study, we tested the hypothesis that members of the Wnt family are involved in oocyte maturation in cattle. The specific objectives were to measure the expression of key Wnts (Wnt-2, -2b, -4, -5a and -5b) in cumulus cells during expansion, and to assess the effect of select Wnt proteins on expansion of the cumulus oocyte complex (COC) and oocyte maturation. Bovine COCs were placed into IVM medium for 0, 6, 12 and 22 h and mRNA levels measured by real-time PCR. The abundance of Wnt-2b mRNA in the cumulus cells was significantly higher at 6 h of maturation compared to immature (time 0) COCs, whereas mRNAs encoding Wnt-2, -4, -5a and -5b did not increase until the end of culture. The addition of EGF induced COC expansion and progression of the oocyte to meiosis II (MII) as expected but, unexpectedly, addition of Wnt-2b also induced expansion and (82% and 69%, EGF and Wnt2b, respectively) and progression to MII (62% and 56%, EGF and Wnt2b, respectively); a combination of WNT-2b and EGF did not improve the rates over either alone. Our study provides new evidence for a role for Wnts in the maturation of the COC in cattle. The Wnt signalling pathways are still unknown and more studies are needed.

Key words: COC maturation, Wnts, EGF, cow

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste de tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations et sigles	xi
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre 1 - Revue des travaux antérieurs	4
1.1 L’ovaire de vache.....	4
1.2 Le développement et la croissance des follicules ovariens.....	5
1.2.1 Les follicules primordiaux.....	7
1.2.2 Les follicules primaires	9
1.2.3 Les follicules secondaires.....	11
1.2.4 Les follicules tertiaires.....	12
1.3 Les vagues folliculaires	13
1.3.1 Le recrutement.....	16
1.3.2 La sélection.....	18
1.3.3 La dominance	19
1.3.4 Le follicule ovulatoire	20
1.3.5 L’atrésie folliculaire	20
1.4 Communications inter et intra compartiments folliculaires	21
1.5 L’ovulation	22
1.5.1 La cascade préovulatoire.....	22

1.5.1.1	Les ADAMTs	23
1.5.1.2	Les facteurs de croissance EGF-like	23
1.5.1.3	Les prostaglandines.....	24
1.5.1.4	L'expansion du cumulus	25
1.5.1.5	L'effet de la LH sur les cellules de la granulosa et de la thèque ..	26
1.5.2	La rupture du follicule	26
1.6	Les régulateurs intra-ovariens.....	27
1.6.1	Les facteurs de croissance épidermiques (EGF)	27
1.6.2	Les insulin-like growth factor I et II (IGF-1 et IGF-2).....	28
1.6.3	Les transforming growth factor β (TGF- β).....	29
1.6.4	Les WNTs.....	29
1.6.4.1	Structure générale des WNTs.....	30
1.6.4.2	Fonction générale des WNTs.....	31
1.6.4.3	Les voies de signalisation	32
1.6.4.3.1	La voie de signalisation WNT/ β -caténine (voie canonique) .	33
1.6.4.3.2	La voie de polarité planaire (PCP).....	35
1.6.4.3.3	La voie calcique (WNT/ Ca^{2+})	35
1.6.4.4	Les WNTs et la reproduction chez la femelle.....	36
Chapitre 2	- Objectifs et hypothèses.....	40
Chapitre 3	- Matériels et méthodes	41
3.1	Culture cellulaire	41
3.2	Étude 1 : Évaluation de l'expression des WNTs, de AREG, EREG et COX2 au cours du processus de maturation des COCs.....	42
3.3	Étude 2 : Rôle des WNTs dans le processus de maturation des COCs...	43
3.4	Transcription inverse et PCR en temps réel.....	44
3.5	Analyse Statistique.....	47
Chapitre 4	- Résultats.....	48

4.1	Les WNTs, AREG, EREG et COX2 sont exprimés au cours du processus de maturation des COCs	48
4.2	WNT-2b joue un rôle dans la maturation du COC.....	57
Chapitre 5	- Discussion.....	62
Conclusion	69
Références	70

Liste de tableaux

Tableau 1: Durée du développement folliculaire (en jours) chez différents mammifères (Monniaux et al., 2009).	7
Tableau 2: Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (Drion et al., 1996).	11
Tableau 3: Expression de WNT-4, WNT-5a et WNT-7a sur l'appareil reproducteur femelle (Heikkilä et al., 2001).....	38
Tableau 4: Conséquences de la déficience de WNT-4, WNT-5a et WNT-7a sur l'appareil reproducteur femelle (Heikkilä et al., 2001).	39
Tableau 5 : Amorces spécifiques utilisées chez les bovins	45
Tableau 6: Amorces spécifiques utilisées	46

Liste des figures

Figure 1: Schéma d'un embryon.....	5
Figure 2: Ovogenèse et folliculogenèse au cours de la vie des mammifères.. ..	8
Figure 3: Représentation schématique des différents stades de croissance des follicules	10
Figure 4: Relations ultrastructurelles entre l'ovocyte et les cellules de la corona radiata qui l'entourent.....	12
Figure 5: Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire.....	14
Figure 6: Recrutement, sélection et dominance montrant 3 vagues de croissance folliculaire durant le cycle œstral chez une vache	16
Figure 7: Développement folliculaire et sécrétion de gonadotrophines durant un cycle œstral à trois vagues chez la vache.....	18
Figure 8: Structure des ARN et protéines WNTs. . ..	31
Figure 9: Voie de signalisation WNT/β-caténine.....	34
Figure 10: Voie calcique et la voie de polarité planaire	36
Figure 11: Abondance des ARNm codant pour AREG, dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation.	49
Figure 12: Abondance des ARNm codant pour COX2 dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation.	50
Figure 13: Abondance des ARNm codant pour EREG dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation.	51

Figure 14: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-2 dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation.52

Figure 15: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-2b dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. ...53

Figure 16: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-4 dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation.54

Figure 17: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-5a dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. ...55

Figure 18: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-5b) dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. ..56

Figure 19: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur l'expansion des cellules du cumulus après 22h d'incubation.....58

Figure 20: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur la progression dans le processus de méiose des ovocytes après 22h d'incubation.59

Figure 21: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur la persistance au stade de vésicule germinale des ovocytes après 22h d'incubation.60

Figure 22: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur la dégénérescence des ovocytes après 22h d'incubation.61

Liste des abréviations et sigles

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
3β-HSD	3-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase
ADAM	Une désintégrine et métalloprotéase
ADAMT	Une désintégrine et métalloprotéase avec des motifs thrombospondines
AMH	Hormone de régression müllérienne
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AREG	Amphiréguline
ARN	Acide ribonucléique
BMP	Protéines morphogénétiques osseuses
BP	Paire de bases
BSA	Albumine de sérum bovin
BTC	Bêtacelluline
CAMKII	Protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CC	Cellules de cumulus
COC	Complexe cumulo ovocytaire
CCND1	Cyclin D1
cDNA	ADN complémentaire
cGMP	Guanosine 3'5'-Monophosphate cyclique
CK1α	Caseine Kinase 1 alpha

CO ₂	Dioxyde de carbone
COX	Cyclo-oxygénase
CTNNB	Cadherin-Associated Protein, Beta
CYP19a1	Cytochrome P450, famille 27, sous-famille A, polypeptide 1
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DNA	Acide désoxyribonucléique
DSH	Disheveled
E2	Estradiol
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Le récepteur du facteur de croissance épidermique
EREG	Épiréguline
FGF	Le facteur de croissance des fibroblastes
FGF20	Fibroblast growth factor 20
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FSHR	Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante
FZD	Récepteur de la famille frizzled
GC	Cellules de la granulosa
GCG	Glucagon
GDF9	Facteur-9 de croissance et de différenciation
GnRH	L'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GSK3	La glycogène synthase kinase 3
GV	Vésicule germinale
GVBD	Démantèlement de la vésicule germinale
h	Heure
HAS2	Hyaluronate Synthetase 2

IGF	Insulin-like growth factor ou somatomédine
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 ou somatomédine C
IGF-2	Insulin-like growth factor 2 ou somatomédine A
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IVM	<i>in vitro</i> maturation (maturation <i>in vitro</i>)
IVP	Production <i>in vitro</i>
JAG1	Jagged 1
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
LH	Hormone lutéinisante
LHCGR	Récepteur de l'hormone lutéinisante-choriogonadotropine
LRP	Low-density-lipoprotein receptor Related Protein
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
min	Minutes
mRNA	ARN messenger (ARNm)
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
OMI	Inhibiteur de la méiose ovocytaire
P4	Progestérone
P450c17	Cytochrome P450c17
P450scc	L'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCP	Planar cell polarity
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PGE2	Prostaglandine E2
PGF2a	Prostaglandine F2a

PKC	Protéine Kinase C
PTGS2	Prostaglandine synthase 2
PTX	Pentraxin related gene ou Pentraxine
PVA	Polyvinyl alcohol
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
qPCR	PCR en temps réel
RHOA	RAS Homologue gene-family member A
ROCK	Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase
RT-PCR	Transcription inverse - réaction en chaîne par polymérase
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
TC	Lymphocytes T
TCF	T Cell Factor
TGFa	Transforming growth factor alpha
TGFb	Transforming growth factor beta
TNFAIP6	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
TRCP	Transducing repeat-containing protein
WISP1	WNT1-inducible-signaling pathway protein 1
WNT	Wingless-Type MMTV integration site
ZP	Zone pellucide

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mon Directeur de Maîtrise, le Dr Christopher Price de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Un grand merci également pour son support, ses encouragements, sa supervision tout au long de mon travail de recherche mais aussi pour le respect sans faille des délais serrés auxquels nous avons dû faire face.

Mes remerciements vont également au Dr Rejean Lefebvre qui a bien voulu être co-directeur de ce mémoire. Merci pour le soutien, les encouragements ainsi que pour l'hospitalité dont vous avez fait preuve lors de mon arrivée à Saint-Hyacinthe.

Chaleureux remerciements au Dr Bruce Murphy pour avoir accepté de présider mon jury mais aussi pour son ouverture d'esprit et sa gentillesse.

Sincères remerciements au Dr Derek Boerboom pour avoir bien voulu faire partie de mon jury. J'ai beaucoup apprécié vos conseils et votre disponibilité.

Aux Drs Jean Sirois et Pascal Vachon: Merci pour avoir accepté d'être membres de mon comité de maîtrise.

Au Dr Christian Vigneault pour sa collaboration.

A Hilda Morayma Guerrero. Tu m'as permis de progresser dans cette phase délicate d'apprentissage et je te serai toujours reconnaissant pour ton soutien, ta générosité, ta bonne humeur. Je te dédie ce travail...

A Atefeh Abedini, Christie Aguiar, Gustavo Zamberlam, Peng Han et encore et toujours Hilda ;-). Merci pour vos conseils toujours très judicieux, votre aide et votre bonne humeur. Nous avons passés de bon moments ensemble et vous me manquez déjà!!!

A celles qui, parce que toujours prêtes à trouver des solutions efficaces à mes problèmes, m'ont rendu la vie tellement plus facile: Éliane Auger, Annie Bernier, Julie Blouin, Isabelle Daneau, France, Annie Lavertu, Annie Lavimodiere, Fanny Morin, Dre Caroline Proulx, Geneviève Provost, Diane Rodier et bien sûr Jacinthe Therrien (!!). Soyez toutes remerciées.

Aux Drs Diane Blais, Sheila Laverty, Michel Carrier, Daniel Jean, Jean Pierre Lavoie et Denis Vaillancourt, merci pour l'accueil que vous m'avez réservé et votre soutien permanent. Grace à vous, je me sens comme chez moi au Québec!!

Au groupe de Thério: C'est un grand plaisir de travailler ensemble

A ma mère, A mon père, A ma sœur, A Michelle LeBlanc et à tous ceux qui sont partis bien trop tôt... J'aurais tant aimé partager ce moment avec vous.

A Clémence, Annick et Tatie Yo: "Mission accomplie"!!!

A mes sœurs, A mon frère: merci d'avoir toujours été là.

A ma famille, mes amis aux quatre coins du monde, trop nombreux pour être nommés ici... je pense à vous et vous remercie pour tout ce que vous avez pu m'apporter. Je vous aime tous!!

Introduction

Dans les conditions naturelles, la vache ne produit généralement à partir de la puberté qu'un ovocyte mature par cycle sexuel, limitant ainsi fortement le nombre d'embryons pouvant être récoltés. Les chercheurs ont alors tenté de développer des protocoles afin de produire plus d'embryons dans le but de préserver et d'améliorer le patrimoine génétique animal mais aussi dans un but de recherche. C'est donc avec le plus grand enthousiasme que fut accueilli en 1987 le concept MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) introduit par l'Université de Guelph (Mapletoft, 2012) et dont le programme qui consistait à provoquer la superovulation de la vache, à l'inséminer puis à effectuer un transfert des embryons obtenus. Ce concept a permis de grandes améliorations au niveau de la sélection, de la réduction des intervalles entre générations ainsi qu'une amélioration considérable du potentiel génétique des animaux permettant à ce jour une récolte annuelle mondiale de près de 500.000 embryons bovins (Mapletoft, 2012) et ce, malgré les coûts élevés de la technologie et le nombre variable et imprévisible des embryons obtenus. Une alternative au concept MOET serait de récolter les ovocytes directement au niveau de l'ovaire et procéder à leur maturation puis à leur fertilisation afin de produire des embryons in vitro (IVP) (Hasler et al., 1995). Au cours des années, la technique visant à produire des embryons in vitro a connu beaucoup d'améliorations sans pour autant arriver à réduire l'écart entre la production des embryons in vivo et celle obtenue avec les embryons in vitro. Pour l'année 2013 et d'après les chiffres de l'Agence Canadienne de Transfert d'Embryons

(ACTE/CETA) (<http://www.ceta.ca/pdfs/2014/2013-ET-Activity-in-Canada.pdf>), 145,650 embryons ont été récoltés in vivo chez la vache (12 embryons/ récolte en moyenne) dont 84,940 étaient transférables (58%). Pour l'IVP et au cours de la même année, 9 oocytes ont été obtenus en moyenne par récolte et dont la majeure partie provenait de vaches vivantes (20,650 ovocytes récoltés sur des vaches vivantes vs. 300 ovocytes récoltés sur des ovaires provenant de l'abattoir). Ces 20,950 ovocytes cultivés in vitro, ont, après fertilisation, produit un total de 8,313 embryons transférables (représentant 39% des ovocytes totaux récoltés). Parmi les 300 oocytes récoltés sur des ovaires provenant de l'abattoir, seuls 15 embryons transférables ont été obtenus soit 5% du nombre total d'ovocytes récoltés sur des ovaires provenant de l'abattoir. Des études ont montré le rôle primordial du processus de maturation dans l'IVP. Sirard (Sirard & Coenen, 2006) a ainsi montré que des éléments de la plus grande importance tels que la synthèse et le stockage de certaines formes d'ARNm et de protéines se déroulait durant cette période ainsi qu'au cours des premiers stades du développement embryonnaire. Différents auteurs ont démontré l'importance des milieux de culture dans l'expression des différences observées sur le plan morphologique et moléculaire au cours de cette période (Eppig, O'Brien, & Wigglesworth, 1996; Hirao, 2011; Hyttel, Fair, Callesen, & Greve, 1997). Ainsi, la mise au point d'un milieu de culture de qualité devrait idéalement tenir compte de trois aspects: (1) la physiologie du COC, (2) l'identification, la caractérisation et la régulation des signaux entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et (3) l'identification et la caractérisation des gènes dont l'expression détermine et régule le développement de ces deux types cellulaires (Eppig et al., 1996). Nous avons donc pensé à essayer de développer un nouveau type de milieu de maturation

diffèrent des milieux traditionnellement utilisés et faisant appel aux WNTs comme croissance. Dans la présente étude, nous nous proposons d'étudier l'expression et le rôle de quelques WNTs dans le processus de maturation in vitro des COCs.

Chapitre 1 - Revue des travaux antérieurs

1.1 L'ovaire de la vache

L'ovaire est la gonade femelle. C'est un organe pair en forme d'amande aplatie mesurant entre 2 et 5 cm de long, 1,5 et 4 cm de haut et 1,5 à 3 cm de large. Les ovaires sont situés en position latérale dans la cavité pelvienne et ont un poids variable selon l'âge de l'animal (1 à 2 g à la naissance, 4 à 6 g à la puberté et une quinzaine de grammes chez l'adulte) et la localisation (l'ovaire droit est de 2 à 3 g plus lourd que l'ovaire gauche) (Hanzen, 1995). L'ovaire est revêtu d'un épithélium de cellules cubiques sous lequel on peut distinguer deux zones: la région corticale et la région médullaire. La région corticale, plus en surface contient les follicules ovariens à différents stades de croissance, un corps jaune mature lors de la phase lutéale, des vestiges de corps jaunes dégénérés (corpus albicans) et des cellules conjonctives. La région médullaire, plus vers le centre, comprend du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs (Nivet, 2014).

L'origine embryonnaire de l'ovaire est mixte. Des cellules extra-embryonnaires (cellules souches germinales) migrent au travers de l'embryon pour coloniser une zone dense de tissu mésenchymateux supra-néphrotique recouverte d'épithélium cœlomique: les corps de Wolff (Drion et al., 1996). Les ovaires résultent de la différenciation spontanée des corps de Wolff qui s'opère à partir de la septième semaine du développement embryonnaire. Les corps de Wolff vont proliférer et se condenser pour former une crête longitudinale et bilatérale appelée crête génitale (ou bourrelet génital) situé en région lombaire (Witschi, 1948) (Figure 1).

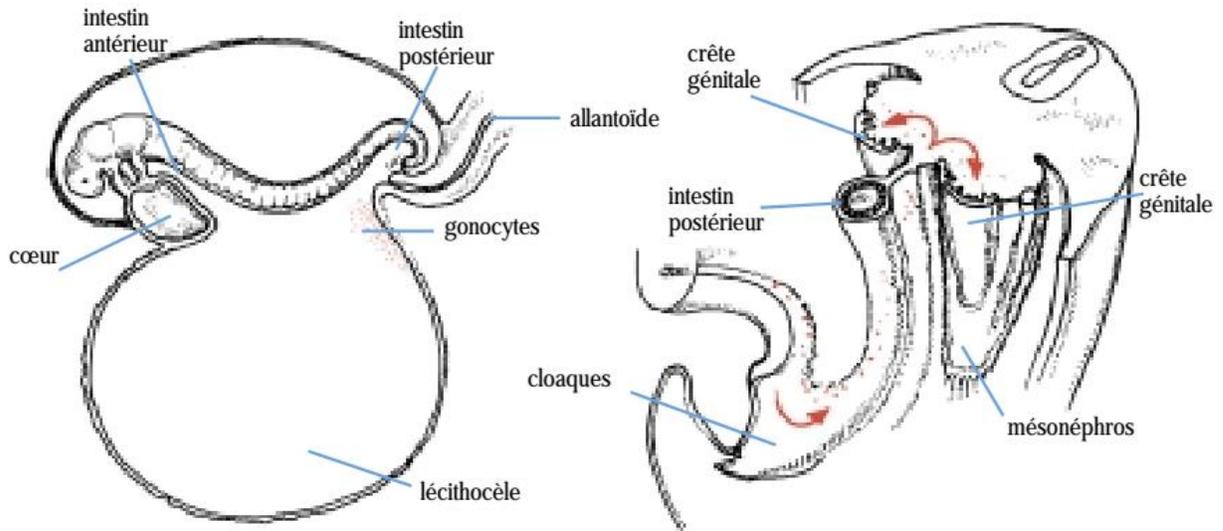


Figure 1: Schéma d'un embryon. a. Coupe longitudinale. En rouge : localisation extra embryonnaire des cellules germinales primordiales au niveau de la vésicule vitelline. b. Coupe transversale. Migration des cellules germinales vers la crête génitale, le long du mésentère dorsal de l'intestin postérieur (Drion et al., 1996).

1.2 Le développement et la croissance des follicules ovariens

C'est en 1672 que l'anatomiste hollandais Reinier de Graaf décrit les caractéristiques générales du follicule ovarien à partir d'observations effectuées sur le système reproducteur de la lapine. Depuis, de très nombreuses études ont permis de mieux connaître et comprendre les mécanismes de développement et de croissance des follicules ovariens. Ces mécanismes sont contrôlés par différents régulateurs et impliquent la participation conjointe des cellules de la thèque, des cellules de la granulosa et de l'ovocyte dans le processus. Sur le plan endocrinien, le développement et la croissance des follicules ovariens est contrôlé non seulement par les gonadotrophines (FSH et LH) mais aussi par des

nombreuses hormones produites localement et par des facteurs de croissance (Zamberlam, 2013).

Le follicule et l'ovocyte entretiennent de liens étroits. Le follicule apporte à l'ovocyte un microenvironnement nécessaire à sa croissance ainsi qu'à l'acquisition de sa compétence à la fécondation et au développement embryonnaire (Gordon, 2003). À l'inverse, l'ovocyte joue un rôle important dans le développement folliculaire (Knight & Glister, 2006; Matzuk, Burns, Viveiros, & Eppig, 2002) montrant ainsi les liens indissociables entre ovogenèse et folliculogenèse (Monniaux et al., 2009). Le développement folliculaire ou folliculogenèse est un processus continu qui débute au stade fœtal par le démarrage de la croissance du follicule primordial et se termine après la puberté par l'ovulation pour une très faible proportion de follicule stockées car plus de 99% des follicules en croissance vont dégénérer (atrésie) (Monniaux et al., 1996). Durant le processus de folliculogenèse, plusieurs groupes de follicules passent par divers stades de croissance afin de compléter leur développement (Tableau 1). La description des modifications observées à chaque stade de croissance a abouti à la classification des follicules en primordial, primaire, secondaire et tertiaire. Certains auteurs subdivisent les follicules antraux en petits et larges follicules antraux sans pour autant que des différences sur le plan de leur morphologie ou de leur réceptivité ne soient observées (Scaramuzzi et al., 2011).

Espèce	Durée totale du développement folliculaire	Durée de développement des follicules à antrum
Souris, Rate, Hamster	19 à 22	3 à 4
Lapine	97	10
Brebis	180	44
Vache	ND	22 à 42
Jument	120	35
Femme	> 200	50

ND : non déterminé.

Tableau 1: Durée du développement folliculaire (en jours) chez différents mammifères (Monniaux et al., 2009).

1.2.1 Les follicules primordiaux

Les follicules primordiaux sont la réserve d'ovocytes de la femelle. Leur formation intervient durant la période fœtale chez de très nombreux mammifères alors que chez les rongeurs le processus ne débute qu'après la naissance (Figure 2). Chaque follicule primordial comprend une membrane basale externe et contient un ovocyte primaire dont le développement est interrompu au stade diplotène de la prophase I (Sirard et al., 1989). À ce stade, l'ovocyte est lui-même entouré d'une couche de 4-8 cellules somatiques aplaties à l'origine des cellules de la granulosa. L'association entre l'ovocyte et avec ces cellules est essentielle à l'arrêt de la méiose. Cet arrêt est le résultat de l'action de l'OMI (ovocyte meiosis inhibitor) provenant des cellules de la granulosa et transmis à l'ovocyte par le biais de jonctions communicantes (*gap junctions*) (Sirard, 1989). L'absence d'association entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa va entraîner la reprise du processus de méiose et la dégénérescence de l'ovocyte (Rüsse, 1983). Dans ce type de follicules, l'ovocyte et les cellules de la granulosa possèdent des récepteurs de facteurs de croissance mais pas pour la FSH et la LH, les

gonadotrophines n'étant pas nécessaires pour la survie et la croissance du follicule primordial (Fortune, Yang, & Muruvi, 2010). Les follicules primordiaux représentent donc un stade de quiescence dans la folliculogénèse. Chez la vache, ils se forment autour de 90 jours de la vie fœtale.

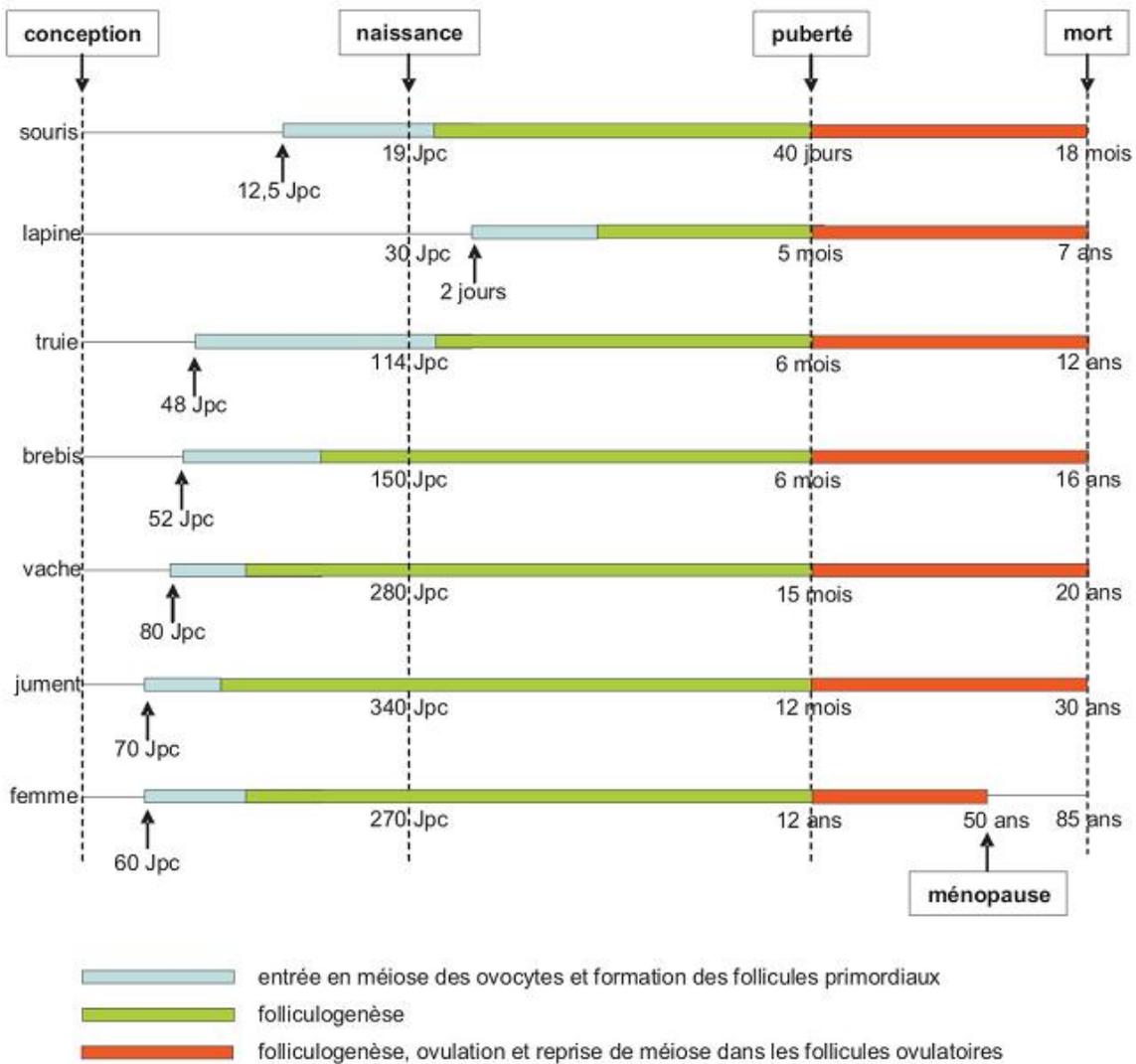


Figure 2: Ovogenèse et folliculogénèse au cours de la vie des mammifères. La formation des follicules primordiaux intervient durant la période fœtale chez de très nombreux mammifères alors que chez les rongeurs le processus ne débute qu'après la naissance. Jpc : jours post-conception (Monniaux et al., 2009).

1.2.2 Les follicules primaires

Le stade primaire débute avec la croissance du follicule primordial (Figure 3) (Tableau 2). Le délai entre apparition du follicule primordial et celle du premier follicule primaire étant de 50 jours, cette activation intervient donc autour de 140 jours de gestation chez les bovins (Fortune, Cushman, Wahl, & Kito, 2000). Le développement de ces follicules se fait indépendamment de l'action de la FSH et de la LH mais sous le contrôle de facteurs sécrétés par l'ovocyte (Fortune et al., 2010). L'ovocyte augmente de volume et les cellules aplaties de la granulosa prennent un aspect cuboïde et se multiplient (Braw-Tal & Yossefi, 1997; Fortune et al., 2010). Ce stade voit l'apparition de la zone pellucide (ZP) et l'activation de très nombreux gènes (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010). L'âge, l'espèce et l'importance de la réserve influencent le nombre de follicules quittant chaque jour la réserve. Chez les bovins, ce nombre est estimé à 50-80 peu après la naissance. Il augmente par la suite à 120 par jour puis décline pour se stabiliser autour de 80 au moment de la puberté (Erickson, 1966a, 1966b).

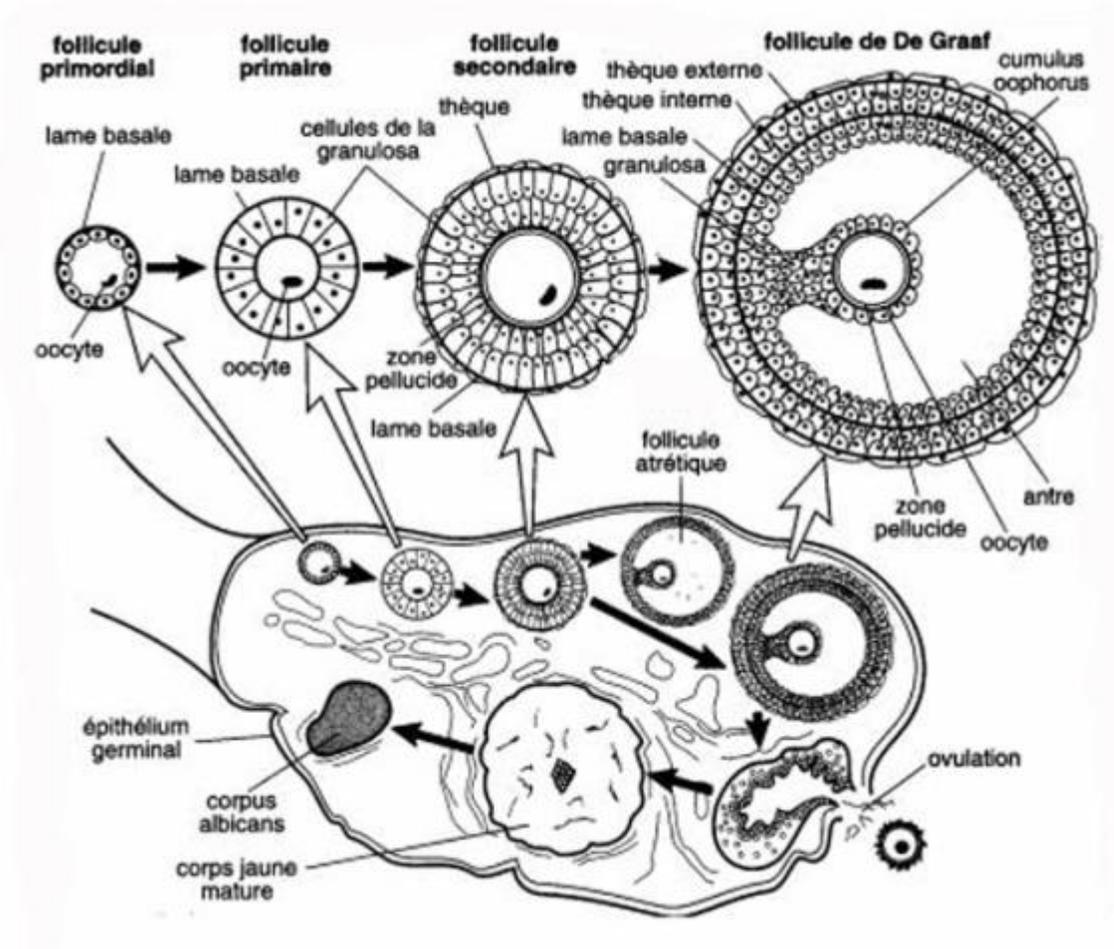


Figure 3: Représentation schématique des différents stades de croissance des follicules (adaptée de Guénard) (Gilbert, 2011).

stade folliculaire	nombre de cellules folliculaires	structures en formation	diamètre folliculaire (µm)	diamètre ovocytaire (µm)
• primordial	• 30 cellules aplaties	• membrane basale	30-50	20-35
• primaire	• une couche de cellules (27-58) cuboïdales	• membrane de Slavjanski	40-60	30-40
• secondaire	• couches multiples de cellules	• zone pellucide, • thèques	200-300	60
• tertiaire	• couches multiples de cellules	• <i>Cumulus oophorus</i>		100-130
• stade préovulatoire ou de "de Graaf"	• couches multiples de cellules • différenciation des cellules folliculaires en cellules de granulosa et <i>cumulus</i>	• acquisition de la compétence ovocytaire, • reprise de la méiose	2.10 ⁴	150

Tableau 2: Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (Drion et al., 1996).

1.2.3 Les follicules secondaires

La formation des follicules secondaires débute avec l'apparition d'une deuxième couche de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte. Le diamètre de l'ovocyte s'accroît et une petite cavité remplie de liquide apparaît en son sein. Les follicules secondaires sont décrits comme étant de larges follicules préantraux entourés de deux à six couches de cellules de la granulosa et dont leur thèque interne (formée à partir des cellules stromales) et leur ZP (ayant pour origine des glycoprotéines synthétisées et secrétées par l'ovocyte) sont très clairement délimités. L'épaississement de la zone pellucide (corona radiata) ainsi constituée n'empêche en rien le contact étroit déjà établi entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui lui sont accolées (Fair, Hyttel, & Greve, 1995; Rüsse, 1983). Ce contact permettra d'ailleurs des échanges d'ions et de petites molécules (poids

moléculaire <1kD) entre ces deux structures (Monniaux et al., 2009) (Figure 4). Les follicules secondaires sont réceptifs aux gonadotrophines : les cellules de la granulosa vont répondre à la FSH et celles de la thèque interne à la LH. Le follicule secondaire va acquérir des enzymes nécessaires à la production d'androgènes par les cellules de la thèque avant sa transformation en follicule antral (McNatty, Reader, Smith, Heath, & Juengel, 2006).

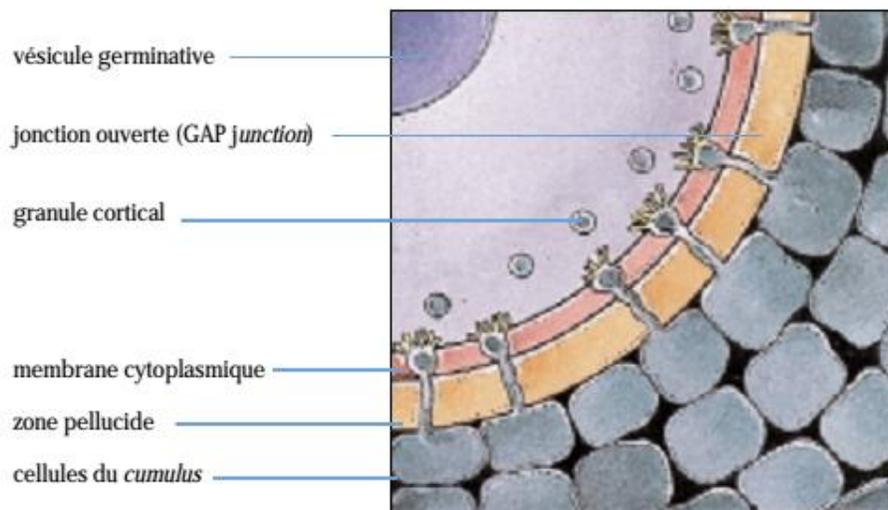


Figure 4: Relations ultrastructurelles entre l'ovocyte et les cellules de la corona radiata qui l'entourent. La zone pellucide malgré son épaisseur, n'empêche en rien le contact étroit entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui lui sont accolées ainsi que les échanges d'ions et de petites molécules. (Drion et al., 1996).

1.2.4 Les follicules tertiaires

Le follicule prend l'appellation de follicule tertiaire ou antral avec le développement de l'antra (ou antrum) sous l'influence de la FSH. Des produits des sécrétions des cellules de la granulosa et de la thèque ainsi que les substances

plasmatiques (acides aminés, lipides et autres petites molécules dérivant du plasma) diffusant à partir des capillaires de la thèque vont s'accumuler dans l'antrum. La formation de l'antrum va entraîner la ségrégation des cellules de la granulosa en deux types de cellules différents sur le plan anatomique et fonctionnel : les cellules murales de la granulosa tapissant la paroi du follicule et jouant un rôle dans la stéroïdogénèse et les cellules du cumulus entourant intimement l'ovocyte. À ce stade du développement du follicule, la taille de l'ovocyte n'augmente plus guère. La prolifération des cellules de la granulosa diminue et la croissance du follicule s'effectue essentiellement par l'augmentation du liquide de l'antra (Monniaux et al., 2009). La très grande partie des follicules tertiaires n'atteint toutefois jamais le stade préovulatoire; ils deviennent atrétiques et dégénèrent. Leur développement se faisant, les follicules deviennent de plus en plus dépendants des gonadotrophines : d'abord *gonadotropin- responsive*, ils deviennent ensuite *gonadotropin- dependant* (Scaramuzzi et al., 2011).

1.3 Les vagues folliculaires

La folliculogénèse est divisée en deux phases successives : la folliculogénèse basale et la folliculogénèse terminale (Figure 5).

La folliculogénèse basale se déroule en l'absence de FSH mais sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance provenant de l'ovocyte et des cellules somatiques. C'est au cours de cette phase que l'ovocyte acquiert sa compétence méiotique.

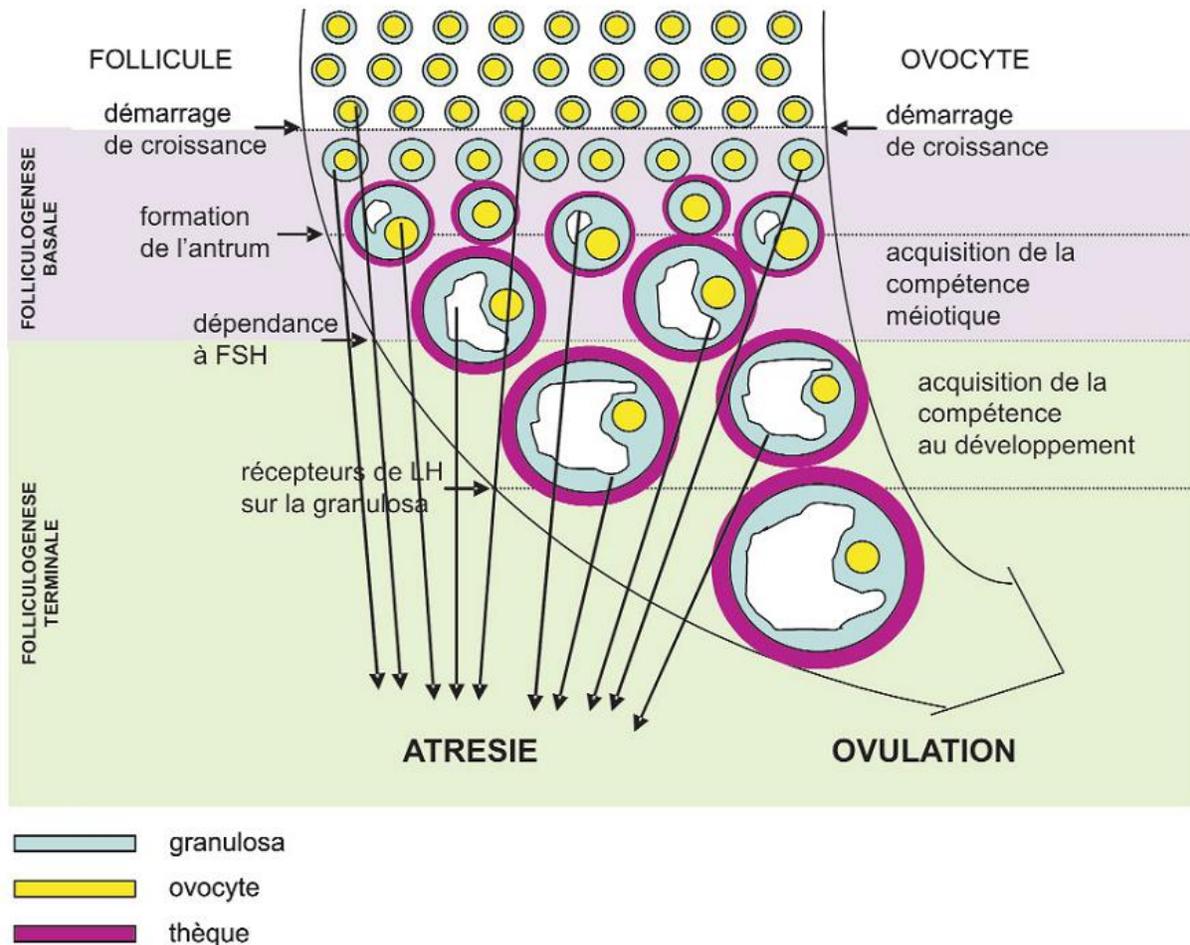


Figure 5: Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire. La folliculogenèse basale se déroule en l'absence de FSH, La folliculogenèse terminale se déroule sous forme de vagues dites vagues folliculaires. Note : la dépendance à la FSH chez les rongeurs est acquise au moment de la formation de l'antrum (Monniaux et al., 2009).

La folliculogenèse terminale se déroule sous forme de vagues dites vagues folliculaires. D'abord proposé chez les primates (DiZerega & Hodgen, 1981), le concept de vagues folliculaires sera ensuite adopté chez la brebis et la vache (Driancourt & Cahill, 1984). D'énormes progrès dans la connaissance de la folliculogenèse ont été accomplis grâce à l'utilisation de l'échographie. Cette technique a permis de démontrer l'existence de deux ou trois vagues folliculaires

au cours du cycle œstral chez la vache. Chez cette espèce, chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7-9 jours de plusieurs follicules de diamètre supérieur ou égal à 5 mm. Parmi ces follicules, se formera au bout de quelques jours un follicule dit dominant (Sirois & Fortune, 1988). Ainsi donc, la première vague décrite débute le jour suivant l'ovulation. La deuxième intervient environ neuf jours plus tard et la troisième, quand elle se produit, est décrite autour de 15 jours après l'ovulation (Adams, Jaiswal, Singh, & Malhi, 2008). Une vague folliculaire est décrite, de nos jours, comme étant la croissance synchronisée d'un groupe de follicules antraux à intervalles réguliers lors du cycle ovarien. Les follicules composant la vague se ressemblent sans être identiques car de tailles inégales (Adams, Singh, & Baerwald, 2012). Les vagues folliculaires sont observées au cours du cycle sexuel uniquement durant la période préovulatoire chez certaines espèces (femme, truie, ratte) alors que chez d'autres (vache, jument), elles sont également observées en diœstrus (Driancourt, 2001; Fortune, 1994). Durant la vague folliculaire, un tri va s'effectuer afin de sélectionner le (ou les) follicule(s) ovulatoire(s). La sélection s'effectuera en trois étapes successives : le recrutement, la sélection et la dominance (Figure 6). Le recrutement débute avec le développement de manière synchrone d'une cohorte de follicules. Selon l'espèce, un ou plusieurs follicules vont être sélectionnés, évoluer vers la dominance pour enfin terminer leur évolution vers l'ovulation ou la régression lorsque les conditions endocriniennes ne sont pas réunies. Les follicules de la cohorte n'ayant pas été sélectionnés vont quant à eux devenir atrétiques et régresser (Adams et al., 2008).

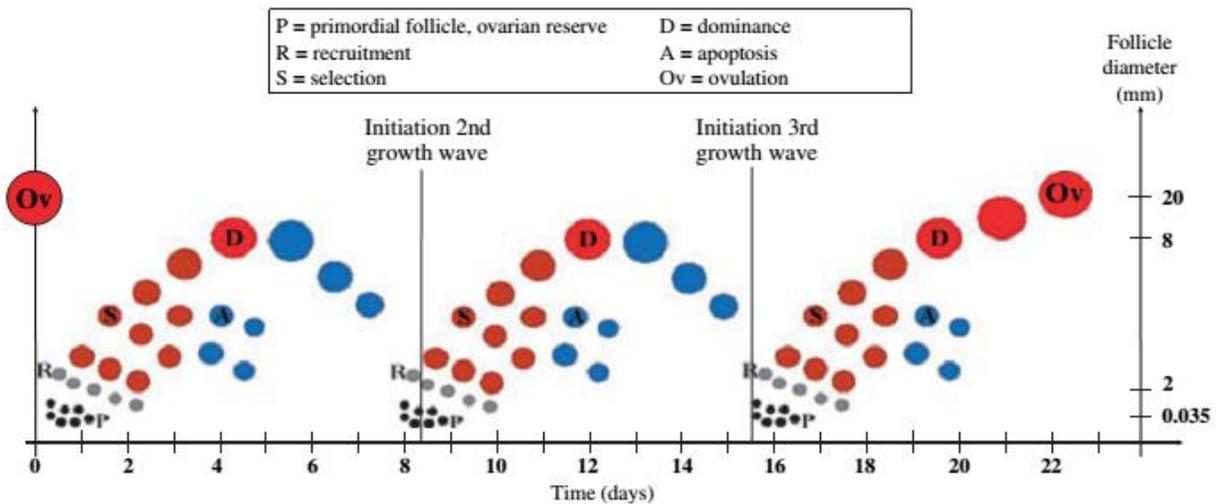


Figure 6: Recrutement, sélection et dominance montrant 3 vagues de croissance folliculaire durant le cycle œstral chez une vache (Aerts & Bols, 2010b).

1.3.1 Le recrutement

Le recrutement représente l'entrée en phase terminale d'un groupe de follicules ayant une dépendance aux gonadotrophines (Bao & Garverick, 1998). Il s'applique à tout follicule ayant été épargné par le processus d'atrésie (Fortune, 1994). Quelle que soit l'espèce, le nombre de follicules concernés est toujours supérieur au nombre de follicules ovulatoires, assurant ainsi la possibilité qu'au moins un follicule se trouve dans les conditions optimales lui permettant de compléter la folliculogénèse (Fortune, 1994). Pour cette raison, la destruction du follicule dominant en début de vague va entraîner un ralentissement du processus de régression affectant les follicules de taille directement inférieure alors que la destruction du follicule dominant en fin de vague va entraîner un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante (Ko, Kastelic, Del Campo, & Ginther, 1991). Le recrutement s'effectue sous l'effet de la FSH en synergie avec

divers facteurs d'origine locale ou endocrine tels les FGFs, EGF et IGF1 (McGee & Hsueh, 2000; Mihm et al., 2000). Le rôle de la FSH est très important dans le processus de recrutement : chacun de ses pics au cours du cycle va permettre le recrutement de follicules antraux sensibles à la FSH, amorçant ainsi une nouvelle vague folliculaire (Figure 7). Cela explique le phénomène décrit par Fortune (Fortune, 1994) où la disparition d'un follicule dominant va entraîner une hausse de FSH afin de permettre au follicule second en taille de devenir à son tour dominant. Le processus de recrutement débute avec l'augmentation transitoire de la FSH suite à l'ovulation ou à la suite de l'atrésie du follicule dominant de la vague précédente (Figure 7) (Adams et al., 2012). Chez la vache, durant la phase de croissance, la cohorte de follicules va passer de 5 mm à 8-9 mm de diamètre et les cellules de la granulosa expriment *Bos taurus* cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (*CYP19A1*) et l'ARNm codant pour cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 - *Cyp11a1* (P450scc) mais pas l'ARNm codant 3 β -HSD alors que les TC expriment LHCGR, cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 - *Cyp11a1* (P450scc), cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 - *Cyp17a1* (P450c17), 3 β -HSD, et l'ARNm codant *Bos taurus* steroidogenic acute regulatory protein (STAR) (Guerrero Netro, 2013). Cela laisse supposer que les cellules de la granulosa commencent à métaboliser les androgènes produits par la TC en œstradiol et le cholestérol en prégnéolone mais pas la prégnéolone en progestérone du fait de l'absence de 3 β -HSD (Bao & Garverick, 1998). Les TC vont également produire de l'inhibine qui, en synergie avec l'œstradiol, va avoir un effet négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire réduisant ainsi la production de FSH. À ce stade de développement, les follicules présents sont tous au stade antral et une grande majorité d'entre eux deviendra

atrétiques et dégénère alors que le follicule dominant atteindra le stade préovulatoire (Bao & Garverick, 1998; McGee & Hsueh, 2000).

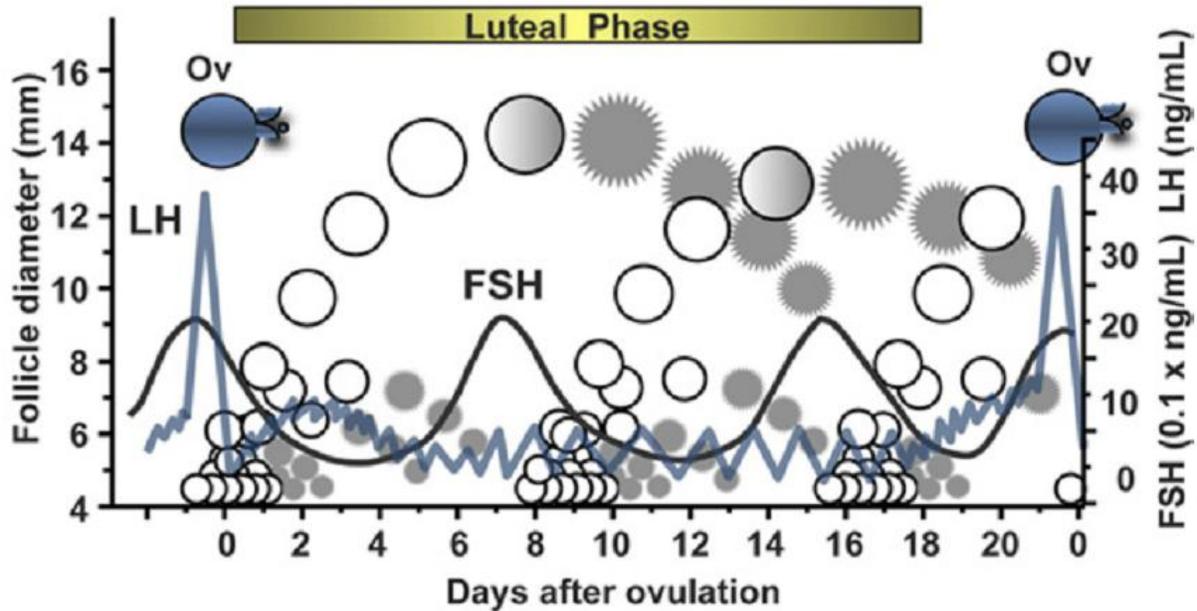


Figure 7: Développement folliculaire et sécrétion de gonadotrophines durant un cycle œstral à trois vagues chez la vache (Adams et al., 2012).

1.3.2 La sélection

Chez les espèces monoovulantes, la sélection est le processus par lequel un follicule unique est choisi au sein de la cohorte de follicules en croissance pour poursuivre son développement alors que le reste des follicules deviendra atrétiques (Fortune, Rivera, & Yang, 2004). Chez les espèces polyovulantes, plusieurs follicules sont sélectionnés et se développent en synchronie jusqu'à l'ovulation. La différence en taille entre le (ou les) follicule destiné à être dominant et le reste de la cohorte des follicules en croissance est connue sous le

terme de 'déviation' et intervient chez la vache lorsque le plus gros follicule mesure 8.5 mm de diamètre (Ginther, Kot, Kulick, & Wiltbank, 1997). Les follicules non sélectionnés (follicules dits 'subordonnés') du fait de la perte de support liée à la diminution de production de FSH, deviennent atrophiques et régressent. Le nombre de follicule atteignant le stade préovulatoire sera fonction de l'espèce ou de la race mais des variations seront également observées en fonction du niveau de la réserve ovarienne : ils seront plus nombreux chez la jeune femelle que chez la femelle âgée. Le processus exact de sélection demeure à ce jour inconnu même s'il a été suggéré que le (ou les) follicule sélectionné démontrait une augmentation de l'expression de FSHR, LHCGR et 3β -HSD dans les cellules de la granulosa lui permettant d'être plus réceptif à la LH et de continuer son développement malgré la diminution importante de FSH (Aerts & Bols, 2010a). Une autre hypothèse avance que la croissance serait due à une augmentation du niveau d'IGF1 dans le follicule dominant (Lucy, 2007).

1.3.3 La dominance

La notion de dominance est bien connue dans l'espèce bovine. Le follicule dominant est défini comme étant le follicule ayant un diamètre supérieur de plus de 2 mm par rapport aux follicules du reste de la cohorte (Sirois & Fortune, 1990) et doté d'une grande capacité à produire des œstrogènes (œstradiol). La dominance du follicule est décrite comme étant morphologique et fonctionnelle (Lavoie & Fortune, 1990) : morphologique car exercée par le follicule dominant et fonctionnelle car le follicule dominant a la capacité de provoquer la régression des follicules en croissance, de prévenir l'émergence d'une nouvelle cohorte de

follicules ayant une dépendance aux gonadotrophines (Ko et al., 1991; Sirois & Fortune, 1990) ou d'ovuler lorsque les conditions appropriées sont réunies (Gong, Bramley, & Webb, 1993). Chez la vache, Il est établi qu'il faudra 42 jours à un follicule antral pour devenir dominant (Aerts & Bols, 2010b). Les caractéristiques principales du follicule dominant seront une forte concentration d'œstradiol dans le liquide folliculaire, des niveaux élevés de l'ARNm codant pour LHCGR dans les TC et GC ainsi qu'un niveau plus élevé de 17 α -hydroxylase et d'aromatase dans les GC en comparaison avec les follicules subordonnés (Fortune et al., 2004). Une autre caractéristique du follicule dominant sera la forte expression de l'ARNm codant pour StAR dans les TC permettant le transport du cholestérol dans les mitochondries pour la production d'androgènes (Bao & Garverick, 1998).

1.3.4 Le follicule ovulatoire

Lorsque le follicule dominant atteint le stade préovulatoire, une cascade d'évènements débutant par un pic de LH va résulter en l'ovulation. La LH va être à l'origine de l'augmentation de la synthèse des récepteurs de la progestérone, des prostaglandines ainsi que des EGF- like facteurs dans les GC. Ce pic va également permettre à l'ovocyte primaire de compléter la méiose I.

1.3.5 L'atrésie folliculaire

L'atrésie folliculaire (ou involution folliculaire) constitue le devenir de la majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle est contrôlée

par un mécanisme de mort cellulaire programmée encore appelée apoptose. Ce phénomène survient tout au long de la folliculogenèse, affecte tous les follicules antraux avant la puberté ainsi que leur très grande majorité après celle-ci. De ce fait plus de 99% de follicules vont être touchés (Hsueh, Billig, & Tsafiriri, 1994; Hussein, 2005; Sirois & Fortune, 1990). Même si décrite à différents stades du développement folliculaire, l'atrésie affecterait beaucoup plus les follicules ayant atteint le stade antral (Irving-Rodgers, Van Wezel, Mussard, Kinder, & Rodgers, 2001; Scaramuzzi et al., 2011). Le phénomène d'atrésie folliculaire a été associé à la diminution de la concentration d'œstrogènes dans le liquide folliculaire ainsi qu'à la chute du niveau de CYP19A1 (Bao & Garverick, 1998). Parmi les principaux effecteurs intracellulaires de l'atrésie, l'on peut citer la protéine appelée B-cell Lymphoma 2 (anti-apoptotique) (Hsueh et al., 1994) et les caspases (Hengartner, 2000).

1.4 Communications inter et intra compartiments folliculaires

Dans le follicule, la communication entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa se font par le biais des jonctions communicantes (*gap junctions*) selon un mode bidirectionnel. La connexine, composante de ces jonctions, va traverser la zone pellucide pour s'apposer contre la membrane plasmique de l'ovocyte mettant les deux cellules en relation directe. Ce contact étroit va ainsi permettre le passage de molécules de petite taille et d'ions depuis les cellules de la granulosa vers l'ovocyte (Monniaux et al., 2009) et à l'inverse, l'ovocyte va prévenir la lutéinisation de ces cellules (Simon, Goodenough, Li, & Paul, 1997). Ainsi, l'ovocyte va agir sur les cellules de la granulosa en inhibant la production de

progestérone (Vanderhyden, Cohen, & Morley, 1993), stimulant leur prolifération (Vanderhyden, Telfer, & Eppig, 1992) et leur différenciation (Eppig et al., 1997).

1.5 L'ovulation

L'ovulation est le processus au cours duquel l'ovocyte, entouré des cellules du cumulus va être libéré suite à la rupture de la paroi folliculaire en son pôle apical. Elle s'accompagne d'importants changements parmi lesquels la maturation du complexe ovocyte-cumulus se traduisant par la reprise de la méiose de l'ovocyte et l'expansion du cumulus qui l'entoure ainsi que la modification du profil de sécrétion des stéroïdes se traduisant par une diminution brutale des niveaux sériques d'œstrogènes et d'androgènes au profit de la progestérone (Bridges & Fortune, 2007).

1.5.1 La cascade préovulatoire

L'ovulation est initiée par une très importante augmentation des taux circulants de LH sécrétée par l'hypophyse antérieure et résulterait de l'action coordonnée des gonadotrophines, des hormones stéroïdiennes ainsi que des médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire (telles les prostaglandines). La LH stimule directement les TC et GC mais ses effets sur les CC et l'ovocyte se font probablement de manière indirecte du fait que ces derniers ne possèdent que très peu ou pas du tout de récepteurs LH et ne répondent pas lorsqu'ils sont stimulés directement par la LH (Russell & Robker, 2007). Le pic de LH va entraîner

la surexpression rapide et transitoire de plusieurs gènes dans les heures, voire les minutes suivant le pic de LH qui vont être à l'origine des changements physiologiques et phénotypiques au niveau du follicule aboutissant à l'ovulation et la lutéinisation.

1.5.1.1 Les ADAMTs

Les ADAMTs regroupent 23 protéines transmembranaires de type I possédant un large domaine extracellulaire composé entre autre du domaine métalloprotéinase (ou métalloprotéase) ainsi que du domaine désintégrine (Wolfsberg, Primakoff, Myles, & White, 1995). Dans la cascade pré ovulatoire et sous l'effet de la LH, les ADAMTs sont impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire à l'origine de la rupture de la paroi du follicule, de l'expansion indispensable du cumulus pour la fécondation (Curry & Smith, 2006) et de l'expulsion du complexe cumulus/ovocyte. Les ADAMTs vont également contribuer à libérer les facteurs de croissance tels que l'EGF-like de la surface de la paroi des cellules de la granulosa (Yamashita & Shimada, 2012).

1.5.1.2 Les facteurs de croissance EGF-like

Les facteurs EGF-like comme l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG), et la betacelluline (BTC) voient leur libération induite de manière transitoire par la LH dans les cellules de la granulosa et par EGF dans les cellules du cumulus (Ashkenazi et al., 2005). Une fois libérés, AREG et EREG stimulent, par une action

paracrine, les récepteurs EGF des cellules du cumulus (Andric & Ascoli, 2008). L'activation des récepteurs à l'EGF va permettre l'expression des AREG et EREG dans les cellules du cumulus, l'expansion du cumulus ainsi que la reprise de la méiose. Elle va également stimuler l'expression de PTGS2 qui en retour va augmenter la production de PGE2. Le même processus se reproduit au niveau des cellules murales de la granulosa, EREG et AREG agissant de manière autocrine pour intensifier la cascade (Portela, Zamberlam, Gonçalves, de Oliveira, & Price, 2011). Si AREG, EREG et BTC ont la capacité de reproduire certains effets de la LH, seuls AREG et EREG peuvent relancer le processus de méiose au même titre que la LH (Ashkenazi et al., 2005).

1.5.1.3 Les prostaglandines

La synthèse des prostaglandines par les cellules de la granulosa représente un élément clé menant à la rupture de la paroi du follicule. Les prostaglandines sont produites à partir de l'acide arachidonique par la PTGS2, enzyme dont la production est stimulée par le pic de LH (Sirois & Richards, 1992; Sirois et al., 2004). Chez la vache, les concentrations des prostaglandines PGE2 et PGF2a restent faibles dans le liquide folliculaire durant la période periovulatoire pour augmenter de manière brutale dans les heures précédant l'ovulation (Bridges, Komar, & Fortune, 2006). Elles vont alors provoquer une réaction inflammatoire locale importante au sein du follicule et stimuler, du moins en partie, l'expression des protéases dans la paroi folliculaire ce qui va entraîner la rupture du follicule. L'implication des prostaglandines a également été décrite dans de nombreux

événements parmi lesquels l'expansion du cumulus, la maturation ovocytaire, l'angiogenèse et la production de progestérone (Ben-Ami et al., 2006).

1.5.1.4 L'expansion du cumulus

En réponse au pic de LH survenant avant l'ovulation, les CC vont développer une matrice extracellulaire composée d'un réseau d'acide hyaluronique et synthétisée via l'enzyme HAS2. Ce processus, connu sous le nom d'expansion du cumulus est également stimulé par certains facteurs de croissance (EGF, IGF1) et des facteurs ovocytaires (GDF9) (Monniaux et al., 2009). Le microenvironnement ainsi créé joue un rôle de protection pour l'ovocyte lors de son parcours dans l'oviducte et joue également un rôle dans la capacitation des spermatozoïdes avant la fécondation (Chen, Russell, & Larsen, 1993). Durant le processus d'expansion du cumulus, les gènes exprimés sont d'une importance capitale pour le bon déroulement de l'ovulation et l'obtention de taux de fertilité correct. Ainsi l'absence d'EREG et PTGS2 (EREG-null et PTGS2-null) chez la souris va se traduire par une mauvaise expansion du cumulus, un faible taux d'ovulation et une infertilité (Hsieh et al., 2007). L'expansion du cumulus et la reprise de la méiose (rupture de la vésicule germinale - GVDB) représentent les événements majeurs de la maturation ovocytaire. Des signaux produits par les CC semblent également avoir une influence sur la maturation ovocytaire (Gilchrist, Lane, & Thompson, 2008). Certaines prostaglandines dérivées de PTGS2 et produits par les CC semblent jouer un rôle important dans l'expansion du cumulus mais aussi dans la maturation de l'ovocyte lui-même. La PGE2, principale prostaglandine produite

par CC agit directement sur l'ovocyte pour activer des protéines impliquées dans la reprise du processus de la méiose (Eppig, 1981).

1.5.1.5 L'effet de la LH sur les cellules de la granulosa et de la thèque

Le pic de LH va provoquer d'importants changements sur le follicule préovulatoire. La concentration d'œstrogènes et d'androgènes dans le liquide folliculaire va s'effondrer alors que celle de progestérone, produite par les cellules de la granulosa et de la thèque va augmenter, tout comme l'expression des gènes des enzymes nécessaires à sa production (StAR, 3betaHSD) (Espey & Richards, 2002).

1.5.2 La rupture du follicule

L'ovulation intervient avec la rupture de la paroi du follicule. Ce processus, associé à une réaction de type inflammatoire (Espey, 1980), se caractérise par des changements vasculaires et la dégradation de la paroi du follicule par des enzymes protéolytiques (Ny, Wahlberg, & Brändström, 2002). Tout comme d'autres événements intra folliculaires prenant place durant la période préovulatoire, l'ovulation est sous l'influence des prostaglandines et plus spécifiquement de PGE2 qui joue un rôle actif dans le processus de dégradation de la paroi folliculaire.

1.6 Les régulateurs intra-ovariens

Considérés à l'origine comme ayant essentiellement un rôle dans la croissance tissulaire, le grand groupe hétérogène des facteurs de croissance est maintenant reconnu comme intervenant dans de très nombreux processus biologiques tant au niveau hormonal que localement en tant que facteur autocrine / paracrine à travers des récepteurs membranaires spécifiques. Au niveau de l'ovaire, ces facteurs, d'origine ovocytaire ou somatique, exercent leurs rôles autant au niveau des cellules de la granulosa que de la maturation ovocytaire ou de la néo-vascularisation dont le but sera de maintenir une homéostasie normale. Parmi les facteurs impliqués, nous pouvons citer les EGF, les IGF (I et II), les TGF β et les WNTs.

1.6.1 Les facteurs de croissance épidermiques (EGF)

EGF est une petite protéine soluble composée de 53 acides aminés et trois ponts disulfures qui joue un rôle crucial en reproduction. Elle est considérée comme un membre très important de la famille qui comprend en outre TGF α , l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG), l'épigène (EPG), la bêtacelluline (BTC), l'heparin-binding EGF et les neurégulines. Ces protéines vont agir sur leurs cellules cibles par l'intermédiaire de quatre récepteurs transmembranaires (Lafky, Wilken, Baron, & Maihle, 2008). Les membres de cette famille et plus principalement EGF, AREG, EREG et BTC sont très impliqués dans la fonction de reproduction : ils vont voir leur production augmenter considérablement sous l'effet de la GnRH (Motola, Cao, Ashkenazi, Popliker, & Tsafiriri, 2006) et lors du

pic de LH (Panigone, Hsieh, Fu, Persani, & Conti, 2008). Avec leurs récepteurs (EGFR), les EGF vont agir au niveau du follicule en stimulant la prolifération des GC, augmenter la sécrétion de P4, cAMP, cGMP et contrôler la libération d'œstradiol. Au niveau de l'ovocyte, ces facteurs favorisent la maturation, l'expansion du cumulus et inhibent l'apoptose (Ben-Ami et al., 2006). Les EGFR jouent un rôle physiologique important dans la prolifération, la survie, l'adhésion, la motilité et l'invasion des cellules et ce, qu'elles soient normales ou malignes, incluant les tumeurs ovariennes (Sirotkin, 2011).

1.6.2 Les insulin-like growth factor I et II (IGF-1 et IGF-2)

La famille des IGF est complexe; elle est composée de polypeptides dont la structure est proche de celle de l'insuline. Elle comprend deux ligands (IGF-1 et IGF-2), deux récepteurs (IGF1R et -2R), six protéines de liaison (IGFBPs) et au moins une protéase de dégradation (Fortune et al., 2004). Chez les ruminants et les rongeurs, IGF-1 est le ligand qui joue le rôle le plus important en reproduction alors que chez l'humain ce rôle est assuré par IGF-2. De nombreux chercheurs s'accordent pour dire que les IGFs jouent un rôle déterminant dans le développement folliculaire. Ils n'ont probablement aucun effet sur le follicule primordial alors qu'ils auraient un effet stimulateur sur la croissance des follicules secondaires. Conjointement avec la FSH, les IGFs vont stimuler la croissance du follicule antral ainsi que celle des cellules de la granulosa. L'effet synergique des IGF avec les gonadotrophines va également favoriser la différenciation des cellules folliculaires et inhiber l'apoptose (Beg & Ginther, 2006). Les IGF augmentent également l'expression des FSHR et LHCGR et stimulent la synthèse et la

sécrétion d'œstradiol, de progestérone, de testostérone, d'ocytocine, d'inhibine et de prostaglandines (Quirk, Cowan, Harman, Hu, & Porter, 2004).

1.6.3 Les transforming growth factor β (TGF- β)

La superfamille des TGFB comprend plus d'une quarantaine de protéines dont tous les ligands partagent des structures communes tout en étant fonctionnellement différents. Les membres de cette famille sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques et jouent un rôle crucial dans la croissance et le développement folliculaire. Au sein de cette famille, l'on distingue différents sous- groupes (ou sous- familles) parmi lesquels les TGF- β (TGF- β 1-3), les BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), les GDFs (*Growth Differentiation Factors*), les activines, les inhibines et l'AMH (*Anti-Müllerian Hormone*). TGF- β , GDF, AMH, activine, et inhibine sont tous exprimés dans l'ovaire (Knight & Glister, 2003). Les activités principales de ces protéines sont concentrées sur la prolifération et la différenciation cellulaire, la migration et l'apoptose.

1.6.4 Les WNTs

Le mot WNT est pour 'Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site'. Le premier, WNT1, a été identifié au site d'intégration d'un rétrovirus induisant des tumeurs mammaires chez la souris et appelé Int1, montrant d'emblée un rôle potentiel dans le développement normal et dans l'oncogenèse (Nusse & Varmus, 1982); une homologie a été notée entre les deux gènes. Le nom WNT résulte de la contraction de *Wingless* et d'*Integration*. A ce jour, les

WNTs représentent une des plus importantes familles de glycoprotéines secrétées décrites au cours de ces 30 dernières années. Les protéines WNTs sont impliquées dans l'embryogenèse et dans la morphogenèse et jouent un rôle très important dans la programmation cellulaire.

1.6.4.1 Structure générale des WNTs

Les protéines WNTs ont été identifiées chez les vertébrés ainsi que chez les insectes mais n'ont jamais été décrites chez les plantes, les eucaryotes unicellulaires comme *Saccharomyces cerevisiae* ou chez les procaryotes. À ce jour, 19 gènes WNTs ont été décrits chez l'homme et la souris. Chez l'homme, ces protéines sont de taille très semblable et leur poids moléculaire varie de 39 kDa (WNT-7a) à 46 kDa (WNT-10a) (Miller, 2002). La grande majorité des protéines WNTs possède jusqu'à 35% de séquence d'acides aminés en commun. Cette séquence augmente entre les membres d'un sous-groupe (au moins 58% entre WNT-3 et WNT-3a par exemple) ce qui va provoquer des chevauchements et suggérer ainsi une origine commune. Les WNTs sont des protéines très peu solubles du fait de modifications telles que la palmitoylation de la cystéine indispensable pour la sécrétion (Willert et al., 2003). La conséquence de cette faible solubilité des WNTs fait que leur structure détaillée reste à ce jour inconnue. L'on sait toutefois que ces protéines ont un squelette composé de vingt-trois à vingt-quatre résidus cystéines dont le rôle est inconnu mais dont la distribution est fixe du fait de la glycosylation et la formation de plusieurs ponts disulfures intra moléculaires (Figure 8). Les WNTs possèdent également un signal

peptide à leur extrémité amino-terminale qui joue un rôle important dans la spécificité de leurs réponses (Miller, 2002).

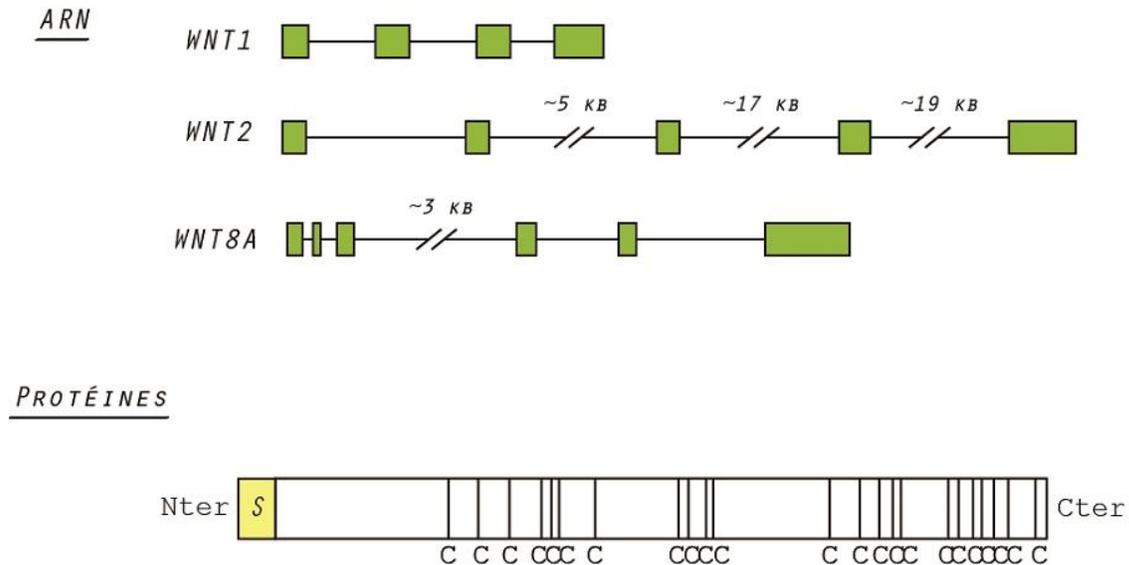


Figure 8: Structure des ARN et protéines WNTs. Les WNTs sont fréquemment constitués de quatre (e.g. WNT1) ou cinq exons (e.g. WNT2) espacés d'introns de longueur variable, à l'exception de WNT8A et WNT8B. Quelle que soit la structure nucléaire, les protéines WNT partagent deux caractéristiques : la présence d'un peptide signal (S) à l'extrémité amino-terminale permettant la sécrétion, et un squelette de 21 à 23 résidus de cystéines (Binet, 2011).

1.6.4.2 Fonction générale des WNTs

Les protéines WNTs interagissent avec des récepteurs membranaires, principalement de la famille Frizzled (FZD). Cette interaction initie l'activation de voies de signalisation intracellulaire pour induire l'expression de gènes impliqués dans de multiples processus biologiques comme la prolifération cellulaire, la

différenciation, l'apoptose, la survie, la migration et la polarisation cellulaire (Hoppler & Kavanagh, 2007). Ces protéines de signalisation extracellulaires jouent un rôle prépondérant au cours de l'embryogenèse et de la morphogenèse par la transcription de nombreux gènes cibles comme le démontrent les mutations observées après leur invalidation (Knockout de certains d'entre eux. Ainsi, WNT-1 est impliqué dans le développement cérébral (McMahon & Bradley, 1990), WNT-3 joue un rôle dans la gastrulation et la formation de l'axe dorso-ventral chez les vertébrés (Liu et al., 1999), alors que WNT-4 et WNT-7a sont impliqués dans certaines fonctions de reproduction (Parr & McMahon, 1998; Vainio, Heikkilä, Kispert, Chin, & McMahon, 1999). Les protéines WNT jouent également un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie chez l'adulte ainsi que dans le maintien des cellules souches. La régulation anormale de la signalisation WNT, lorsqu'elle n'est pas létale, est à l'origine d'affections dégénératives comme l'ostéoarthrose ou le développement de tumeurs chez l'adulte (Logan & Nusse, 2004).

1.6.4.3 Les voies de signalisation

Une fois secrétés, les WNTs vont, pour transmettre leur signal, se lier aux récepteurs membranaires FZD et au co-récepteurs LRP5/6 « *Low-density-lipoprotein receptor Related Protein* » (Miller, 2002) activant ainsi des voies intracellulaires de signalisation dont les trois principales sont : la voie de signalisation WNT/ β -caténine (voie canonique), la voie de polarité planaire (« *Planar Cell Polarity* », PCP) et la voie WNT/ Ca^{2+} (voies non-canoniques). Différentes associations WNT/FZD ont la possibilité d'activer ces voies de

signalisation et mener à une réponse cellulaire unique. Alors que la présence de LRP5/6 est nécessaire pour activer la voie de la β -caténine, le récepteur FZD peut être suffisant pour d'autres voies (Binet, 2011). La voie de signalisation WNT/ β -caténine contrôle la physiologie des cellules souches de nombreux tissus alors que la principale fonction de la voie de polarité planaire (ou polaire planaire) est la réorganisation du cytosquelette. Le rôle de la voie WNT/ Ca^{2+} reste quant à lui peu clair.

1.6.4.3.1 La voie de signalisation WNT/ β -caténine (voie canonique)

La voie de signalisation WNT/ β -caténine ou voie canonique est la voie de signalisation activée des protéines WNT la plus étudiée. La voie canonique des WNTs induit une accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau. L'activation de cette voie est toutefois soumise à la concentration de β -caténine dans la cellule (Miller, 2002). Le processus, se déroule de la manière suivante (Sedes, 2014): en absence de signal WNT, la β -caténine cytoplasmique est maintenue inactive grâce à sa phosphorylation par un complexe de destruction composé des protéines APC et Axine qui sont des protéines d'ancrage ainsi que des kinases GSK3 et CK1 α . La β -caténine va ensuite être dégradée par le protéasome. Les protéines WNTs vont se lier avec leurs récepteurs FZD et corécepteurs LRP-5/6 provoquant l'inactivation du complexe de destruction. La kinase GSK3 sera quant à elle inactivée par une protéine plasmique Disheveled (DSH). La forme non phosphorylée de la β -caténine transloquée dans le noyau. Cette protéine doit se lier à des facteurs de

transcription pour pouvoir modifier l'activité transcriptionnelle de ses gènes-cibles (Clevers & Nusse, 2012). (Figure 9) (Miller, 2002).

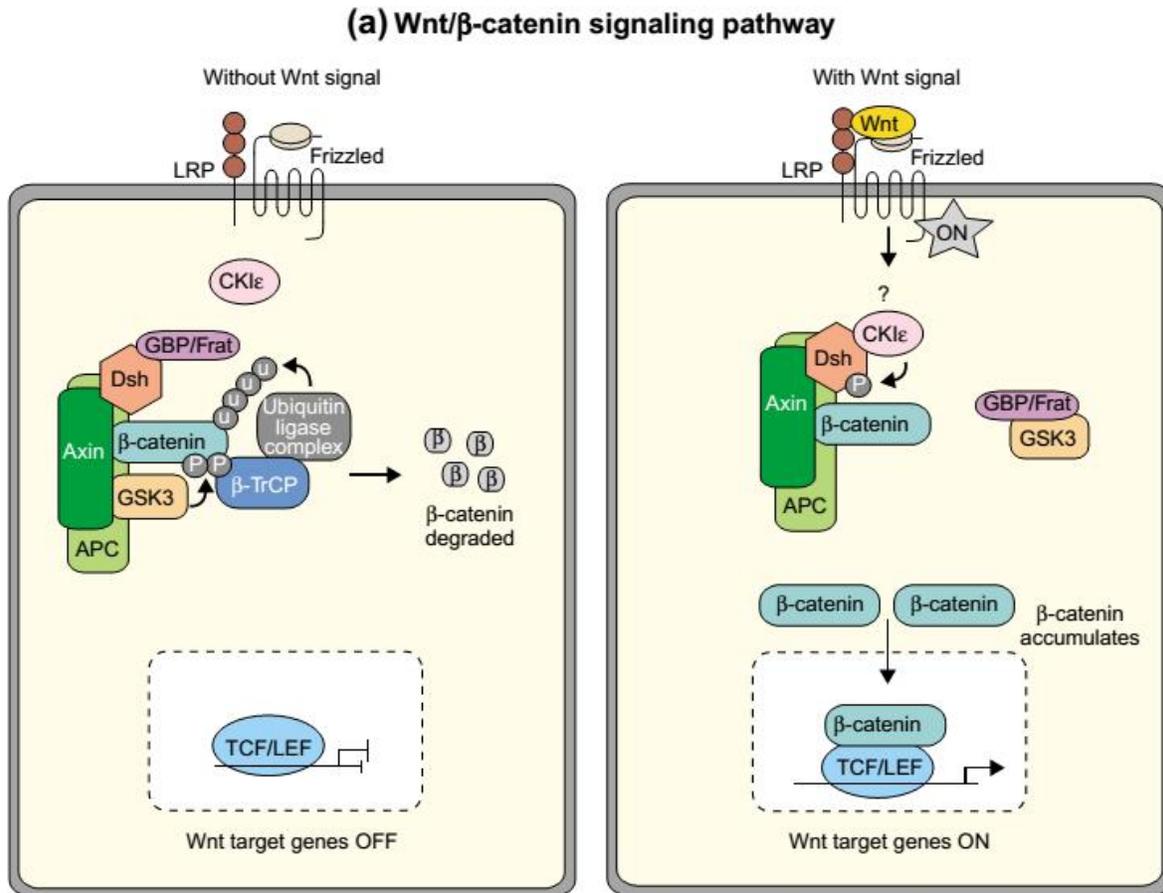


Figure 9: Voie de signalisation WNT/ β -caténine. (A) En l'absence de stimulation des récepteurs Frizzled (FZD) et LRP par un ligand WNT, la β -caténine est phosphorylée par les kinases GSK3 au sein d'un complexe de destruction comprenant également les protéines Axine et APC. Une fois phosphorylée, elle est reconnue par une ubiquitine ligase TRCP et conduite vers le protéasome. (B) En présence d'un ligand, le complexe de destruction est dissocié. La protéine DSH est recrutée à la membrane et permet l'inactivation de la kinase GSK3. La β -caténine non phosphorylée peut entrer dans le noyau et s'associer à des facteurs TCF/LEF et réguler ses gènes cibles (Miller, 2002).

1.6.4.3.2 La voie de polarité planaire (PCP)

Le rôle premier de cette voie est de réguler la polarité des cellules à travers la réorganisation du cytosquelette. Elle est activée par l'interaction WNT/FZD et ne nécessite pas de récepteur LRP5/6. La protéine DSH active la cascade RHOA qui va alors induire l'expression des gènes alors que la cascade JNK, selon un mécanisme non encore élucidé, va permettre une réorganisation du cytosquelette. Cette voie est supposée contrôler chez les vertébrés les mouvements des cellules polarisées durant le processus de gastrulation et neurulation. Chez la drosophile, cette voie contrôle la bonne orientation des trichomes (poils) dans les ailes. (Figure 10-c).

1.6.4.3.3 La voie calcique (WNT/Ca²⁺)

L'activation de la voie calcique nécessite la création de liaison WNT/FZD dans laquelle sont impliqués des WNTs spécifiques dont WNT-4, WNT-5a et WNT-11 (Kuhl, 2000). Celle-ci va aboutir à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui à son tour va entraîner l'activation d'enzymes telles que la calcium/*Calmodulin dependent protein kinase II* (CAMKII) et la *protein kinase C* (PKC). Plusieurs dizaines de protéines cibles de ces kinases sont à ce jour connues et chez la grenouille du genre *Xenopus* une interférence entre l'activation de la voie calcique et la voie canonique de signalisation WNT/ β -caténine a été décrite (Kühl, Sheldahl, Malbon, & Moon, 2000)(Figure 10-b).

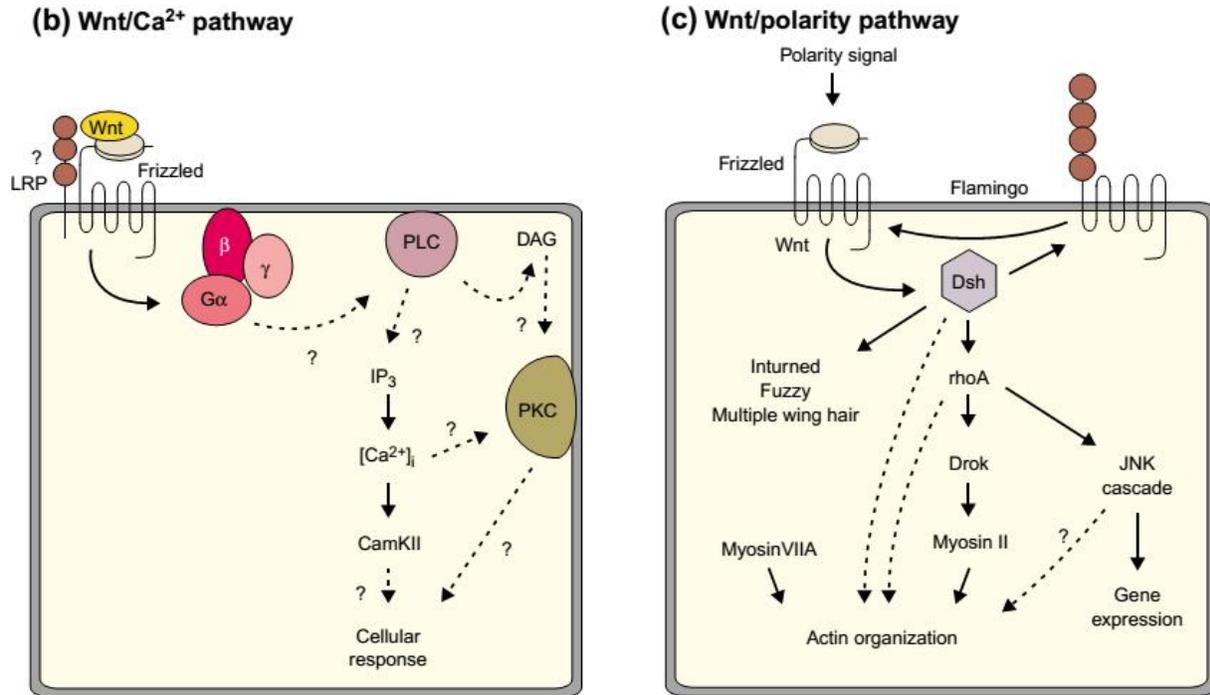


Figure 10: Voie calcique (b) et la voie de polarité planaire (c) : La voie calcique aboutit à une augmentation intracellulaire de Ca²⁺ accompagnée d'une stimulation de CAMKII et PKC. La voie PCP avec l'exemple de la drosophile (Miller, 2002).

1.6.4.4 Les WNTs et la reproduction chez la femelle

De nombreuses observations ont décrit le rôle de plusieurs membres de la famille des WNTs sur l'ovaire en utilisant différentes voies. Ainsi, il s'avère que les WNTs sont autant impliqués dans le développement de l'ovaire depuis les premiers stades embryonnaires que dans la régulation de la fonction ovarienne chez l'adulte. La spécificité de leur action laisse toutefois penser que ces glycoprotéines agissent toutes à un moment bien spécifique du développement. Vainio fut le premier en 1999 à démontrer l'implication des WNTs au niveau de l'ovaire en décrivant l'existence de problèmes majeurs de développement ovarien

chez la souris où WNT-4 n'était pas exprimé (Vainio et al., 1999). Une telle souris va, à la naissance, présenter des ovaires masculinisés (réversion du sexe) ainsi qu'une déplétion de son stock d'ovocytes. Le rôle de WNT-4 chez la femelle serait triple (Lapointe, 2012): (1) il contribuerait à la migration et la sélection des cellules formant la glande surrénales et les gonades ainsi qu' à l'établissement de la vascularisation embryonnaire (Jeays-Ward et al., 2003), (2) il aurait un rôle crucial dans la survie des cellules germinales femelles (Jääskeläinen et al., 2010) et (3) il inhiberait de la sécrétion de testostérone causant la régression des structures males telles les canaux de Wolff (Heikkilä et al., 2005). Ces rôles, conduisant à la différenciation sexuelle sous l'effet de WNT-4 s'exercent via la voie canonique (β -caténine) (Liu, Liu, & Yao, 2010). Chez l'adulte, WNT-4 va agir à tous les stades du cycle ovarien (Boyer, Lapointe, et al., 2010). L'utilisation de souris transgénique a permis de confirmer l'utilisation de la voie canonique par WNT-4 dans la folliculogenèse, la lutéogenèse et la stéroïdogenèse (Boyer, Goff, & Boerboom, 2010). Ainsi, la baisse de l'expression de WNT-4 au niveau des ovaires conduit à une infertilité du fait de la diminution du nombre de follicules antraux alors que sa suppression va provoquer au niveau des cellules de la granulosa une baisse des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse (Cyp19, Cyp11a1 par exemple) conduisant à une baisse de progestérone qui serait incompatible avec le maintien d'une gestation (Lapointe, 2012). D'autre part, la dérégulation de la voie de signalisation canonique pourrait causer le développement de tumeur des cellules de la granulosa (Boerboom et al., 2005). WNT-2, un autre membre de la famille des WNTs exercerait également des effets sur l'ovaire et ses composites. WNT2 aurait été détecté dans les cellules de la granulosa à tous les stades du développement folliculaire dans l'ovaire de la ratte et il aurait été isolé dans les

cellules du cumulus chez la femme (Wang, Tekpetey, & Kidder, 2009). WNT-2 exercerait également, via la voie canonique, une action positive sur la prolifération des cellules de la granulosa (Wang, Li, & Kidder, 2010) mais les mécanismes réels restent encore inconnus. D'autres WNT tels que WNT-5a, WNT-6, WNT-9a agiraient également durant la période de développement de l'ovaire mais leur mode d'action n'est pas clairement défini actuellement (Lapointe, 2012). Dans la famille des WNTs, WNT-4, WNT-5a et WNT-7a auraient un effet sur le développement de l'appareil génital chez la femelle au stade embryonnaire. Cet effet se poursuivrait chez l'adulte durant les cycles œstraux comme l'atteste le tableau 3 ci-dessous (Heikkilä, Peltoketo, & Vainio, 2001).

	Wnt-4	Wnt-5a	Wnt-7a
During embryogenesis	Ovary Future uterine horn mesenchyme Sinus vagina epithelium	In the genital tubercle Genital tract mesenchyme	Müllerian duct epithelium
After birth	Uterine horn mesenchyme Oviduct mesenchyme	Genital tract mesenchyme	Cervix, vagina, and uterine horn epithelium
Few days after birth	Vagina epithelium	Uterine stroma Oviduct mesenchyme and epithelium	Uterine horn epithelium and forming glands Oviduct epithelium Vagina epithelium
During estrous cycle			
Diestrus	Undetectable	Uterine epithelium and stroma (low levels)	Luminal epithelium of uterine horn (all stages)
Proestrus	Uterine epithelium and stroma (low levels)	Uterine and stroma	
Estrus	Uterine stroma and epithelium	Uterine stroma and epithelium	
Metestrus	Uterine stroma	Uterine stroma	

Tableau 3: Expression de WNT-4, WNT-5a et WNT-7a sur l'appareil reproducteur femelle (Heikkilä et al., 2001).

Une déficience de ces WNT (Knockout) entrainerait des troubles sévères au cours de l'organogenèse comme l'atteste le tableau 4 suivant (Heikkilä et al., 2001).

	Wnt-4	Wnt-5a	Wnt-7a
Defects	Lack of Müllerian duct Partial masculinization of gonads and ectopic expression of testosterone biosynthesis genes Loss of oocytes	Stunted genital tubercle→lack of external genitalia	Abnormal oviduct Abnormal uterus
Viability	<24 hr	<24 hr	Viable, sterile

Tableau 4: Conséquences de la déficience de WNT-4, WNT-5a et WNT-7a sur l'appareil reproducteur femelle (Heikkilä et al., 2001).

A noter que les troubles observés chez la femelle suite à une déficience de WNT-7a se rapprochent beaucoup de ceux observés chez la femme et la souris lorsqu'elles ont été exposées avant la naissance au diethylstilbestrol (DES) (Miller, Degenhardt, & Sassoon, 1998).

Sur le développement des glandes mammaires, au moins 6WNT seraient impliqués : WNT-4, -5a, -5b, -6, -7b et -10b (Weber-Hall, Phippard, Niemeyer, & Dale, 1994). L'expression de WNT-4 et WNT-5b, très faible chez la souris vierge augmenterait de manière considérable durant la gestation (Weber-Hall et al., 1994). Les dernières publications faites sur le rôle des WNTs dans le développement des glandes mammaires mettraient en avant le rôle primordial de WNT-4. Les WNT-5a, -5b et -6 jouant un rôle de support en cas de mauvaise expression de WNT-4 durant la gestation (Briskin et al., 2000).

Chapitre 2 - Hypothèse et objectifs

Nous émettons l'hypothèse que certains membres de la famille des WNTs jouent un rôle dans le processus de maturation du COC chez la vache et sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes jouant un rôle primordial dans la cascade ovulatoire.

Notre premier objectif était d'évaluer l'expression possible de quelques membres de la famille des WNTs ainsi que celle de certains gènes (AREG, EREG et COX2) au cours du processus de maturation du complexe cumulus-ovocyte (COC). Le deuxième objectif de notre étude était de vérifier que le(s) WNT(s) exprimé(s) dans l'expérience 1 avait (ent) un rôle dans le processus de maturation du COC.

Chapitre 3 - Matériels et méthodes

Sauf spécifié, les produits et réactifs utilisés au cours de ces expérimentations sont commercialisés par Gibco Life Technologies Inc Burlington, ON, Canada.

3.1 Culture cellulaire

Pour nos expérimentations, des ovaires de vaches adultes sont recueillis, indépendamment du stade du cycle œstral, immédiatement après l'abattage dans un abattoir local de la région de Québec. Les ovaires sont ensuite transportés à notre laboratoire dans une solution saline tamponnée à température ambiante contenant pénicilline (100 IU/ml) et streptomycine (100 mg/ml). Les COCs sont obtenus par aspiration des follicules mesurant entre 2 et 8 mm de diamètre à l'aide d'une aiguille 18 G puis conservés à température ambiante dans des boîtes de pétri de 35x10 mm Falcon (Corning Incorporated, Corning, NY 14831) contenant la solution de maturation de base composée de 10 ml de Medium 199 (1X) Hank's, 10 µl de gentamycine (50 mg/ml), 20 µl de pyruvate à 100mM et de 40 mg d'albumine de sérum bovin en poudre lyophilisée, ≥96% (Sigma-Aldrich, Canada, Oakville ON). Après sédimentation, les COCs sont sélectionnés sous une loupe binoculaire et récupérés à l'aide de pipettes manuelles Wiretool (Drummond Scientific Company, Broomall, PA 19008). Seuls les COCs présentant un cytoplasme homogène et entourés d'au moins cinq couches compactes de cellules du cumulus sont utilisés. Les COCs sélectionnés sont rincés grâce à deux passages successifs dans une solution claire de même composition que celle

décrite plus haut avant leur mise en culture. Le temps moyen écoulé entre l'abattage et la mise en culture était de 6 heures.

3.2 Étude 1 : Évaluation de l'expression des WNTs, de AREG, EREG et COX2 au cours du processus de maturation des COCs

Avant son utilisation, la solution de maturation de base était passée au travers d'un filtre Filtropure S 02 (Sarstedt Inc., Newton, NC) puis supplémentée avec le facteur de croissance épidermique EGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) à la concentration de 10 ng/ml. Des gouttelettes de 100 µl de cette solution finale serviront à la maturation des COCs. Elles seront recouvertes de 4ml d'huile minérale stérile et filtrée (BioXtra) recommandée pour la culture de cellules embryonnaires de souris (Sigma-Aldrich Canada, Oakville ON) et placées dans une étuve dont la température intérieure est réglée à 37.8°C avec une atmosphère de 5% de gaz carbonique (CO₂) au moins 4 heures avant le transfert des COCs. Par groupes de 20, les COCs seront mis en maturation dans les gouttelettes ainsi obtenues (3 réplicats). L'évaluation de l'expansion des cellules cumulus est effectuée visuellement 0, 6, 12 et 22 heures après leur mise en incubation en utilisant un système subjectif de notation qui attribuera des notes de 1 à 3 en fonction de leur degré d'expansion. La note '1' sera attribuée en l'absence de toute expansion ou lorsque celle-ci est très faible. Dans cette situation, il n'y aura que très peu de différences entre les cellules du cumulus avant et après la maturation. La note '2' est attribuée lorsqu'une expansion partielle est observée alors qu'en cas d'expansion totale ou presque, la note '3' sera attribuée (Caixeta et al., 2013; Zhang, Hansen, & Ealy, 2010). Les COCs, après 0, 6, 12 et 22h de culture sont transférés dans des gouttelettes de solution saline tamponnée au

phosphate (PBS). Les cellules du cumulus sont alors séparées par pipetage rapide des ovocytes puis maintenues congelées à -80°C dans le réactif d'extraction fourni jusqu'au moment de l'extraction de l'ARNm. L'expression de AREG, EREG et COX2 ainsi que celle de quelques WNTs (-2, -2b, -4 -5a et -5b) sur les cellules du cumulus sont évaluées par PCR en temps réel. Le choix des WNTs a été fait sur la base de leur disponibilité dans notre laboratoire.

3.3 Étude 2 : Rôle des WNTs dans le processus de maturation des COCs

Les effets de WNT-2b seul ou associée à EGF sur l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte sont évalués après incubation dans le milieu de maturation. Pour ce faire, la même solution de maturation de base décrite dans l'étude 1 était utilisée. Après filtration, cette solution a été supplémentée avec 10µl/ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) agissant comme véhicule (Groupe 1), 10 ng/ ml EGF (Groupe 2), 100 ng/ml WNT-2b (Groupe 3), et un mélange composé de 10 ng/ ml EGF et de 100 ng/ml de WNT-2b (Groupe 4). La concentration de WNT-2b a été choisie après réalisation in vitro de tests à différentes concentrations pour apprécier l'effet de ce membre de la famille des WNTs sur le COC. Comme dans l'étude 1, des gouttelettes formées à partir de ces solutions et recouvertes d'huile stérile sont placées dans une étuve dont la température intérieure est réglée à 37.8°C avec une atmosphère de 5% de gaz carbonique (CO₂) pendant un minimum de quatre heures. Des COCs, par groupes de 20 sont alors mis à incuber dans ces gouttelettes (3 réplicats). Vingt-deux heures après le transfert des COCs, une évaluation visuelle de l'expansion des cellules du cumulus est effectuée en faisant appel à la méthode décrite dans

l'étude 1. Les cellules du cumulus et les ovocytes de chaque groupe seront alors séparés par pipetage rapide dans un faible volume de solution saline tamponnée au phosphate. Les ovocytes ainsi dénudés sont fixés dans une solution de formaldéhyde à 10% pendant 10 minutes puis colorés en les plaçant dans une solution de Hoechst à 4% (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, Canada, Oakville ON) pendant 10 minutes. Les ovocytes ainsi colorés sont alors montés sur lames de microscope (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, 1529 USA). La visualisation des chromosomes sera rendue possible grâce à l'utilisation d'un microscope à fluorescence Axio Observer.Z1 motorized Basic (Zeiss) et piloté par le logiciel Zen Pro 2012. Les cellules du cumulus sont quant à elles maintenues congelées à -80°C dans le réactif d'extraction fourni jusqu'au moment de l'extraction de l'ARNm.

3.4 Transcription inverse et PCR en temps réel

L'extraction de l'ARN total des cellules du cumulus était réalisée en utilisant le kit d'isolement d'ARN Arcturus PicoPure (Applied biosystems) selon les instructions fournies par le fabricant. L'ARN total obtenu subit alors une transcription inverse en utilisant 100 ng d'ARN et la trousse de synthèse SuperScript Vilo cDNA (Invitogen). Les tests de PCR en temps réels sont alors effectués grâce au système CFX96 Real time (Biorad) et utilisant comme réactif SsoAdvanced universal sybr green supermix (BioRad). Chaque réaction consistait à associer 7.5µl de SsoAdvanced sybr green, 1.1 µl d'eau, 4µl de cDNA (RT dilué 1:10) et 1.2µl de chacune des paires d'amorces (primers) (20 pmol). Pour ce faire, des courbes de fusion avaient été générées et les produits de PCR séquencés pour les identifier.

Chaque échantillon a été analysé en double et les niveaux d'expression sont relatifs au gène de ménage H2AFZ. Les données ont été normalisées via un échantillon contrôle en utilisant la méthode des $\Delta\Delta Ct$ qui tient compte de l'efficacité d'amplification. Chez les bovins, les amorces spécifiques ont déjà été décrites (Tableau 5). Les paramètres courants du cycle thermique du programme (3 min à 95 °C, 40 cycles de 45 s à 95 °C, 30 s à 60 °C, and 30 s à 72 °C) sont utilisés pour amplifier chaque transcrit. Les analyses des courbes de dénaturation thermiques aideront à déterminer si un seul produit d'amplification a été généré. Les échantillons sont analysés deux fois et la moyenne des deux résultats obtenus pour chaque échantillon est utilisée. Les gènes sont exprimés de manière relative par rapport à l'histone (H2AFZ) agissant en tant que « *housekeeping gene* » alors que l'eau est utilisée comme contrôle négatif. Les valeurs obtenues sont alors ajustées à un échantillon servant de référence par l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta Ct$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification (Pfaffl, 2001).

Gènes	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (3' - 5')
<i>WNT4</i>	CATGAACCTCCACAACAACGA	TCGCCAGCACGTCTTTACCT
<i>WNT2</i>	CCAGAGCCCTGATGAATCTTCA	TCACGCCATGACACTTGCA
<i>WNT2b</i>	GACCGGGACCACACTGTCTT	GACCACCCCTGCTGATGAGA
<i>WNT5b</i>	CCGCGTGCTCATCATGAACCT	GAGACGCCATGGCATTGTC
<i>WNT5a</i>	TTCTCTCCTTCGCCAGGTT	AGAGAGGCTGCGCTCCTATG

Tableau 5 : Amorces spécifiques utilisées chez les bovins

L'évaluation de l'expression de AREG, EREG et COX2 par les cellules du cumulus dans l'expérimentation 1 est réalisée selon le même protocole décrit ci-dessus. Les séquences des amorces spécifiques utilisées sont représentées dans le tableau 6. Des courbes de fusion ont été générées et les produits de PCR ont été séquencés pour les identifier. Chaque échantillon a été analysé en double et les niveaux d'expression sont relatifs au gène de ménage H2AFZ. Les données ont été normalisées via un échantillon contrôle en utilisant la méthode des $\Delta\Delta C_t$ qui tient compte de l'efficacité d'amplification.

Gènes	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (3' - 5')
<i>AREG (bovine)</i>	CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT	CGTTCTTCAGCGACACCTTCA
<i>EREG (bovine)</i>	ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA	TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT
<i>COX2</i>	CTCTTCCTCCTGTGCCTGAT	CTGAGTATCTTTGACTGTGGGAG
<i>PTX3</i>	CCGGCAGGTTGTGAAAGAG	TTTGACCCAAATGCAGGCAC
<i>TNFAIP6</i>	CATATGGCTTGAACAAGCAGC	CATATTCACACACCGCCTTCG
<i>Histone (H2AFZ)</i>	GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC

Tableau 6: Amorces spécifiques utilisées

3.5 Analyse Statistique

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel JMP (SAS Institute, Cary, NC). Les valeurs obtenues sont transformées en logarithmes si elles n'étaient pas distribuées normalement (Shapiro-Wilk test). L'effet des traitements était apprécié grâce à l'utilisation du Students test. Les valeurs sont représentées par la méthode des moindres carrés \pm SEM ('Standard Error of Mean', écart type de la moyenne). Les différences sont considérées comme étant significatives lorsque $p < 0.05$.

Chapitre 4 - Résultats

4.1 Les WNTs, AREG, EREG et COX2 sont exprimés au cours du processus de maturation des COCs

Les COCs avaient été mis en culture dans leur milieu de maturation avec comme facteur de croissance EGF puis étaient évalués 0, 6, 12 et 22 h plus tard afin d'identifier par PCR en temps réel l'expression de gènes susceptibles de jouer un rôle dans leur processus de maturation. Dans cette expérimentation, nous mesurons dans les cellules du cumulus les niveaux d'ARNm codant pour certains gènes ayant un rôle important dans le processus d'ovulation (AREG, EREG et COX2) (Caixeta et al., 2013) ainsi que quelques membres de la famille des WNTs (WNT -2, -2b, -4,-5a, -5b). L'abondance des ARNm était significativement augmentée après 6h de maturation pour AREG et EREG et après 22h de maturation pour COX2 ($p < 0.05$) et ce, comparée aux COC immatures (à 0h) (Figures 11 à 13).

Concernant les WNTs, l'abondance des ARNm au niveau des cellules du cumulus était significativement plus élevée ($p < 0.05$) avec WNTs -2 (Ct=31.99), -2b (Ct= 25.07) et -5a (Ct=23.84) qu'avec WNTs -4 et -5b. Avec WNT-2 les niveaux d'ARNm augmentaient progressivement pour atteindre leur maximum à 22h (Ct= 30.02). Le niveau d'ARNm était également à son maximum à 22h avec WNT-5a (Ct= 22.38) mais avec une augmentation importante après 12h de culture. Différence importante avec WNTs -2 et -5a, WNT -2b a une Ct qui passe brutalement de 25.07 à 0h à 23.01 à 6h pour ensuite être égale à 28.31 à 12h (Figures 14 à 18). Il

n'avait pas été observé de différences statistiquement significatives concernant l'abondance des ARNm au niveau des cellules du cumulus avec WNT-4 et -5b.

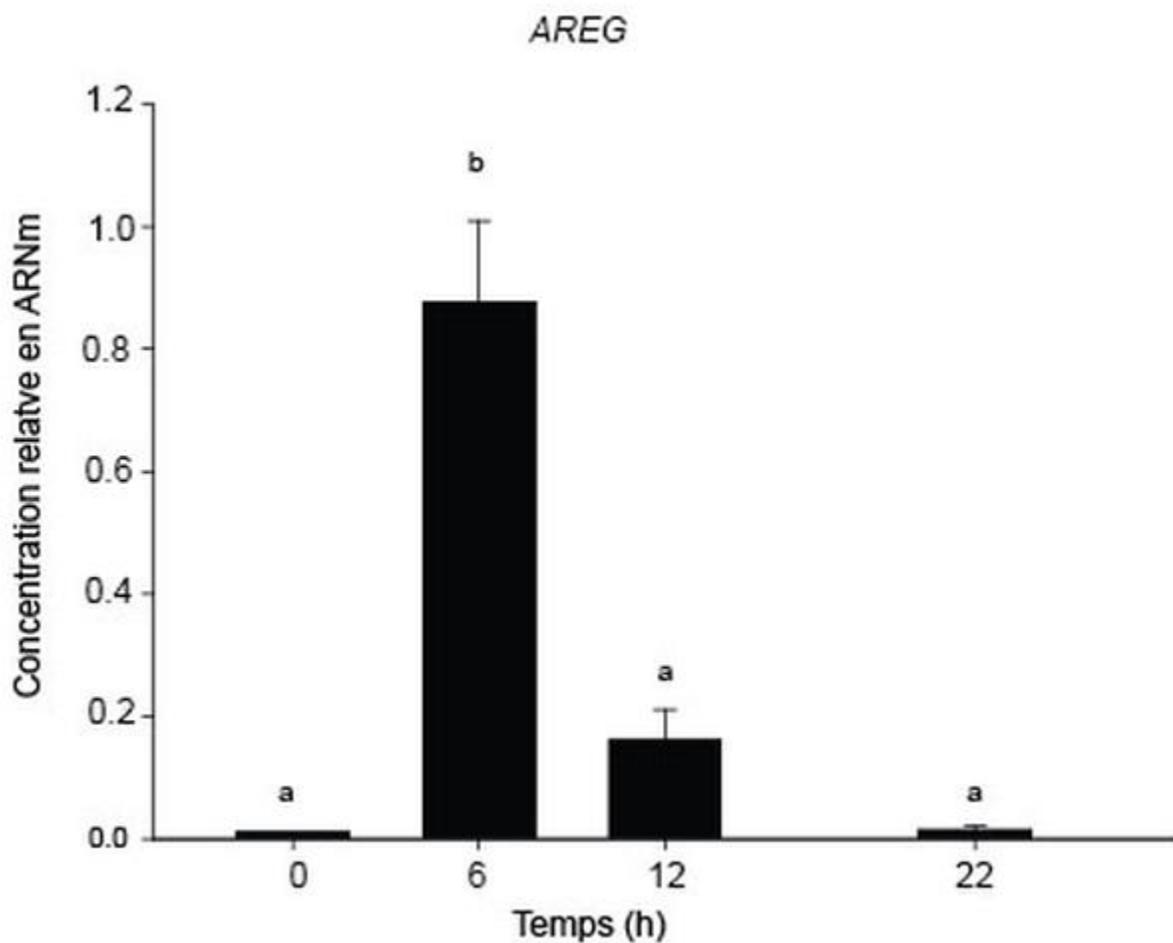


Figure 11: Abondance des ARNm codant pour AREG, dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme de valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta C_t$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

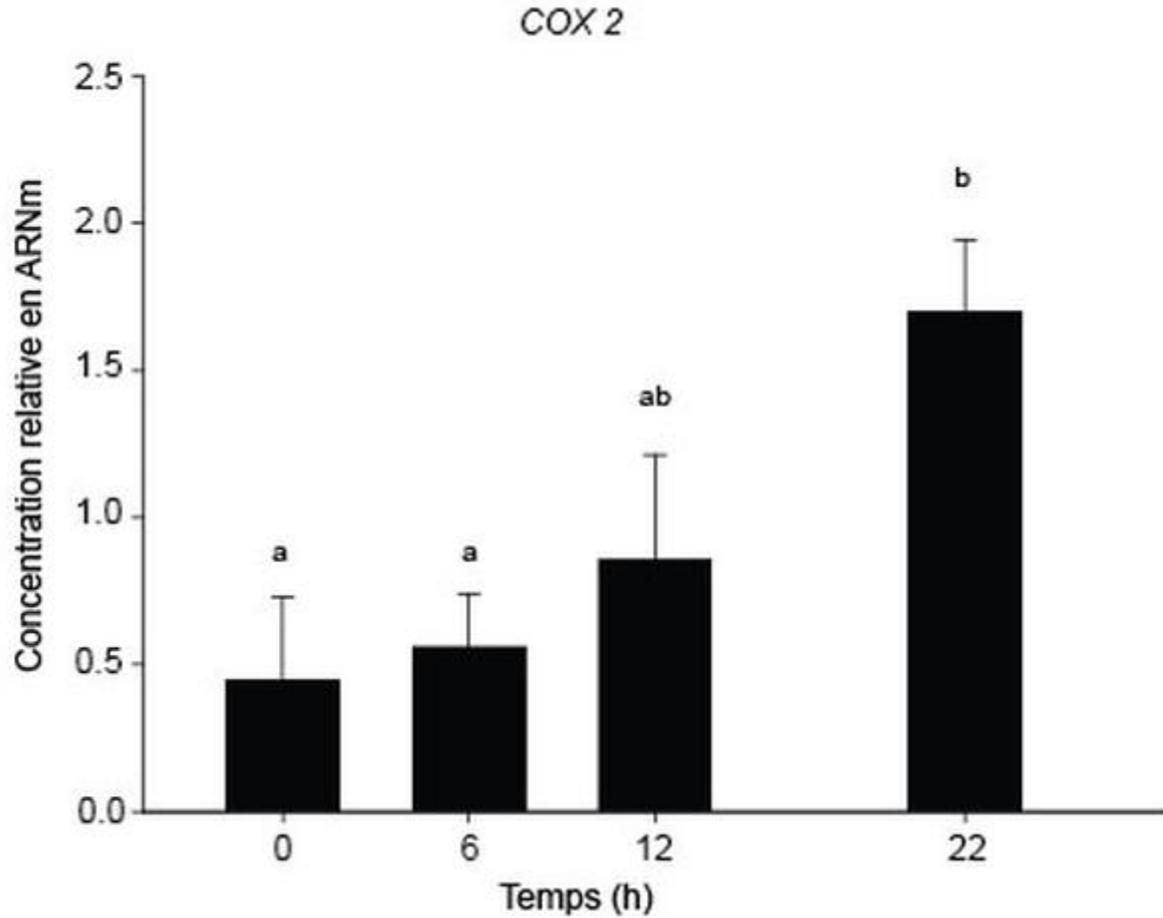


Figure 12: Abondance des ARNm codant pour COX2 dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta C_t$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

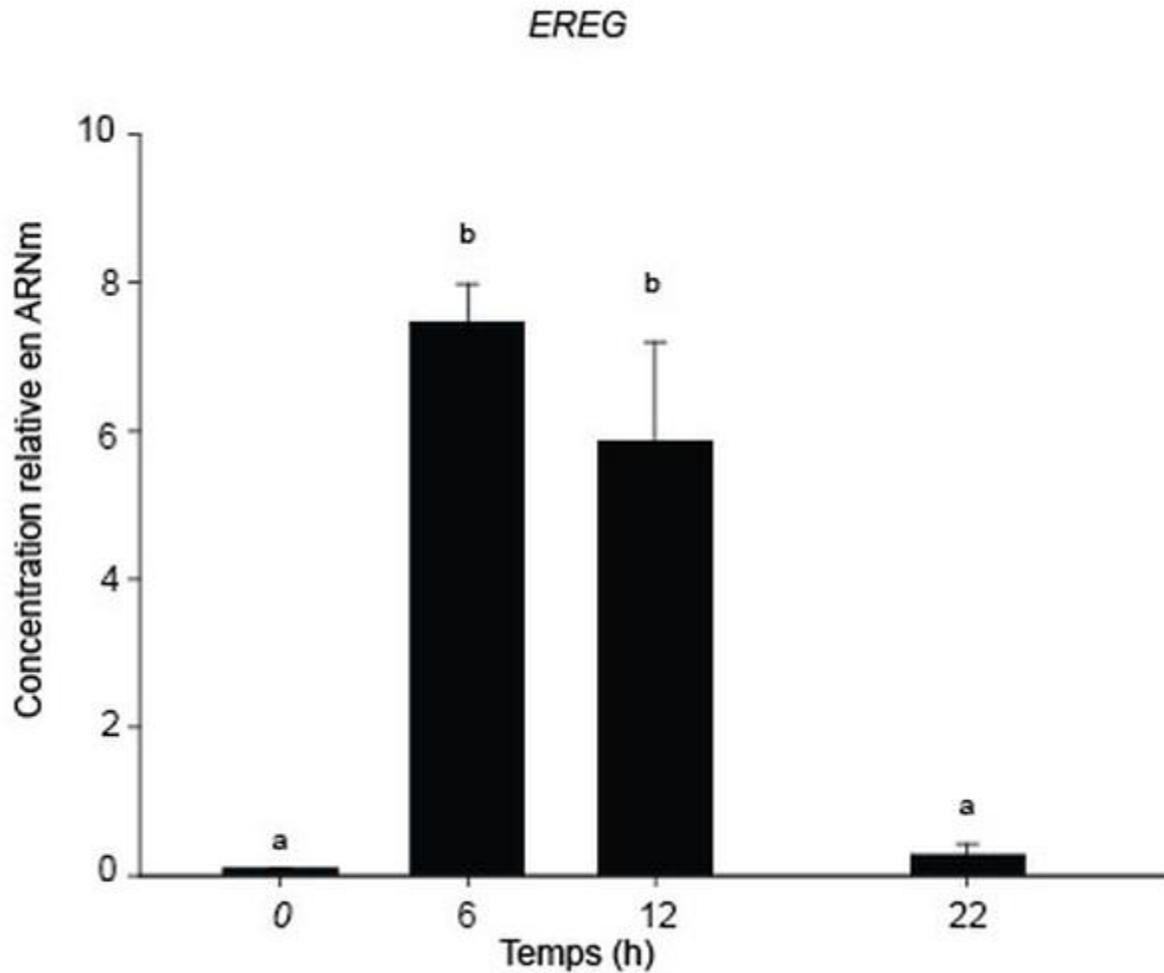


Figure 13: Abondance des ARNm codant pour EREG dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme de valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta Ct$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

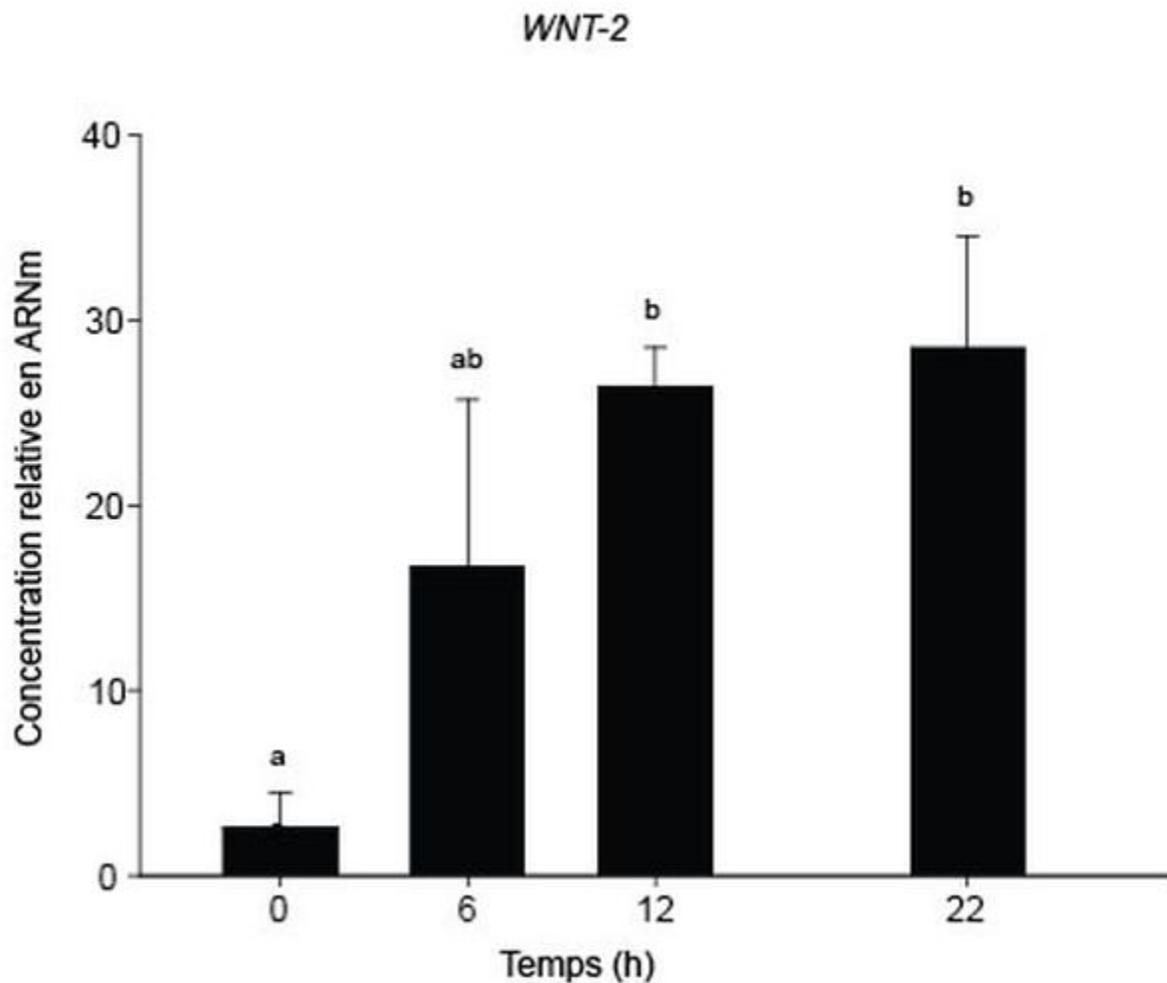


Figure 14: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-2 dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta Ct$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

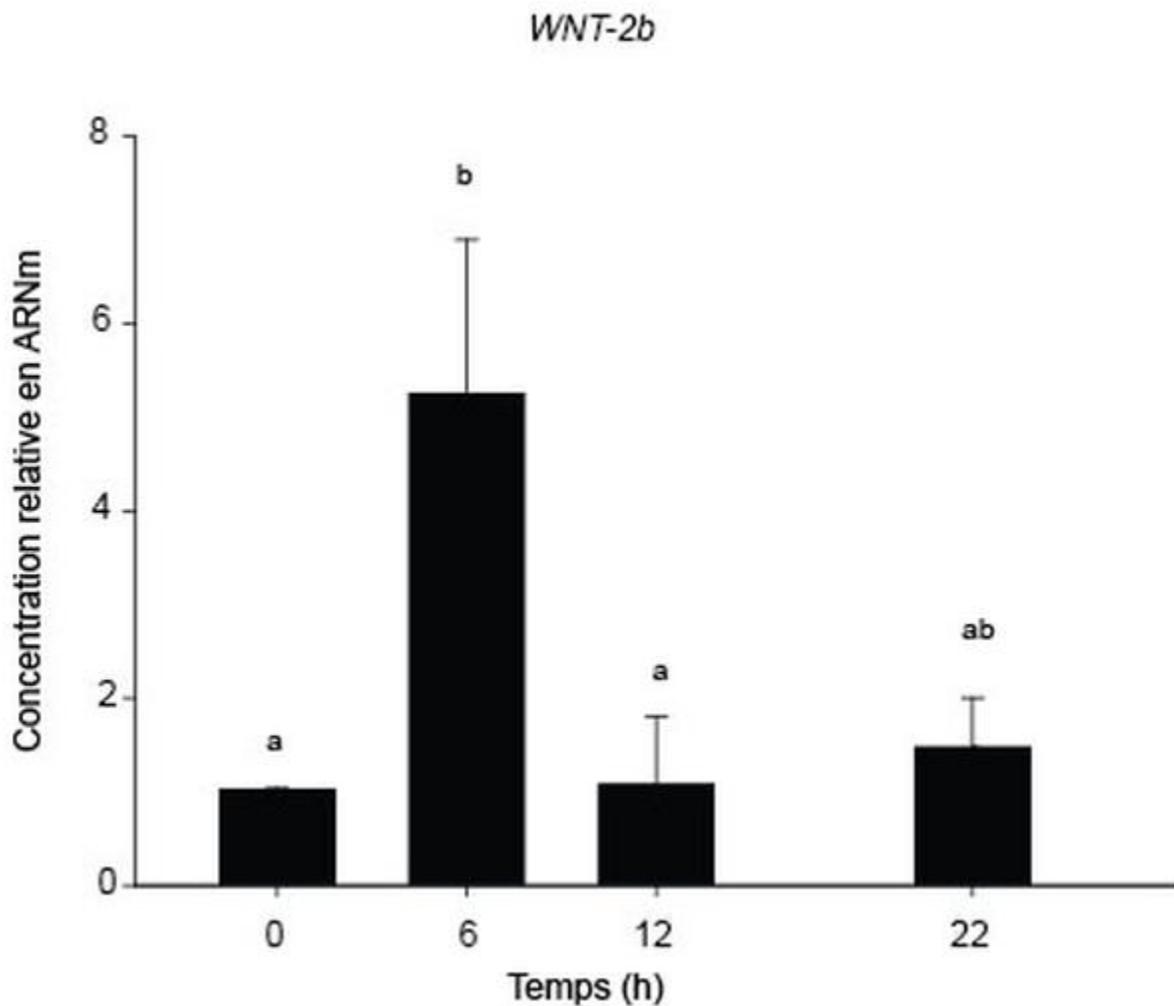


Figure 15: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-2b dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta C_t$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

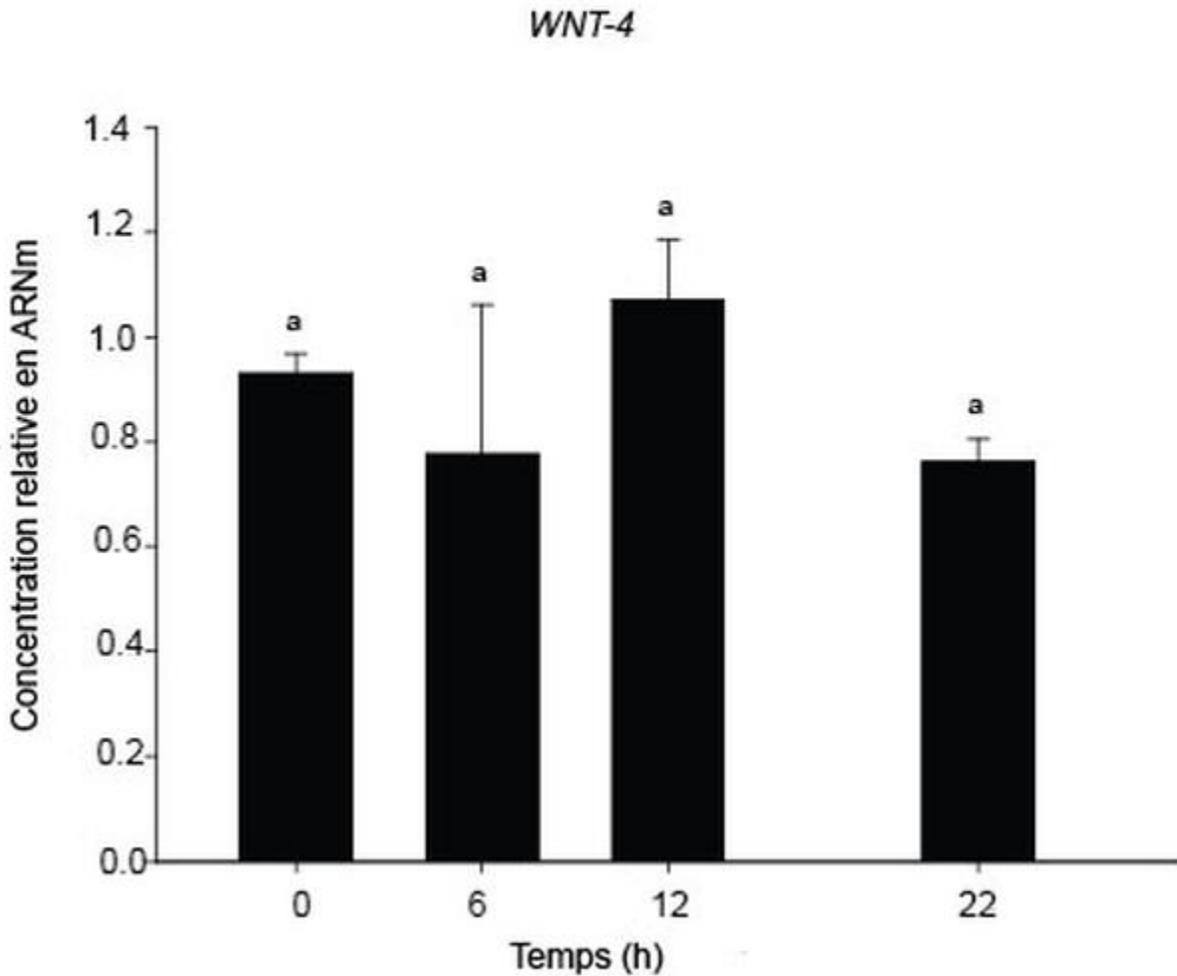


Figure 16: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-4 dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta Ct$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

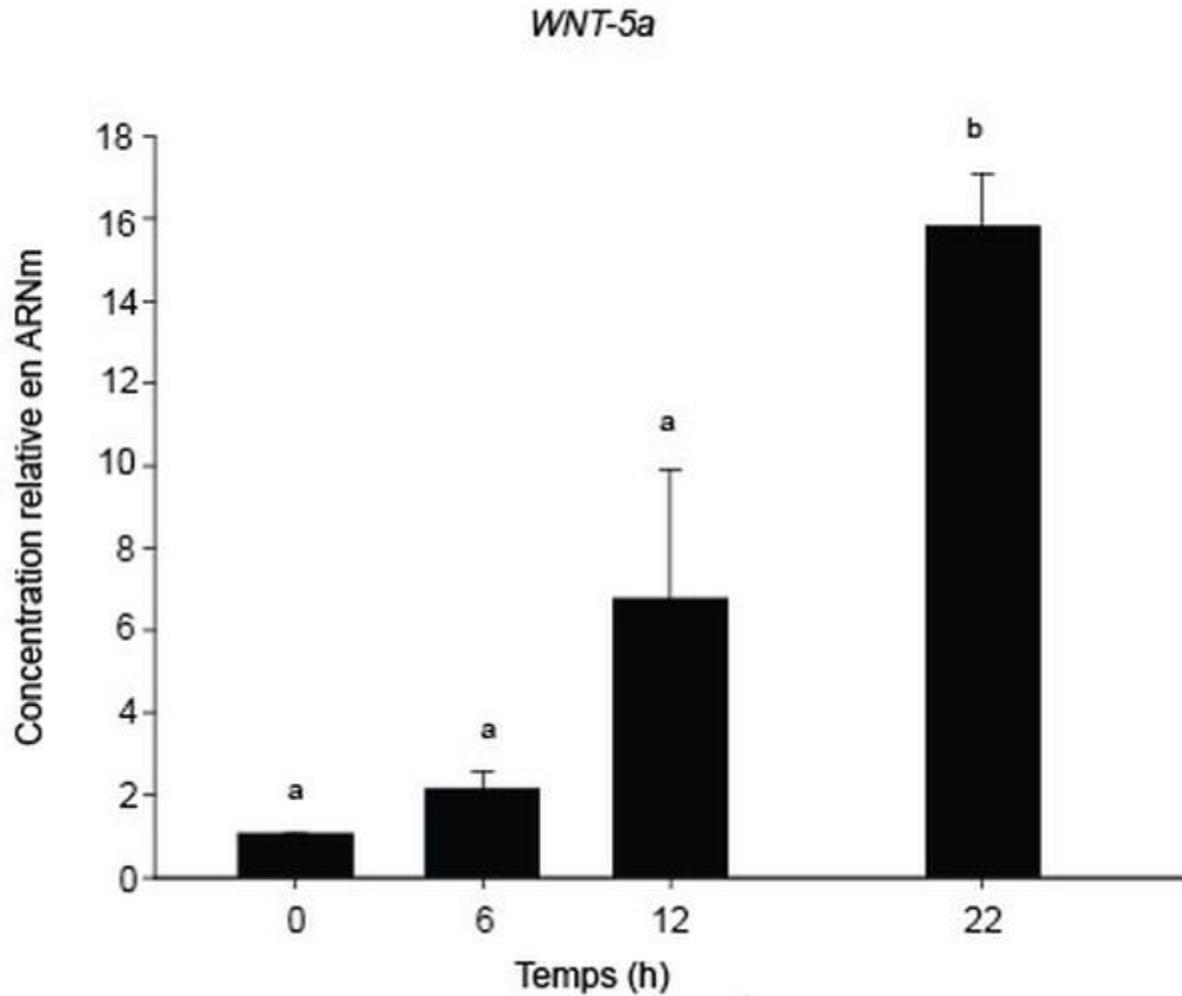


Figure 17: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-5a dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta C_t$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

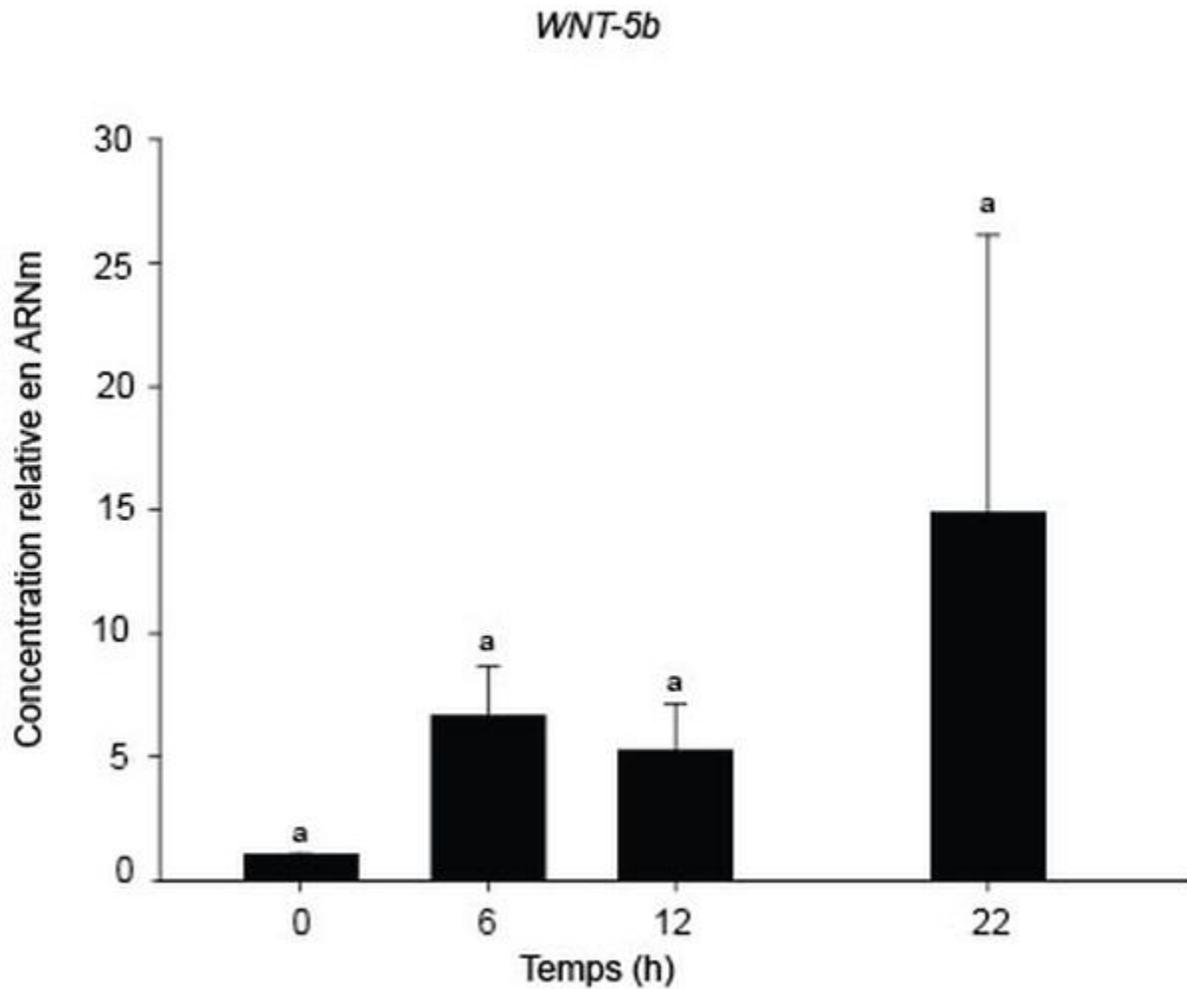


Figure 18: Abondance des ARNm codant pour quelques membres de la famille de WNT-5b) dans les cellules du cumulus après 0, 6, 12 et 22h de maturation. Les concentrations d'ARNm étaient mesurées par PCR en temps réel. Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes (\pm S.E.M) relatives à un échantillon de référence grâce à l'utilisation de la méthode $\Delta\Delta C_t$ avec une correction pour l'efficacité de l'amplification. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

4.2 WNT-2b joue un rôle dans la maturation du COC

Les COCs étaient exposés à un milieu de maturation comprenant EGF uniquement, WNT-2b uniquement ainsi qu'une association EGF et WNT-2b. Un milieu contenant du PBS mais sans aucun facteur de maturation servait de contrôle négatif. WNT-2b a été choisi au vu du graphe exprimant l'ARNm obtenue dans l'expérience 1 (figure 15). Ce graphe montre une augmentation brutale de la concentration relative en ARNm à 6h suivie d'une diminution rapide, laissant peut être supposer un rôle de WNT-2b dans le processus d'expansion. Pour chaque groupe, la maturation des COCs ($n=20$) était évaluée en tenant compte du pourcentage d'expansion du cumulus, de celui d'ovocytes ayant progressé dans le processus de méiose, de celui toujours arrêté au stade de vésicule germinale et enfin le pourcentage de COCs ayant dégénéré. Il était observé une différence statistiquement significative ($p<0.05$) dans le pourcentage de COCs atteignant le grade 3 (expansion totale ou presque totale des cellules du cumulus) entre le groupe de contrôle (0%) et les groupes traités à l'EGF (82%) et au Wnt2b (69%) alors qu'aucune différence n'était observée statistiquement entre les traitements à l'EGF et au Wnt2b (Figure 19). Les résultats se répètent de la même manière en ce qui concerne le pourcentage d'ovocytes atteignant la métaphase II (MII) (EGF= 61%, WNT-2b= 56% et contrôle= 25%) (Figure 20). Aucune différence statistiquement significative n'était observée en ce qui concerne le pourcentage de COCs restés au stade de vésicule germinale (EGF= 31%, WNT-2b= 40% et contrôle= 41%) (Figure 21). Des différences statistiquement significatives ($p<0.05$) étaient observées dans le pourcentage des ovocytes dégénérés entre le groupe

de contrôle et les groupes traités à l'EGF et au Wnt2b (EGF= 0.7%, WNT-2b= 2% et contrôle= 31%) (Figure 22). Aucune différence significative entre le traitement à l'EGF et celui au Wnt2b n'a été observée.

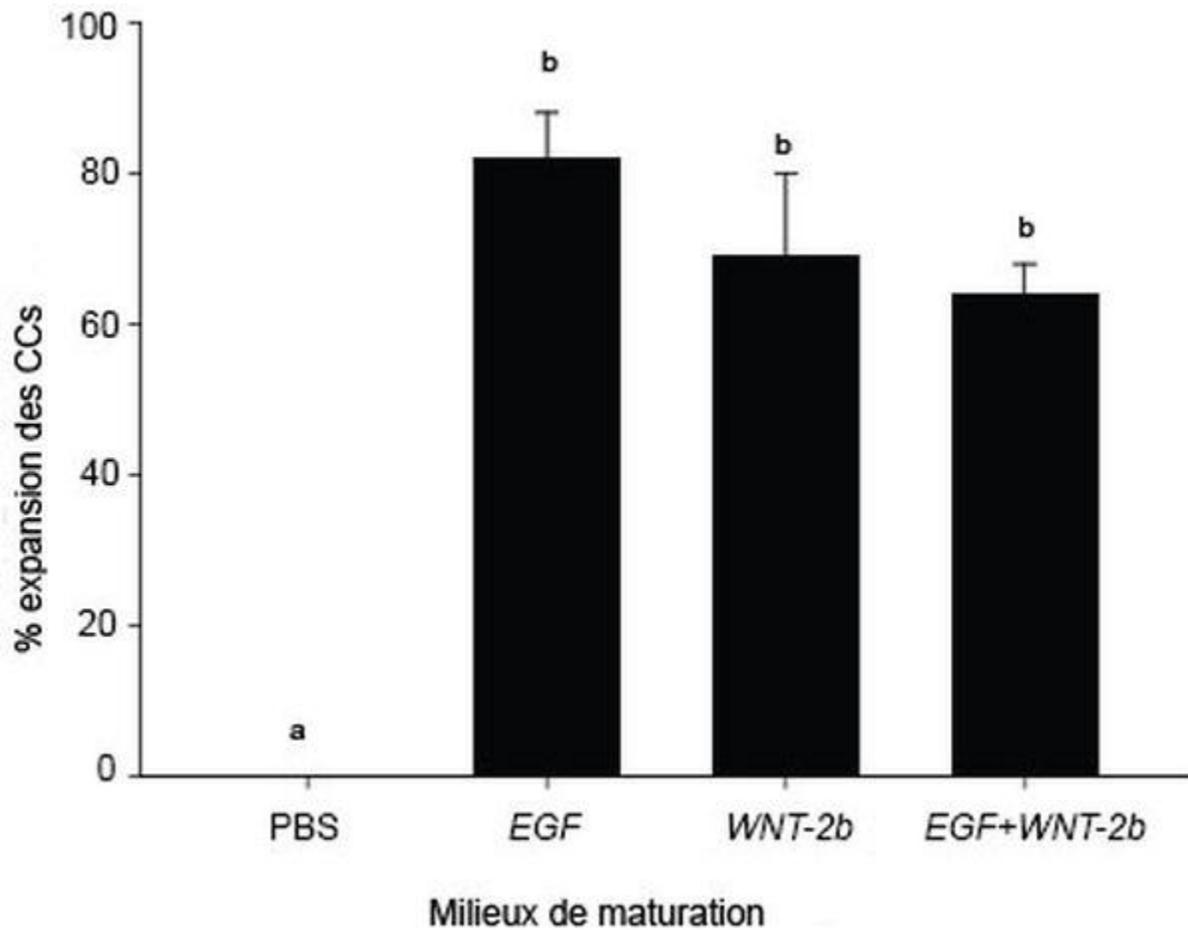


Figure 19: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur l'expansion des cellules du cumulus après 22h d'incubation. Les barres représentent le pourcentage des COCs ayant atteint le niveau 3 (expansion complète). Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

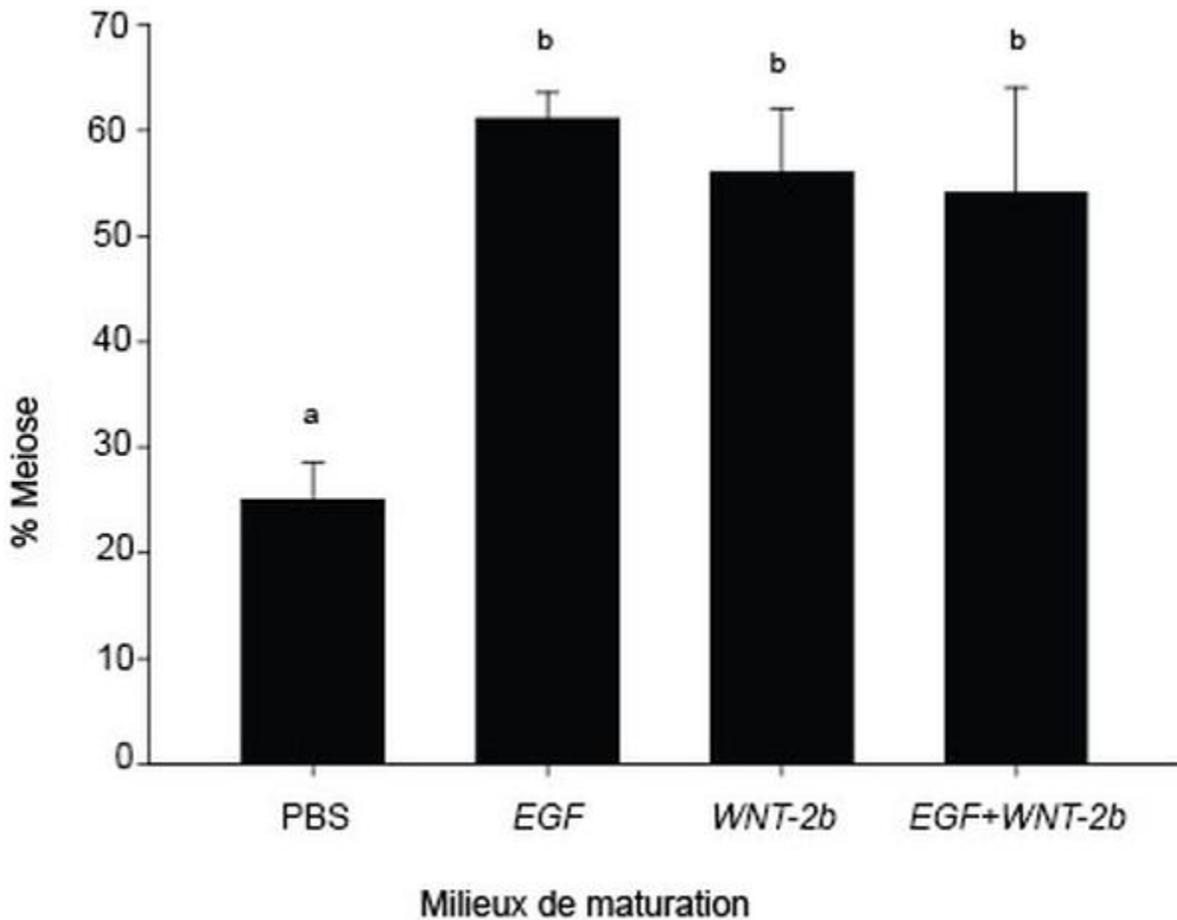


Figure 20: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur la progression dans le processus de méiose des ovocytes après 22h d'incubation. Les barres représentent le pourcentage des ovocytes ayant progressé vers la métaphase. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

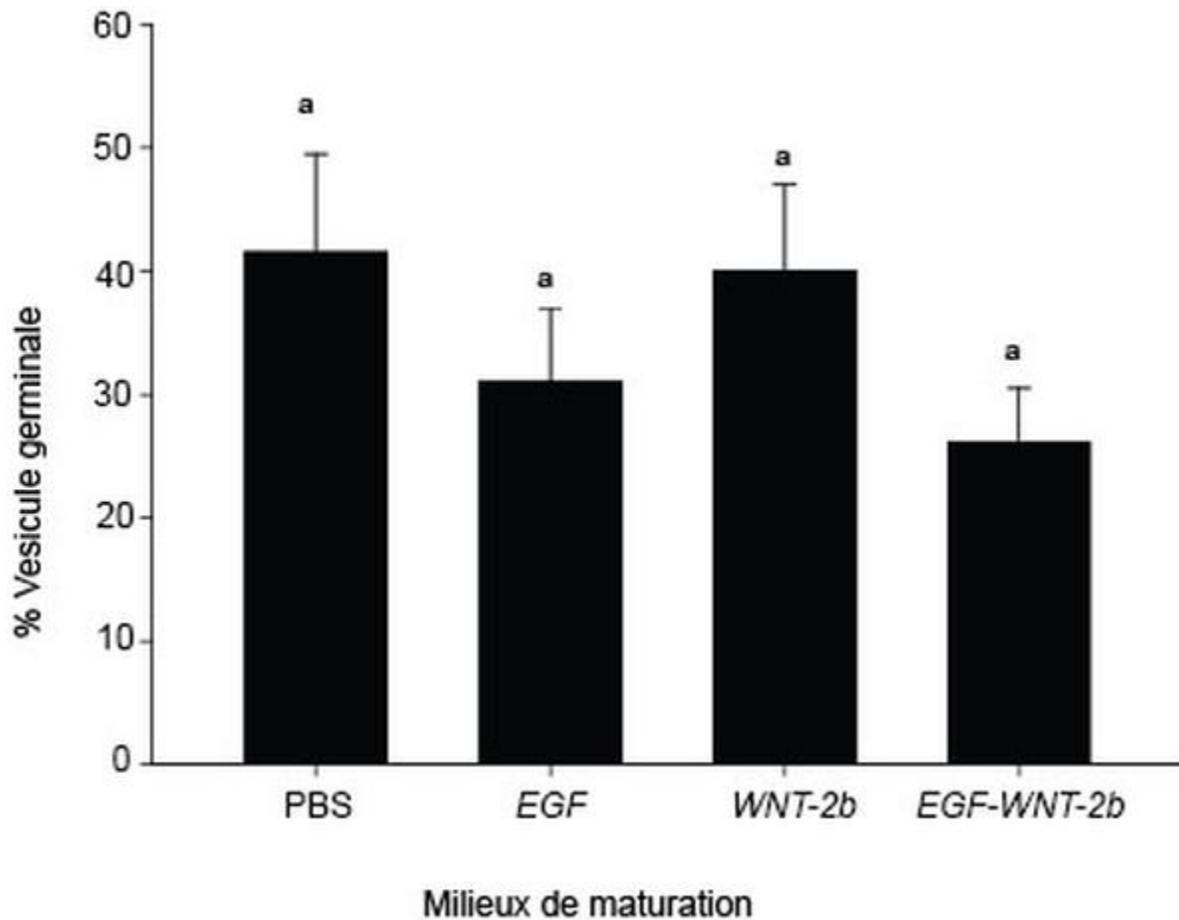


Figure 21: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur la persistance au stade de vésicule germinale des ovocytes après 22h d'incubation. Les barres représentent le pourcentage des ovocytes toujours au stade de vésicule germinale. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

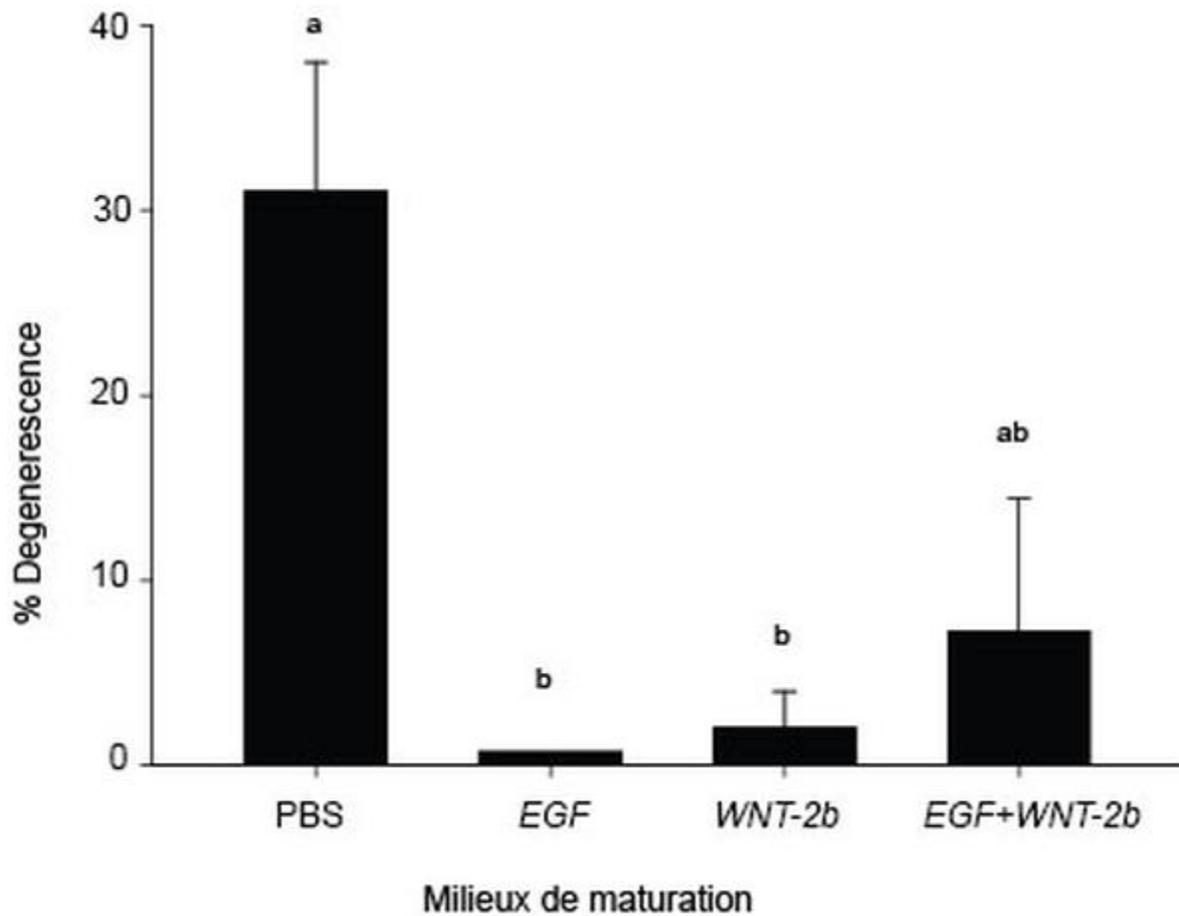


Figure 22: Effets de EGF, WNT-2b et de la combinaison des deux sur la dégénérescence des ovocytes après 22h d'incubation. Les barres représentent le pourcentage des ovocytes ayant dégénérés. Une différence statistiquement significative est observée lorsque les barres sont représentées avec des lettres différentes ($p < 0.05$). Les données ($n=20$) étaient obtenues à partir de trois réplicats.

Chapitre 5 - Discussion

Divers milieux ont été utilisés afin d'améliorer la compétence de l'ovocyte à atteindre la maturation *in vitro*. Downs (Downs, Dow, & Fagbohun, 1991) avait montré que la maturation ovocytaire était possible en l'absence de FSH malgré que les taux de maturation obtenus dans son étude restaient très faibles (inférieur ou égal à 30%) sans doute du fait du rôle limité des polymères (PVP, PVA) utilisés dans la composition du milieu de maturation. Le milieu utilisé pour notre étude était supplémenté avec un facteur de croissance (EGF) en l'absence d'hormones (FSH, LH ou E2) dans le but d'évaluer l'impact de ce facteur dans le processus de maturation ovocytaire chez la vache (Lonergan et al., 1996). Ce milieu ainsi créé nous a permis de confirmer que l'EGF stimulait l'expansion des cellules du cumulus et favorisait la maturation du noyau des ovocytes (Cevik, Sen, Kocyigit, Soydan, & Kuran, 2011; Lorenzo, Illera, Illera, & Illera, 1994). Les résultats obtenus dans notre expérimentation, bien que supérieurs à ceux publiés par Lorenzo et al. (Lorenzo et al., 1994), étaient en deçà des taux de maturation obtenus avec les milieux contenant des hormones (Farag et al., 2009; Hammam et al., 2010; Younis, Brackett, & Fayer-Hosken, 1989; Zuelke & Brackett, 1990). Plusieurs raisons incluant la température de conservation et de transport ou l'absence de sérum bovin dans le milieu de maturation pourraient expliquer la diminution du taux de maturation. En effet, entre le moment de la récupération des ovaires après l'abattage et le moment où les COCs sont obtenus par aspiration à notre laboratoire, les ovaires étaient conservés à la température ambiante et non entre 35 et 37°C (Caixeta et al., 2013). Notre argumentation était que la conservation des ovaires à la température ambiante supprimerait les

variations de températures qui seraient imposées aux ovocytes avant leur transfert dans le milieu maturation. Matsushita (Matsushita, Tani, Kato, & Tsunoda, 2004) montrait d'ailleurs que le stockage des ovaires de vache à 10°C pendant au moins 24 heures n'affectait en rien la compétence de l'ovocyte à atteindre la maturation, ni le potentiel de développement des embryons produits *in vitro* ou encore le transfert du noyau des cellules somatiques et ce, au moins jusqu'au stade de blastocyste. L'étude de Matsushita levait également le doute sur un éventuel impact négatif sur le taux de maturation causé par les variations de temps écoulé entre la récupération des ovaires et leur traitement.

Dans le milieu de maturation que nous avons utilisé, le FBS avait été remplacé par le BSA afin de réduire la possibilité d'interactions exercées par des composants non identifiés ou de contaminants présents dans le FBS. Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser de l'albumine purifiée à $\geq 96\%$ car la pureté de l'albumine pouvait influencer le taux de maturation (Downs et al., 1991). La substitution du FBS par le BSA pourrait expliquer les résultats que nous avons obtenus, les taux de maturation ovocytaires obtenus avec l'albumine étant inférieurs à ceux obtenus avec le FBS (Hammam et al., 2010; Leibfried-Rutledge, Critser, & First, 1986) bien que Britto (de Britto Velho et al., 2013) n'a pas trouvé de différence significative entre ces taux. Il aurait été souhaitable de tester notre système en utilisant un milieu de maturation classique (FSH et FBS) mais la difficulté à obtenir des ovaires de vache fut clairement un facteur limitant.

EGF stimule l'expression de certains gènes importants dans le processus d'expansion des cellules du cumulus *in vitro*. EGF est ainsi associé à l'augmentation de l'abondance des ARNm codant pour AREG et EREG. AREG et

EREG ont été décrits comme étant des facteurs de croissance *EGF-like* qui sont impliqués dans le processus d'ovulation en régulant l'expression de COX-2 chez l'humain (Fang, Cheng, Chang, Sun, & Leung, 2013). Le pic de COX-2 observé à 22h dans notre étude semble également le confirmer chez la vache. La sur-régulation de COX-2 aura pour effet la production de PGE₂, principale prostaglandine produite par CC qui, en agissant sur l'ovocyte relancerait le processus de méiose (Ashkenazi et al., 2005; Eppig, 1981).

Notre étude avait pour but de tester le rôle de quelques membres de la famille des WNTs dans la maturation du COC *in vitro* chez la vache. Le sujet n'ayant jamais été étudié auparavant, il a donc fallu dans un premier temps déterminer lesquels des WNTs seraient exprimés dans les cellules du cumulus chez la vache. L'ARNm qui code pour WNT-4 était exprimé durant les stades finaux du développement folliculaire chez la souris adulte (Boyer, Lapointe, et al., 2010). Ce membre de la famille des WNT serait également impliqué dans la gamétogenèse chez la femelle (Heikkilä et al., 2001) et aurait un rôle dans la sélection et le développement folliculaire tout comme dans la maturation chez l'humain (Jääskeläinen et al., 2010). WNT-4 jouerait également un rôle de prévention dans le développement du cancer de l'ovaire chez la femme (Cohen, Lee, Wilder, & Hamilton, 2005). La présence de d'ARNm codant pour WNT-4 avait été détectée à tous les stades de notre expérimentation. Il n'y avait pas de différence quant à l'abondance d'ARNm pour WNT-4 quel que soit le stade de maturation. L'ARNm codant pour le WNT2 et le WNT-5a était également présent à tous les stades mais son expression augmentait progressivement pour atteindre un pic à 22h. Chez la souris, WNT-2 est exprimé dans les cellules de la granulosa où il interviendrait dans leur prolifération (Lapointe & Boerboom, 2010) mais à ce

jour, aucune publication ne précise le rôle éventuel de WNT-5a. Chez la vache, les rôles de WNT-2 et de WNT-5a ne sont toujours pas déterminés mais une étude sur leur expression vis-à-vis de celle des gènes associés avec l'expansion du cumulus (Ptx3, Tnfaip6) et de la maturation de l'ovocyte (Bmp15, Gdf9) pourrait être un préliminaire quant à leur rôle effectif dans le processus de maturation du COC.

Nous avons détecté la présence d'ARNm codant pour WNT-2b, ce qui n'avait jamais encore été démontré dans les cellules du cumulus, WNT-2b étant connu pour jouer un rôle dans le processus de gastrulation et dans l'organogenèse chez l'homme, la souris et la poule (Ashkenazi et al., 2005; Cho & Cepko, 2006; Tsukiyama & Yamaguchi, 2012). Le WNT-2b a également été impliqué dans la prolifération de métastases du cancer de l'ovaire chez la femme ainsi que dans la résistance des traitements médicaux suite à son hyper-expression (Arend, Londoño-Joshi, Straughn Jr, & Buchsbaum, 2013; Wang et al., 2012). Sa présence a été détectée dans l'ovaire de ratte mais aucune expression n'a été enregistrée au niveau des cellules de la granuleuse ou de l'ovocyte (Ricken, Lochhead, Kontogiannea, & Farookhi, 2002). Dans notre étude, l'abondance de l'ARNm de WNT-2b augmentait rapidement après la mise en culture des COCs, atteignant son maximum à 6 h de culture. Ceci suggère que ce WNT pourrait jouer un rôle dans le processus d'expansion du cumulus et de la maturation de l'ovocyte.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mis les COCs en culture avec l'EGF ou le WNT2b. À notre surprise, le WNT2b seul induisait l'expansion du cumulus et la maturation des ovocytes. Il n'agit pas en synergie avec EGF parce que la présence de WNT2b n'affectait pas l'effet de l'EGF. Cette étude est, à notre

connaissance, la première à montrer une implication directe des WNTs dans le processus de maturation *in vitro* du COC chez la vache.

Les ligands WNTs exercent leur effet par l'intermédiaire de trois voies principales de signalisation intracellulaire : la voie canonique ou Wnt/ β caténine, la voie PCP (*Planar cell polarity*) et voie calcique (Boerboom et al., 2005; Miller, 2002). Ces voies appartiennent à deux catégories: la canonique ou la non canonique avec comme différence, l'implication ou non de β -caténine. La voie canonique nécessite la présence de β -caténine pour être activée alors que la présence de cette protéine n'est pas indispensable dans la voie non canonique (Arend et al., 2013). L'utilisation d'une de ces voies va se faire en fonction du type cellulaire, du type de récepteur membranaire présent à la surface et du ligand lui-même. Il est toutefois communément admis que la voie canonique est la plus fréquemment associée aux ligands WNTs (Binet, 2011). Dans le cancer de l'ovaire, WNT2b emprunte principalement la voie canonique en activant la β -caténine (Arend et al., 2013) mais le rôle de cette protéine dans les processus d'expansion et maturation ovocytaire reste mal connu. La β -caténine a été détectée dans les cellules du cumulus (Wang et al., 2009), et curieusement une augmentation de l'activité de β -caténine inhibait la maturation ovocytaire chez la souris (Fan et al., 2010) et le porc (Spate et al., 2014). Il reste à déterminer le mécanisme d'action du WNT2b sur le COC bovin.

Étude future

Les ligands WNTs contrôlent de nombreux processus biologiques comme l'embryogenèse mais aussi troubles du développement et des cancers. Ils

exercent leurs effets par l'intermédiaire de deux voies de communication: la voie canonique et la voie non canonique. Parmi les cibles de la voie canonique les plus étudiées, l'on peut citer MYC, CCND1, FGF20, WISP1, JAG1, DKK1 et GCG alors que celles concernant la voie non canonique incluent JNK, ROCK, PKC, MAP3K7 et NFAT (Saha, 2012). Nous nous proposons d'explorer les voies intracellulaires empruntées par WNT-2b en regard de la maturation du COC chez la vache grâce à l'utilisation du Western Blot. En effet, l'action du WNT va entraîner soit une augmentation de β -caténine (voie canonique) soit une augmentation de l'activité de CAMKII ou de JUNK (voie non canonique) dont nous pourrions évaluer l'importance grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. L'expérimentation sera effectuée en deux étapes :

Étape 1 : Elle consistera à identifier dans un premier temps la voie potentielle d'activation de WNT-2b. Pour ce faire, les COCs, par groupe de 20 et en présence de Wnt-2b seront mis en culture dans le milieu de maturation pendant 22h à 37.8°C dans une atmosphère de 5% de CO₂. A l'issue du processus de maturation, les CCs seront séparées des ovocytes et les protéines extraites. Afin de déterminer laquelle des trois voies principales a été potentiellement activée dans le processus de maturation, un Western Blot va être effectué. Il permettra de mesurer l'activation des protéines. Pour la voie canonique, l'on mesurera la forme active et totale de la β caténine, pour la voie calcique, la forme phosphorylée (P-CAMKII) et la forme totale de CAMKII seront mesurées. Pour la voie PCP, les formes phosphorylées (P-JNK) et totales de JNK ainsi que les formes phosphorylées (P-cJUN) et totales de cJUN seront mesurées. β actine sera mesurée comme protéine de référence.

Étape 2 : une fois qu'une voie a été reconnue comme étant la voie potentielle d'activation de WNT-2b, il s'agira de le confirmer. Un inhibiteur de la protéine à inactiver sera dans un alors ajouté à la culture de COC. Après un temps déterminé le WNT-2b y sera incorporé. Dans le cas où la voie supposée était bien la voie réelle, l'effet physiologique recherché (expansion du COC) ne sera pas observée.

Les inhibiteurs utilisés pour la voie canonique seront XAV 939 (Tocris) et PKF 118-310 (Calbiochem) (Voronkov & Krauss, 2012); un effet sur cJUN pourra être obtenu à deux niveaux : (1) en amont de JNK, par inactivation de Rac1 avec l'utilisation de NSC 23766 (Santa Cruz Biotechnology) (Zhu et al., 2013) ou (2) par une inhibition directe de JNK grâce à l'utilisation de SP600125 (Santa Cruz Biotechnology) (Ge et al., 2009). Un effet inhibiteur sur Ca²⁺ pourra être obtenu grâce à l'utilisation de GF109203X (Tocris) pour l'inhibition de PKC et KN35 (Tocris) pour l'inhibition de CAMKII.

Les données seront obtenues à partir d'au moins trois réplicats. Il sera également indispensable de prévoir un groupe de contrôle (non traité).

Conclusion

Notre étude représente la première tentative visant à identifier des membres de la famille des WNTs impliqués dans le processus de maturation du complexe cumulus ovocytaire chez la vache. Elle montre l'implication de WNT-2b dans le processus et pour la première fois, nous sommes en mesure de montrer que le WNT-2b était capable de provoquer la maturation du COC bovin. Cette étude mériterait d'être approfondie afin de pouvoir mettre en valeur les mécanismes par lesquels le WNT-2b exprime son action sur le COC.

Références

- Adams, G., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, *69*(1), 72-80.
- Adams, G., Singh, J., & Baerwald, A. (2012). Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology*, *78*(8), 1733-1748.
- Aerts, J., & Bols, P. (2010a). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in domestic animals*, *45*(1), 171-179.
- Aerts, J., & Bols, P. (2010b). Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in domestic animals*, *45*(1), 180-187.
- Andric, N., & Ascoli, M. (2008). The luteinizing hormone receptor-activated extracellularly regulated kinase-1/2 cascade stimulates epiregulin release from granulosa cells. *Endocrinology*, *149*(11), 5549-5556.
- Arend, R. C., Londoño-Joshi, A. I., Straughn Jr, J. M., & Buchsbaum, D. J. (2013). The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: A review. *Gynecologic oncology*, *131*(3), 772-779.
- Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., & Tsafiriri, A. (2005). Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*, *146*(1), 77-84.
- Bao, B., & Garverick, H. A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of animal science*, *76*(7), 1903-1921.
- Beg, M., & Ginther, O. (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, *132*(3), 365-377.
- Ben-Ami, I., Freimann, S., Armon, L., Dantes, A., Strassburger, D., Friedler, S., . . . Amsterdam, A. (2006). PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Molecular human reproduction*, *12*(10), 593-599.
- Binet, R. (2011). *Identification et Caractérisation d'un Nouveau Marqueur de la Sénescence Cellulaire : la Protéine WNT16B*. (Université de Grenoble, France). Repéré à <https://tel.archives->

ouvertes.fr/file/index/docid/604466/filename/Binet_Romuald_2011_Archivage.pdf

- Boerboom, D., Paquet, M., Hsieh, M., Liu, J., Jamin, S. P., Behringer, R. R., . . . Richards, J. S. (2005). Misregulated Wnt/ β -catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development. *Cancer research*, *65*(20), 9206-9215.
- Boyer, A., Goff, A. K., & Boerboom, D. (2010). WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(1), 25-32.
- Boyer, A., Lapointe, É., Zheng, X., Cowan, R. G., Li, H., Quirk, S. M., . . . Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *The FASEB Journal*, *24*(8), 3010-3025.
- Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of reproduction and fertility*, *109*(1), 165-171.
- Bridges, P., & Fortune, J. (2007). Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. *Molecular and cellular endocrinology*, *263*(1), 1-9.
- Bridges, P., Komar, C., & Fortune, J. (2006). Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F $_{2\alpha}$ in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology*, *147*(10), 4713-4722.
- Brisken, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S. K., . . . Weinberg, R. A. (2000). Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes & development*, *14*(6), 650-654.
- Caixeta, E. S., Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Price, C. A., Machado, M. F., . . . Buratini, J. (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. *Reproduction*, *146*(1), 27-35.
- Cevik, M., Sen, U., Kocyigit, A., Soydan, E., & Kuran, M. (2011). Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol 17-beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, *17*(6), 1009-1014.
- Chen, L., Russell, P., & Larsen, W. (1993). Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic

- acid within the cumulus mass. *Molecular reproduction and development*, 34(1), 87-93.
- Cho, S.-H., & Cepko, C. L. (2006). Wnt2b/ β -catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development*, 133(16), 3167-3177.
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205.
- Cohen, E. D., Lee, H.-O., Wilder, E. L., & Hamilton, T. C. (2005). Elucidating the roles of Wnt2b, Wnt4 and Wnt5a in ovarian cancer. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 2005(1), 671.
- Curry, T. E., & Smith, M. F. (2006). *Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition*. Communication présentée Seminars in reproductive medicine.
- de Britto Velho, F. A., da Costa, B. G., Alcoba, D. D., da Rosa Braga, B. L., Monroy, N. L. S., de Oliveira, A. T. D., & Lopes, R. F. F. (2013). Gene Expression and In Vitro Nuclear Maturation in Bovine Cumulus Oocyte Complexes Matured in a Medium Supplemented with Bovine Fetal Serum or Bovine Serum Albumin. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41.
- DiZerega, G. S., & Hodgen, G. D. (1981). Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocrine reviews*, 2(1), 27-49.
- Downs, S. M., Dow, M. P., & Fagbohun, C. F. (1991). The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. *Journal of Experimental Zoology*, 258(3), 373-383.
- Driancourt, M. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.
- Driancourt, M., & Cahill, L. (1984). Preovulatory follicular events in sheep. *Journal of reproduction and fertility*, 71(1), 205-211.
- Drion, P. V., Beckers, J. F., Ectors, F. J., Hanzen, C., Houtain, J. Y., & Lonergan, P. (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1 . Folliculogénèse et atresie. *Le Point Veterinaire*, 28(1996), 11.
- Eppig, J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'Brien, M., Pendola, F., Watanabe, S., & Wigglesworth, K. (1997). Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(11 Suppl), 127-132.

- Eppig, J. J. (1981). Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod*, 25(1), 191-195.
- Eppig, J. J., O'Brien, M., & Wigglesworth, K. (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular reproduction and development*, 44(2), 260-273.
- Erickson, B. (1966a). Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 11(1), 97-105.
- Erickson, B. (1966b). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, 25(3), 800-805.
- Espey, L. L. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biology of Reproduction*, 22(1), 73-106.
- Espey, L. L., & Richards, J. S. (2002). Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. *Biology of reproduction*, 67(6), 1662-1670.
- Fair, T., Hyttel, P., & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular reproduction and development*, 42(4), 437-442.
- Fan, H.-Y., O'Connor, A., Shitanaka, M., Shimada, M., Liu, Z., & Richards, J. S. (2010). β -Catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Molecular Endocrinology*, 24(8), 1529-1542.
- Fang, L., Cheng, J.-C., Chang, H.-M., Sun, Y.-P., & Leung, P. C. (2013). EGF-like Growth Factors Induce COX-2-Derived PGE2 Production Through ERK1/2 in Human Granulosa Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(12), 4932-4941.
- Farag, I., Girgis, S., Khalil, W., Hassan, N., Sakr, A., Allah, S. A., & Ali, N. (2009). Effect of hormones, culture media and oocyte quality on in vitro maturation of Egyptian Sheep oocytes. *J Appl Biosci*, 24, 1520-1534.
- Fortune, J. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, 50(2), 225-232.
- Fortune, J., Cushman, R., Wahl, C., & Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and cellular endocrinology*, 163(1), 53-60.
- Fortune, J., Rivera, G., & Yang, M. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, 82, 109-126.

- Fortune, J. E., Yang, M. Y., & Muruvi, W. (2010). In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 15-22.
- Ge, X., Ma, X., Meng, J., Zhang, C., Ma, K., & Zhou, C. (2009). Role of Wnt-5A in interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase expression in rabbit temporomandibular joint condylar chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 60(9), 2714-2722.
- Gilbert, I. (2011). *Etude de l'expression génique dans les cellules de la granulosa bovine durant la période préovulatoire*. (Université de Laval). Repéré à www.theses.ulaval.ca/2011/28113/28113.pdf
- Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14(2), 159-177. doi: 10.1093/humupd/dmm040
- Ginther, O., Kot, K., Kulick, L., & Wiltbank, M. (1997). Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, 48(1), 75-87.
- Gong, J., Bramley, T., & Webb, R. (1993). The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of reproduction and fertility*, 97(1), 247-254.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. CABI.
- Guerrero Netro, H. M. (2013). *Differential regulation of early response genes by fibroblast growth factor (fgf) 8 and fgf18 in bovine granulosa cells in vitro*. (Université de Montréal). Repéré à https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10583/Guerrero_Netro_Hilda_Morayma_2013_memoire.pdf?sequence=2
- Hammam, A., Whisnant, C., Elias, A., Zaabel, S., Hegab, A., & Abu-El Naga, E. (2010). Effect of media, sera and hormones on in vitro maturation and fertilization of water buffaloes (*bubalus bubalis*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(1), 27-31.
- Hanzen, C. (1995). *Etude des facteurs de risque de l'infertilité et des pathologies puerpérales et du postpartum chez la vache laitière et la vache viandeuse*. (Université de Liège).
- Hasler, J., Henderson, W., Hurtgen, P., Jin, Z., McCauley, A., Mower, S., . . . Trimmer, S. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1), 141-152.
- Heikkilä, M., Peltoketo, H., & Vainio, S. (2001). Wnts and the female reproductive system. *Journal of Experimental Zoology*, 290(6), 616-623.

- Heikkilä, M., Prunskaitė, R., Naillat, F., Itäranta, P., Vuoristo, J., Leppäluoto, J., . . . Vainio, S. (2005). The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology*, *146*(9), 4016-4023.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, *407*(6805), 770-776.
- Hirao, Y. (2011). Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. *Animal Science Journal*, *82*(2), 187-197.
- Hoppler, S., & Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *Journal of cell science*, *120*(3), 385-393.
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., . . . Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and cellular biology*, *27*(5), 1914-1924.
- Hsueh, A. J., Billig, H., & Tsafiriri, A. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process*. *Endocrine Reviews*, *15*(6), 707-724.
- Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*, *11*(2), 162-178.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, *47*(1), 23-32.
- Irving-Rodgers, H. F., Van Wezel, I., Mussard, M., Kinder, J., & Rodgers, R. J. (2001). Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction*, *122*(5), 761-775.
- Jääskeläinen, M., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Naillat, F., Parviainen, H., Anttonen, M., Heikinheimo, M., . . . Vaskivuo, T. E. (2010). WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Molecular and cellular endocrinology*, *317*(1), 106-111.
- Jeays-Ward, K., Hoyle, C., Brennan, J., Dandonneau, M., Alldus, G., Capel, B., & Swain, A. (2003). Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*, *130*(16), 3663-3670.
- Knight, P. G., & Glister, C. (2003). Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal reproduction science*, *78*(3), 165-183.
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, *132*(2), 191-206.

- Ko, J., Kastelic, J., Del Campo, M., & Ginther, O. (1991). Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *Journal of reproduction and fertility*, 91(2), 511-519.
- Kühl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C., & Moon, R. T. (2000). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12701-12711.
- Lafky, J. M., Wilken, J. A., Baron, A. T., & Maihle, N. J. (2008). Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1785(2), 232-265.
- Lapointe, É. (2012). *Régulation de la fonction ovarienne par la voie de signalisation des WNTs*. (Université de Montreal). Repéré à <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/8924>
- Lapointe, E., & Boerboom, D. (2010). WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 3, 276-285.
- Lavoir, M., & Fortune, J. (1990). Follicular dynamics in heifers after injection of PGF_{2α} during the first wave of follicular development. *Theriogenology*, 33(1), 270.
- Leibfried-Rutledge, M., Critser, E., & First, N. (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of reproduction*, 35(4), 850-857.
- Liu, C.-F., Liu, C., & Yao, H. H.-C. (2010). Chapter Seven-Building Pathways for Ovary Organogenesis in the Mouse Embryo. *Current topics in developmental biology*, 90, 263-290.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., & Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature genetics*, 22(4), 361-365.
- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 781-810.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H., & Mermillod, P. (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biology of reproduction*, 54(6), 1420-1429.
- Lorenzo, P., Illera, M., Illera, J., & Illera, M. (1994). Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro

- by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of reproduction and fertility*, 101(3), 697-701.
- Lucy, M. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of animal science*, 85(13 suppl), E89-E99.
- Mapletoft, R. J. (2012). Perspectives on Bovine Embryo Transfer. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 24, 10.
- Matsushita, S., Tani, T., Kato, Y., & Tsunoda, Y. (2004). Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal reproduction science*, 84(3), 293-301.
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178-2180.
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles 1. *Endocrine reviews*, 21(2), 200-214.
- McMahon, A. P., & Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62(6), 1073-1085.
- McNatty, K., Reader, K., Smith, P., Heath, D., & Juengel, J. (2006). Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 55-68.
- Mihm, M., Austin, E., Good, T., Ireland, J., Knight, P., Roche, J., & Ireland, J. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of reproduction*, 63(3), 811-819.
- Miller, C., Degenhardt, K., & Sassoon, D. A. (1998). Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nature genetics*, 20(3), 228-230.
- Miller, J. R. (2002). The wnts. *Genome Biol*, 3(1), 1-15.
- Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., . . . Uzbekova, S. (2009). Ovarian follicular development and ovulation in mammals. *INRA Productions Animales*, 22(2), 59-76.
- Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clement, F., Bosc, M., Pisselet, C., . . . Mariana, J. (1996). Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 51, 3-23.

- Motola, S., Cao, X., Ashkenazi, H., Popliker, M., & Tsafri, A. (2006). GnRH actions on rat preovulatory follicles are mediated by paracrine EGF-like factors. *Molecular reproduction and development*, 73(10), 1271-1276.
- Nivet, A.-L. (2014). *La voie génomique de la qualité ovocytaire chez la vache et chez la femme*. (Université de Laval). Repéré à www.theses.ulaval.ca/2014/30498/30498.pdf
- Nusse, R., & 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. *Cell*, 31(1), 99-109.
- Ny, T., Wahlberg, P., & Brändström, I. J. (2002). Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Molecular and cellular endocrinology*, 187(1), 29-38.
- Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., & Conti, M. (2008). Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Molecular endocrinology*, 22(4), 924-936.
- Parr, B. A., & McMahon, A. P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, 395(6703), 707-710.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Portela, V. M., Zamberlam, G., Gonçalves, P. B., de Oliveira, J. F., & Price, C. A. (2011). Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. *Biology of reproduction*, 85(6), 1167-1174.
- Quirk, S., Cowan, R., Harman, R., Hu, C.-L., & Porter, D. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *Journal of animal science*, 82(13 suppl), E40-E52.
- Ricken, A., Lochhead, P., Kontogianna, M., & Farookhi, R. (2002). Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology*, 143(7), 2741-2749.
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*, 139(2), 309-318.
- Rüsse, I. (1983). Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca anatomica*, 24, 77.

- Russell, D. L., & Robker, R. L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Human reproduction update*, 13(3), 289-312.
- Scaramuzzi, R., Baird, D., Campbell, B., Driancourt, M.-A., Dupont, J., Fortune, J., . . . McNeilly, A. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 444-467.
- Sedes, L. (2014). *Voie de signalisation et gènes cibles de l'AMH dans le tractus génital femelle*. (Universite Paris Sud, France). Repéré à https://tel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/989662/filename/VA_SEDES_LAURIANE_0304_2014.pdf
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., & Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37.
- Sirard, M.-A., & Coenen, K. (2006). In vitro maturation and embryo production in cattle (*Nuclear Transfer Protocols* (p. 35-42): Springer.
- Sirard, M., Florman, H., Leibfried-Rutledge, M., Barnes, F., Sims, M., & First, N. (1989). Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of reproduction*, 40(6), 1257-1263.
- Sirois, J., & Fortune, J. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, 39(2), 308-317.
- Sirois, J., & Fortune, J. (1990). Lengthening the Bovine Estrous Cycle with Low Levels of Exogenous Progesterone: A Model for Studying Ovarian Follicular Dominance*. *Endocrinology*, 127(2), 916-925.
- Sirois, J., & Richards, J. S. (1992). Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Journal of Biological Chemistry*, 267(9), 6382-6388.
- Sirois, J., Sayasith, K., Brown, K. A., Stock, A. E., Bouchard, N., & Doré, M. (2004). Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human reproduction update*, 10(5), 373-385.
- Sirotkin, A. V. (2011). Growth factors controlling ovarian functions. *Journal of cellular physiology*, 226(9), 2222-2225.
- Spate, L. D., Brown, A. N., Redel, B. K., Whitworth, K. M., Murphy, C. N., & Prather, R. S. (2014). Dickkopf-Related Protein 1 Inhibits the WNT Signaling Pathway and Improves Pig Oocyte Maturation. *PloS one*, 9(4), e95114.

- Tsukiyama, T., & Yamaguchi, T. P. (2012). Mice lacking Wnt2b are viable and display a postnatal olfactory bulb phenotype. *Neuroscience letters*, 512(1), 48-52.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405-409.
- Vanderhyden, B., Cohen, J., & Morley, P. (1993). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 133(1), 423-426.
- Vanderhyden, B., Telfer, E., & Eppig, J. (1992). Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biology of reproduction*, 46(6), 1196-1204.
- Voronkov, A., & Krauss, S. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Current pharmaceutical design*, 19(4), 634.
- Wang, H.-X., Li, T. Y., & Kidder, G. M. (2010). WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biology of reproduction*, 82(5), 865-875.
- Wang, H.-X., Tekpetey, F. R., & Kidder, G. M. (2009). Identification of Wnt/ β -catenin signaling pathway components in human cumulus cells. *Molecular human reproduction*, 15(1), 11-17.
- Wang, H., Fan, L., Xia, X., Rao, Y., Ma, Q., Yang, J., . . . Huang, X. (2012). Silencing Wnt2B by siRNA interference inhibits metastasis and enhances chemotherapy sensitivity in ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 22(5), 755-761.
- Weber-Hall, S. J., Phippard, D. J., Niemeyer, C. C., & Dale, T. C. (1994). Developmental and hormonal regulation of Wnt gene expression in the mouse mammary gland. *Differentiation*, 57(3), 205-214.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., . . . Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448-452.
- Wolfsberg, T. G., Primakoff, P., Myles, D. G., & White, J. M. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *The Journal of cell biology*, 131(2), 275-278.
- Yamashita, Y., & Shimada, M. (2012). The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. *Journal of Reproduction and Development*, 58(5), 510-514.

- Younis, A., Brackett, B., & Fayer-Hosken, R. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete research*, 23(2), 189-201.
- Zamberlam, G. d. O. (2013). *The involvement of nitric oxide in bovine follicular development and ovulation*. (Universite de Montreal). Repéré à https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10517/Zamberlam_Gustavo_2013_these.pdf?sequence=6
- Zhang, K., Hansen, P. J., & Ealy, A. D. (2010). Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction*, 140(6), 815-826.
- Zhu, S., Lu, P., Liu, H., Chen, P., Wu, Y., Wang, Y., . . . Heng, B. C. (2013). Inhibition of Rac1 activity by controlled release of NSC23766 from chitosan microspheres effectively ameliorates osteoarthritis development in vivo. *Annals of the rheumatic diseases*, annrheumdis-2013-203901.
- Zuelke, K. A., & Brackett, B. (1990). Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of reproduction*, 43(5), 784-787.