

## La maturation de l'ovocyte de mammifères

Pascal Mermillod  
Réjane Marchal

L'ovocyte est, à bien des points de vue, une cellule très spéciale. Sa maturation constitue l'étape finale d'une longue évolution qui lui permettra d'assumer avec succès la fécondation et le développement du jeune embryon. Cette maturation fait suite à une préparation du cytoplasme ovocytaire qui se déroule progressivement au cours de la folliculogénèse. Depuis la naissance et jusqu'au jour incertain précédant son ovulation (ce qui peut représenter un délai de plusieurs dizaines d'années), le noyau de l'ovocyte reste bloqué au stade de vésicule germinale (en prophase méiotique), grâce à un système d'inhibition intrafolliculaire. Il ne reprend sa méiose que si, ayant accompli avec succès sa croissance au sein d'un follicule destiné à l'ovulation, il reçoit finalement le signal libérateur des hormones gonadotropes. L'étude de certains mécanismes régulateurs impliqués dans les différentes étapes de la vie de l'ovocyte permettent de tirer quelques enseignements pour la mise en œuvre des techniques de maturation *in vitro*.

**A** l'heure du clonage par transfert de noyau, l'ovocyte arrive naturellement au-devant de la scène. La naissance de la brebis Dolly souligne l'importance du cytoplasme ovocytaire dans la programmation du développement embryonnaire (*m/s* 1997, n° 3, p. 426). Cette puissance cytoplasmique, capable de commander à un noyau différencié de repartir dans un cycle de développement embryonnaire, est le fruit d'une longue préparation de l'ovocyte, s'achevant par sa maturation.

Bien qu'il soit difficile d'en donner une définition courte, la maturation ovocytaire est souvent associée à la

méiose. Cependant, nous allons voir qu'au-delà de remaniements nucléaires déjà complexes, la maturation recouvre également des phénomènes cytoplasmiques moins bien connus mais eux aussi d'une grande importance.

La maturation est l'étape finale d'un long processus de différenciation au cours duquel l'ovocyte acquiert sa capacité d'assumer la fécondation et de supporter le développement embryonnaire. L'évolution nucléaire de l'ovocyte est très particulière (*figure 1*). En effet, elle est ponctuée de phases de blocage réglées par des signaux externes. Le processus méiotique de l'ovocyte est bloqué au stade de vésicule germinale depuis la vie

### ADRESSES

P. Mermillod : docteur ès sciences, ingénieur de recherches à l'Inra. R. Marchal : étudiante en thèse. Inra, Station de physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, Ura Cnrs 1291, 37380 Nouzilly, France.

fœtale (stade diplotène, à la fin de prophase de la première division méiotique, ovocyte I). Cette méiose une fois reprise, elle sera poursuivie jusqu'au stade de métaphase de seconde division méiotique (métaphase II), après expulsion du premier globule polaire (ovocyte II), stade auquel l'ovocyte connaît un nouveau blocage et auquel ont lieu l'ovulation et la fécondation. Les aspects cytoplasmiques de la maturation sont moins bien connus mais sont cependant importants car de leur réussite va dépendre la qualité finale de l'ovocyte, c'est-à-dire son aptitude à produire un embryon sain. *In vivo*, cette maturation a lieu au sein du follicule en fin de croissance, en réponse au signal gonadotrope ovulatoire. Avant la maturation, dans le follicule en croissance, l'ovocyte connaît déjà d'importants remaniements cytoplasmiques le préparant progressivement à la maturation. Cette préparation commence par la croissance spectaculaire de l'ovocyte (augmentation de volume de 300 fois) lors des premiers stades de la croissance folliculaire et se termine par des remaniements cytoplasmiques moins visibles mais tout aussi importants en fin de folliculogenèse [1]. Cela confère séquentiellement à l'ovocyte son aptitude à accomplir la première division méiotique, puis la seconde, puis à supporter avec succès la fécondation et le développement embryonnaire. On parle d'acquisition de la compétence au développement pour désigner les phénomènes cytoplasmiques précédant la reprise de méiose et de maturation cytoplasmique pour désigner ceux qui accompagnent le déroulement de la méiose, à la suite du signal ovulatoire de LH.

La connaissance des mécanismes régulateurs de ces phénomènes est importante d'un point de vue fondamental puisqu'ils représentent un exemple intéressant du contrôle endocrine et paracrine de stades précis du cycle cellulaire mais elle est importante également d'un point de vue appliqué puisque la maîtrise de leur déroulement est nécessaire à l'utilisation d'ovocytes immatures, dans les protocoles de fécondation *in vitro* chez les mammifères en général, et plus particulièrement chez l'homme.

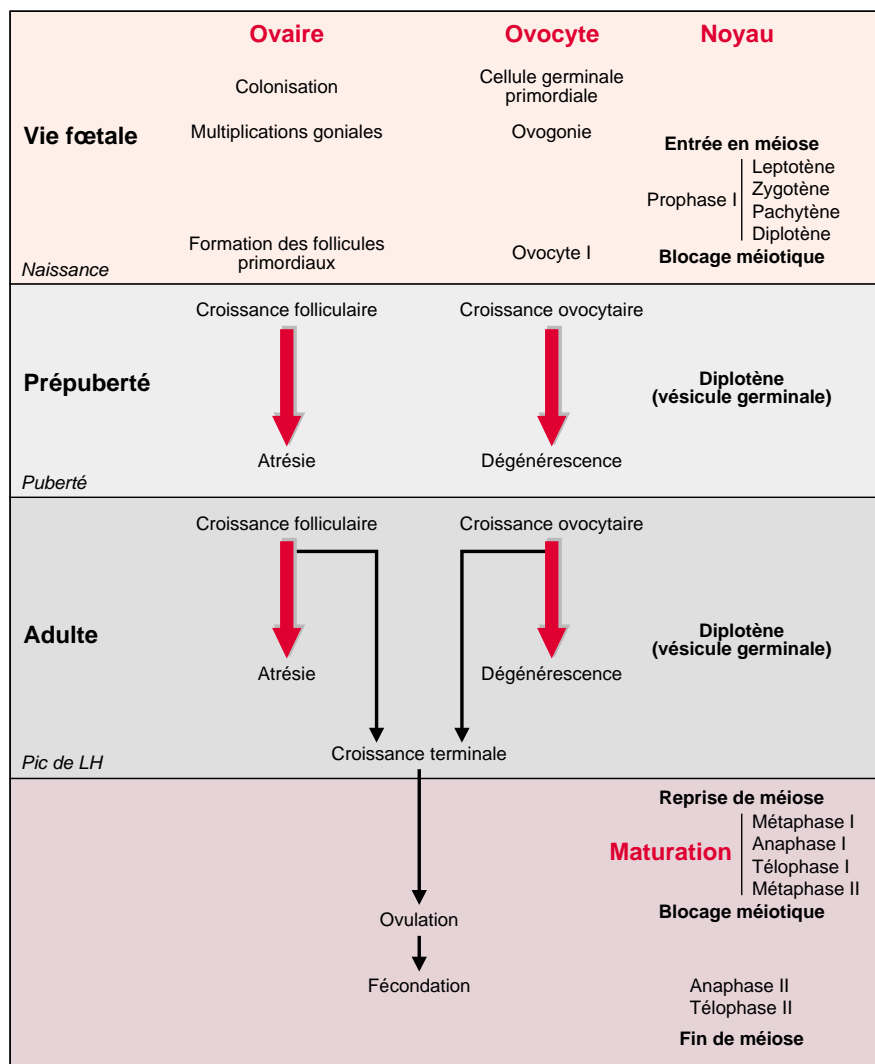


Figure 1. **Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à la fécondation.** Les phases méiotiques et les arrêts/reprises du cycle cellulaire sont représentés. Avant et après la puberté, la plupart des ovocytes sont voués à la dégénérescence lors de l'atrésie folliculaire. La maturation n'a lieu qu'à la suite du pic ovulatoire de LH, c'est-à-dire après la puberté, lors de chaque cycle ovarien et même alors ne concerne qu'un très faible pourcentage des ovocytes. La terminaison de la méiose nécessite l'activation de l'ovocyte lors de la fécondation. Dès avant la naissance (dans la plupart des espèces) et jusqu'aux 24 dernières heures précédant une hypothétique ovulation, l'ovocyte reste donc au stade diplotène de la fin de la prophase méiotique.

## Les faits

Nous n'entrerons pas ici dans les détails de la maturation ovocyttaire déjà largement décrits dans d'excellentes synthèses [1-3]. Nous n'en citerons que les points-clés, nécessaires à la meilleure compréhension des mécanismes régulateurs. L'ovocyte est une cellule très particulière, de par son noyau (bloqué en prophase depuis la différenciation des ovogonies

en ovocytes I lors de la vie fœtale et jusqu'à une éventuelle ovulation, après la puberté) et de par son cytoplasme qui accumule de nombreuses réserves. De plus, l'ovocyte entretient, avec les cellules somatiques du follicule, un réseau de jonctions perméables parmi les plus denses connus. Ces trois aspects (noyau, cytoplasme et environnement somatique) vont évoluer rapidement au cours de la maturation ovocyttaire et l'ensemble

de ces modifications seront importantes pour l'avenir de l'ovocyte.

### Noyau

Le premier signe visible de la reprise du processus méiotique est le plissement de l'enveloppe de la vésicule germinale. Les pores de cette enveloppe nucléaire disparaissent ensuite puis elle se rompt (*germinal vesicle breakdown* ou GVBD) et disparaît rapidement (3h chez la souris, 4h à 6h chez les bovins). La condensation des chromosomes a lieu en parallèle, impliquant la cessation des transcriptions. Les microtubules s'organisent en fuseau mitotique et la plaque métaphasique se forme. La mise en place de cette métaphase et la métaphase elle-même durent environ 10 à 12h (souris). L'anaphase et la télophase suivent ensuite rapidement, donnant lieu à l'expulsion du premier globule polaire, contenant la moitié du complément chromosomique.

La reprise de méiose correspondrait à un passage entre le stade G2 et le stade M du cycle cellulaire, la dernière phase S ayant eu lieu à la fin des divisions goniales avant la différenciation des ovogonies en ovocytes I dans l'ovaire du fœtus. Comme toute transition G2/M, cette reprise repose sur l'activation du *M-phase promoting factor* (MPF). Le MPF est un hétérodimère composé de la protéine p34<sup>cdc2</sup>, et d'une cycline B. La p34<sup>cdc2</sup> est une sérine-thréonine kinase de 34kDa, homologue du produit du gène *cdc2* de la levure thermosensible *cdc* (*cell division cycle*), très conservée parmi les eucaryotes et ayant une forte affinité pour l'histone H1 comme substrat. Son activité dépend de sa liaison à la cycline et de son état de phosphorylation. La cycline B est une protéine de 45 kDa faisant partie de la grande famille des cyclines, protéines connaissant des synthèses et des dégradations régulières au cours du cycle cellulaire et impliquées dans le passage entre les différentes phases de ce cycle [4].

L'activation du MPF, c'est-à-dire de l'activité kinase de la p34<sup>cdc2</sup> requiert deux événements: la formation du complexe p34<sup>cdc2</sup>-cycline B et la déphosphorylation de résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de la p34<sup>cdc2</sup>. Le contrôle de cette déphosphorylation

est sous la dépendance des produits des gènes *wee1* et *cdc25* de la levure thermosensible *cdc* (figure 2). Par la suite, le MPF actif est capable d'augmenter son activité de manière autocatalytique. Les mécanismes d'activation du MPF sont différents selon les espèces. Ainsi, chez la souris, l'entrée en méiose ne nécessite pas de néosynthèses protéiques alors que le passage de métaphase I en métaphase II et l'expulsion du premier globule polaire sont bloqués par des inhibiteurs de synthèse protéique. Cela indique que du pré-MPF (complexe p34<sup>cdc2</sup> phosphorylée-cycline) est présent dans l'ovocyte immature et activé par déphosphorylation avant la rupture de la vésicule germinale (GVBD). En revanche, chez la vache, la truie ou la brebis, comme chez le xénope, des inhibiteurs de synthèse protéique inhibent l'entrée en méiose, ce qui indique que le niveau de pré-MPF n'est pas suffisant et que la GVBD nécessite la synthèse préalable de cycline (ou d'un autre élément régulateur situé en amont du MPF). Ces mécanismes différents expliquent les différences de temps de latence observées entre le signal de reprise de méiose et la GVBD dans ces espèces.

La diversité des cibles phosphorylées par le MPF peut expliquer comment il coordonne les différents événements de la méiose. Son affinité pour des protéines comme les lamines B, l'histone H1 et certaines protéines associées aux microfilaments pourrait être directement responsable de la GVBD, de la condensation des chromosomes et des remodelages du cytosquelette. Le MPF est également responsable de la phosphorylation de l'ARN polymérase II et de facteurs d'élongation; il pourrait donc ainsi induire les modifications de néosynthèse protéique observées lors de la reprise de méiose.

Le niveau d'activité du MPF chute à l'anaphase I (figure 3) à la suite de la dégradation de la cycline par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine. Cependant, on n'observe pas d'interphase, soit que l'activité MPF résiduelle soit suffisante pour maintenir l'état de condensation des chromosomes, soit que d'autres kinases (telles que les *mitogen activated protein kinases* ou MAPK) prennent le relais en maintenant la phosphorylation

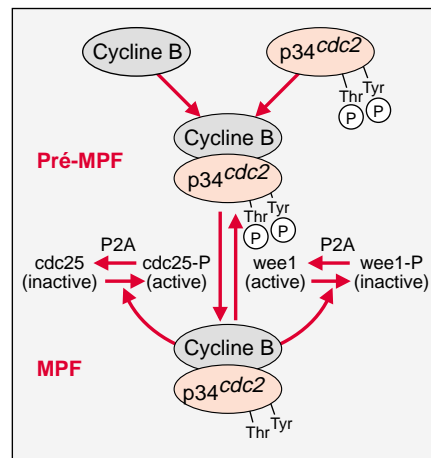


Figure 2. **Mécanismes d'activation du MPF.** L'assemblage des deux sous-unités (p34<sup>cdc2</sup> et cycline B) mène à la formation du pré-MPF. Celui-ci est activé par déphosphorylation, sous la dépendance du produit du gène *cdc25* alors que la phosphorylation est contrôlée par le produit du gène *wee1*. Une fois activé, le MPF peut auto-amplifier son activité en agissant sur les niveaux de phosphorylation de *wee1* et *cdc25*. En inhibant la phosphatase 2A (P2A), le MPF augmente l'activation de *cdc25* et l'inactivation de *wee1*, favorisant ainsi sa propre activation.

des substrats du MPF. Le niveau d'activité du MPF remonte à la suite de la néosynthèse de cycline et les chromosomes s'arrangent en plaque métaphasique II. L'ovocyte restera alors en métaphase II jusqu'à l'entrée du spermatozoïde ou jusqu'à tout autre signal activateur (activation parthénogénétique).

Ce blocage en métaphase II est dû à un facteur cyostatique (*cytostatic factor* ou CSF) dont la nature n'est pas encore totalement élucidée, qui maintiendrait l'activité du MPF. Le produit du proto-oncogène *c-mos* (p39<sup>mos</sup>) serait impliqué dans cette activité CSF. Placés en culture, les ovocytes de souris *mos*<sup>-/-</sup> (double mutation nulle obtenue par recombinaison homologue) présentent une activation parthénogénétique spontanée [5]. De même, des ovocytes bovins placés *in vitro* synthétisent activement la p39<sup>mos</sup> en fin de maturation et cette synthèse cesse lors de l'activation parthénogénétique [6]. Ces observations montrent bien que la p39<sup>mos</sup> est un des composants majeurs du CSF.

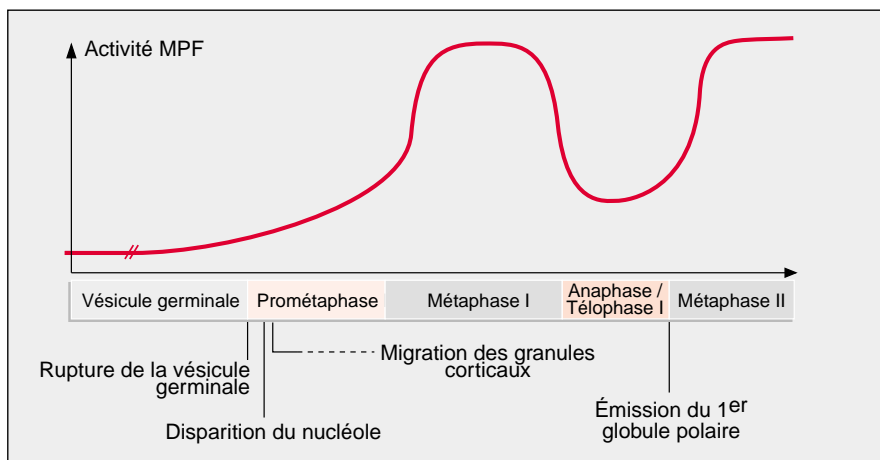


Figure 3. **Évolution de l'activité du MPF au cours de la maturation ovocytaire.** Peu après la rupture de la vésicule germinale (quelques heures après la mise en culture des ovocytes), le nucléole, déjà fortement compacté depuis la fin de la croissance ovocytaire et peu actif, disparaît au contact du cytoplasme. Les granules corticaux se répartissent dans la zone sous-corticale, à la suite du réarrangement des microfilaments. L'activité du MPF en anaphase/télaphase I ne rejoint pas le niveau de base. Cette activité peut être suffisante pour maintenir l'état de condensation de la chromatine et empêcher la progression du cycle cellulaire en interphase.

### Cytoplasme

Certains aspects morphologiques de la maturation cytoplasmique sont bien connus. Les granules corticaux se concentrent aux abords de la membrane plasmique dès la reprise de méiose. Ce sont de petites vésicules sphériques de 200 à 600 nm de diamètre. La libération de leur contenu enzymatique dans l'espace périvitellin lors de la fécondation, provoquera des modifications de structure de la zone pellucide, empêchant la pénétration de spermatozoïdes surnuméraires (pour revue, voir [7]). Cette migration s'accompagne du rassemblement d'autres organites (mitochondries, Golgi) dans la région périnucléaire. Des remaniements du cytosquelette et de la membrane plasmique ont également été décrits.

Des changements des profils de néosynthèse protéique ont lieu tout au long de la maturation (pour revue, voir [2]). On trouve parmi ces protéines certaines molécules impliquées dans la régulation de la méiose (cycline B, c-Mos...), des protéines de la membrane plasmique mais également d'autres dont la fonction reste plus mystérieuse, comme l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) qui interviendrait dans l'ovulation. Ces

changements relèvent de contrôles traductionnels puisque l'activité de transcription devient indétectable dès la GVBD. Des changements métaboliques sont également observés : on note, par exemple, l'augmentation du niveau de glutathion. Ce niveau s'effondre ensuite, après la fécondation. Le glutathion joue un rôle dans le remodelage de la chromatine du pronoyau mâle. Il est au moins partiellement apporté par les cellules du cumulus oophorus (cellules somatiques du follicule ovarien entourant l'ovocyte), ce qui explique l'importance de la présence de ces cellules lors de la maturation pour le succès de la fécondation.

### Environnement

Le follicule lui-même connaît d'importantes modifications lors de la maturation. Un des phénomènes les plus spectaculaires est l'expansion du cumulus (pour revue, voir [8]). Cette expansion est sous la dépendance de la FSH du fluide folliculaire dont l'action serait modulée par la LH. En effet, *in vitro*, la FSH provoque l'expansion du cumulus et pas la LH. *In vivo*, l'action de la FSH présente dans le fluide folliculaire avant le pic de LH pourrait être bloquée par un inhibiteur. La LH lèverait

cette inhibition lors du pic ovulatoire [8]. Cette expansion serait également réglée par l'ovocyte lui-même [9]. L'expansion est le résultat de la production par les cellules du cumulus d'une matrice viscoélastique riche en acide hyaluronique.

La maturation *in vitro* chez les animaux domestiques a permis de mettre clairement en évidence l'importance de la présence des cellules de cumulus pour la maturation [10]. Cependant, leur expansion ne semble pas jouer un rôle crucial puisque de bons taux de développement peuvent être obtenus après maturation dans des conditions ne permettant pas l'expansion [11]. Le rôle des cellules du cumulus peut s'exercer *via* l'apport de métabolites vers l'ovocyte (tel que le glutathion) et également par la transmission de signaux vers l'ovocyte. Ainsi, la stimulation de la maturation de l'ovocyte bovin par l'hormone de croissance passe par le cumulus [12].

D'un point de vue mécanique, l'expansion du cumulus est également importante puisqu'elle facilitera le détachement du complexe cumulus oophorus-ovocyte et sa capture par le pavillon lors de l'ovulation. Par ailleurs, chez le macaque, la présence d'acide hyaluronique favorise la réaction acrosomiale des spermatozoïdes fixés à la zone pellucide [13].

### Il peut le faire

Lorsque l'antrum se creuse au sein du follicule, l'ovocyte de mammifères a déjà atteint 80 % de sa taille définitive. Les modifications ultérieures, moins spectaculaires, sont cependant très importantes d'un point de vue fonctionnel puisque l'ovocyte va acquérir séquentiellement la capacité de reprendre la méiose et de la poursuivre jusqu'en métaphase II (compétence méiotique) puis la capacité d'assumer avec succès la fécondation et le développement embryonnaire (compétence au développement).

### Compétence méiotique

La reprise de méiose n'est possible qu'à partir d'un stade précis de croissance ovocytaire, on parle alors de compétence méiotique. Ce stade de différenciation ovocytaire correspond à une taille folliculaire détermi-



Tableau I		
COMPÉTENCE MÉIOTIQUE D'OVOCYTES DE CHÈVRE PROVENANT DE DIFFÉRENTES CLASSES DE TAILLE DE FOLLICULES		
Follicule (mm)	Stade méiotique après 27 h de maturation	Ovocytes bloqués à ce stade (%)
< 0,5	GV	96
0,5-0,8	GVBD	76
1-1,8	Métaphase I	90
2-3	Métaphase II	56
> 3	Métaphase II	96

GV: vésicule germinale; GVBD: rupture de la vésicule germinale et début de condensation chromosomique. (D'après [14].)

née, variable selon les espèces. Une étude détaillée [14] chez la chèvre (Tableau I) a montré que les ovocytes deviennent d'abord capables d'accomplir la rupture de la vésicule germinale (follicules de 0,5 à 0,8 mm), puis de poursuivre la méiose seulement jusqu'en métaphase I (1 à 1,8 mm) et enfin en métaphase II (à partir de 2 mm).

La compétence méiotique est probablement le reflet de la présence et de l'activation d'effecteurs moléculaires impliqués dans la reprise et le déroulement de la méiose, tels que les composants MPF. Elle pourrait, par exemple, correspondre à l'acquisition d'un niveau suffisant de cycline B [15] et à la mise en place de la capacité des phospho-inositides d'induire la libération pulsatile de calcium depuis les stocks intra-ovocytaires [16].

#### Compétence au développement

La compétence ovocytaire à la fécondation et au développement

s'acquièrent ultérieurement ([17], Tableau II). Certaines classes de taille folliculaire contiennent donc des ovocytes méiotiquement compétents et cependant incapables de se développer après fécondation. Ces ovocytes sont probablement incompétents vis-à-vis de certains aspects de la maturation cytoplasmique. Le même type de déficience se retrouve dans certaines conditions physiologiques particulières. C'est le cas, par exemple, des ovocytes de veau prépubère [18]. En effet, à taille folliculaire égale, les ovocytes provenant d'ovaires d'animaux prépubères présentent un taux de maturation nucléaire égal à celui obtenu avec des ovocytes d'adultes alors que leur taux de développement après FIV est fortement réduit (figure 4). Le caractère cytoplasmique de cette déficience des ovocytes prépubères a été confirmé par transfert nucléaire. En effet, lorsqu'on remplace les noyaux d'ovocytes prépubères par des

noyaux prélevés sur un embryon obtenu à partir d'un ovocyte d'adulte, on observe un taux de développement plus faible que celui obtenu avec des ovocytes d'adulte recevant les mêmes noyaux [19]. Ce type d'ovocyte constitue donc un modèle comparatif pour la recherche de marqueurs de la capacité de développement.

#### **Il ne le fait pas tout de suite**

Pendant toute une partie de la folliculogénèse, le follicule contient un ovocyte capable de reprendre sa méiose mais ne la reprenant que s'il est sorti de son contexte folliculaire. Il doit donc exister une inhibition de la méiose d'origine folliculaire. Les mécanismes moléculaires de cette inhibition sont encore mal connus (pour revues, voir [20, 21]). Le follicule produirait une substance appelée *ovocyte meiotic inhibitor* (OMI) dont la nature chimique reste incertaine. L'OMI doit probablement transiter par le fluide folliculaire puisque celui-ci exerce une activité OMI transitoire *in vitro*. Plusieurs peptides à activité OMI ont été partiellement purifiés de fluide folliculaire de différentes espèces et plusieurs facteurs de croissance ou hormones ont été proposés comme candidats OMI (TGF- $\beta$ , AMH, activine, inhibine, follistatine), mais à ce jour aucune certitude n'est possible. Cette difficulté d'identification peut provenir du caractère labile de l'activité OMI. En effet, il semble bien que l'inhibition méiotique soit un phénomène dynamique, nécessitant la participation de tous les compartiments folliculaires. Une protéine de 60 kDa ayant une activité OMI a récemment été isolée à partir du fluide folliculaire bovin [22] mais il reste à déterminer si cette protéine agit directement ou comme transporteur d'un composé actif plus petit.

L'AMPc semble jouer un rôle important dans le blocage et la reprise de méiose de nombreuses espèces [23]. Ainsi, chez les rongeurs, des molécules augmentant le niveau d'AMPc sont capables de prolonger le blocage méiotique *in vitro*. C'est le cas d'analogues stables de l'AMPc franchissant les membranes comme le dibutyryl-AMPc (dbcAMP) ou le 8-bromo

Tableau II		
COMPÉTENCE AU DÉVELOPPEMENT D'OVOCYTES DE CHÈVRE PROVENANT DE DIFFÉRENTES CLASSES DE TAILLE DE FOLLICULES		
Follicule (mm)	Ovocytes (n)	Blastocystes (%)
2-3	31	10
3-5	45	15
> 5	95	27
Ovulés	89	50

Les ovocytes sont collectés dans des follicules de taille connue, sur des ovaires de femelles abattues. Après maturation *in vitro* (24 h), ils sont fécondés (24 h) puis mis à développer pendant 7 jours *in vitro*. Le taux d'ovocytes atteignant le stade de blastocyste après développement est enregistré, ce pourcentage reflète la compétence atteinte par les ovocytes. Ovocytes ovulés: maturation *in vivo*. (D'après [17].)

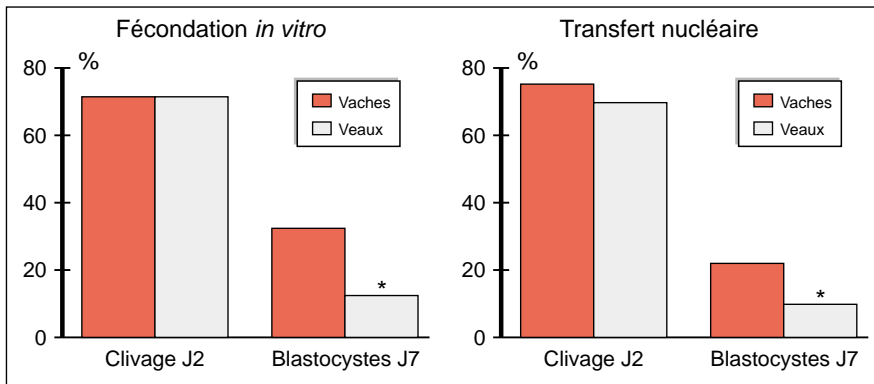


Figure 4. **Comparaison de la capacité de développement d'ovocytes de vaches adultes et de veaux prépubères.** Après maturation et fécondation *in vitro*, les deux types d'ovocytes présentent les mêmes taux de clivage, alors que les ovocytes de veaux ont un taux de développement jusqu'au stade blastocyste plus faible que les ovocytes d'animaux adultes. Un schéma équivalent est retrouvé lorsque, après maturation *in vitro*, leur noyau est remplacé par un noyau prélevé sur un embryon obtenu à partir d'un ovocyte adulte. Cela souligne la faiblesse de la maturation cytoplasmique des ovocytes d'animaux prépubères (\*,  $p < 0,05$ ). (D'après [19].)

AMPC, d'agents activateurs de l'adénylate cyclase (forskoline) ou d'inhibiteurs de la phosphodiesterase (isobutyl-méthyl xanthine ou IBMX, hypoxanthine). Cependant, il a été montré chez les bovins que ces produits n'ont qu'un effet transitoire. Les mécanismes régulateurs du blocage méiotique de l'ovocyte pourraient donc varier selon les espèces, ce qui pourrait également constituer une des difficultés d'identification de l'OMI. Il est clair que les cellules somatiques sont à l'origine du signal inhibiteur de méiose. Il a été montré, en utilisant des co-cultures d'ovocytes et de fragments de paroi folliculaire [24] ou d'ovocytes et de primocultures de thèque et de granulosa [25], que la thèque et la granulosa coopèrent pour maintenir le blocage, le meilleur blocage méiotique étant obtenu lorsque les deux types cellulaires sont présents. Le signal inhibiteur (OMI) pourrait donc être originaire de la thèque et, selon l'environnement gonadotrope, être ou non modifié et/ou transmis à l'ovocyte par la granulosa *via* le cumulus et le fluide folliculaire (figure 5).

Chez le rat [26], le proto-oncogène *c-kit*, qui code pour un récepteur à activité tyrosine kinase, est exprimé par l'ovocyte, alors que son ligand (*kit ligand* ou KL) est exprimé dans la

granulosa et le cumulus. Or l'injection d'antisens *c-kit* dans l'ovocyte facilite la reprise de méiose et l'expression de KL chute dans le cumulus lors de la reprise de méiose. KL pourrait donc également constituer un candidat OMI.

### Il le fait

Suite à la levée de l'inhibition (pic de LH ou mise en culture), le premier signe visible de la reprise de méiose est la rupture des jonctions perméables unissant l'ovocyte aux cellules de cumulus. Cette rupture des jonctions se fait en parallèle avec l'expansion du cumulus. Elle induirait la cessation de la transmission du signal OMI vers l'ovocyte et donc la levée passive du blocage méiotique. *In vitro*, il semble que les premiers signes nucléaires de la reprise de méiose soient antérieurs à la rupture des jonctions. Toutefois, cela paraît logique si on admet que l'OMI est originaire de la thèque: *in vivo*, la levée de l'inhibition OMI se ferait par blocage de son transit *via* le cumulus suite à la perte des jonctions perméables provoquée par la LH alors qu'*in vitro* la levée d'inhibition serait due à l'absence des cellules productrices d'OMI elles-mêmes. La voie de transduction principale du récepteur LH est l'activation de

l'adénylate cyclase, menant à l'augmentation du niveau d'AMPC. Or, dans l'ovocyte, une diminution transitoire du niveau d'AMPC semble liée à la reprise de méiose, provoquant une inactivation de l'activité PKA (protéine-kinase dépendante de l'AMPC). Cette situation peut d'ailleurs être mimée par des inhibiteurs de la PKA (pour revue, voir [27]). Ce paradoxe pourrait trouver son explication par la mise en évidence d'isoformes de phosphodiesterase [28] et de sous-unité régulatrice de la PKA [29] exprimées de façon différentielle par le cumulus et l'ovocyte. Ces isoformes ayant des mécanismes régulateurs différents pourraient permettre à l'ovocyte et au cumulus de réagir différemment à un même stimulus. En effet, en utilisant des analogues de l'AMPC spécifiques de certaines isoformes de la PKA, ces auteurs ont pu montrer que la stimulation de la PKA I (seule forme présente dans l'ovocyte) inhibe la méiose alors que la stimulation de la PKA II (exprimée par le cumulus, en plus de la PKA I) induit l'expansion du cumulus et la GVBD, ce qui pourrait expliquer l'action de la LH *via*

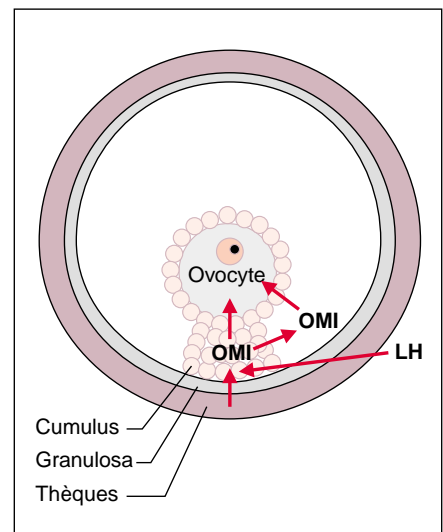


Figure 5. **Schéma hypothétique du blocage méiotique intrafolliculaire.** Un signal inhibiteur serait originaire de la thèque interne et transmis à la granulosa. La granulosa activerait ce signal et le transmettrait à l'ovocyte *via* les jonctions perméables ou le fluide folliculaire (OMI). Lors de la décharge gonadotrope ovulante (LH), ce signal inhibiteur ne serait plus transmis par la granulosa.

ces cellules. Outre son action sur l'AMPc, la LH peut également provoquer la libération de calcium intracellulaire par son action sur les phospholipases et les phospho-inositides [30]. Les protéines-kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline (PKC) pourraient donc également être impliquées dans la reprise de méiose. Des oscillations calciques sont d'ailleurs observées dans l'ovocyte murin en reprise de méiose [31]. L'importance respective de ces deux voies de transduction dans la reprise de méiose reste à déterminer. Elle pourrait être variable selon les espèces et également selon le type de reprise de méiose (*in vivo/in vitro*). Toutefois, il faut retenir l'importance des cascades de phosphorylations/déphosphorylations dans ces mécanismes, menant finalement à l'activation du MPF.

## Maturation in vitro

Chez l'homme, les techniques de maturation d'ovocytes *in vitro*, encore peu utilisées, constitueront sans doute à l'avenir une amélioration sensible des techniques de reproduction assistée (plus d'ovocytes utilisables, traitements allégés, possibilité de stockage d'ovocytes immatures avant un traitement stérilisant). Chez l'animal, outre les applications zootechniques de la production d'embryons *in vitro* au départ d'ovocytes immatures, l'étude et la maîtrise de la maturation *in vitro* permettent d'approcher certains phénomènes physiologiques et cellulaires difficilement accessibles *in vivo*.

Nous avons vu que la reprise de la méiose est spontanée *in vitro*. Cependant, cela n'est vrai que pour les aspects nucléaires de la maturation. Les aspects cytoplasmiques, quant à eux, dépendent du milieu de maturation. Il est clair que les hormones gonadotropes ont une action sur certains aspects de la maturation (par exemple, sur l'expansion du cumulus). Cependant, d'autres facteurs peuvent intervenir. C'est notamment le cas du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*, EGF) dont l'action sur la maturation nucléaire et cytoplasmique a été montrée dans plusieurs espèces dont les bovins [11]. Les facteurs de croissance de la famille de l'insuline sont largement impliqués dans le contrôle

de la folliculogénèse [32] et l'IGF-I pourrait agir en synergie avec l'EGF dans le contrôle de la maturation ovocytaire [33]. L'activine présente dans le fluide folliculaire, et dont le récepteur est exprimé par les cellules du cumulus et par l'ovocyte, intervient également dans la maturation cytoplasmique de l'ovocyte bovin puisque le taux de développement embryonnaire est augmenté après maturation en présence d'activine [34].

Lorsqu'un ovocyte méiotiquement compétent est mis en culture, sa reprise spontanée de méiose s'accompagne presque immédiatement d'un blocage des transcriptions. Cet arrêt prématuré prive l'ovocyte d'une étape de préparation importante pour l'acquisition d'un potentiel de développement optimal (figure 6). En vue d'augmenter la compétence finale de ces ovocytes de petits follicules, il serait donc intéressant de pouvoir leur faire subir une étape de prématuration en les main-

tenant en blocage méiotique *in vitro*. Dans la plupart des espèces, la réalisation d'une telle étape de prématuration est rendue délicate par le peu de connaissance des mécanismes de blocage de la méiose. Chez les bovins, par exemple, nous avons vu qu'il est possible d'obtenir des blocages méiotiques en utilisant des cocultures de complexe cumulus-ovocyte et de cellules de granulosa et de thèque mais ces systèmes sont lourds à mettre en œuvre et peu reproductibles. Les réactifs agissant sur le niveau d'AMPc ne permettent que des blocages très transitoires dans cette espèce et, actuellement, un blocage de 24 h nécessite l'emploi d'inhibiteurs plus drastiques de voies métaboliques importantes comme la synthèse ou la phosphorylation de protéines [35]. L'identification de l'OMI, la connaissance de son site de synthèse et de son mode d'action seront indispensables pour améliorer dans l'avenir les méthodes de blocage *in vitro*.

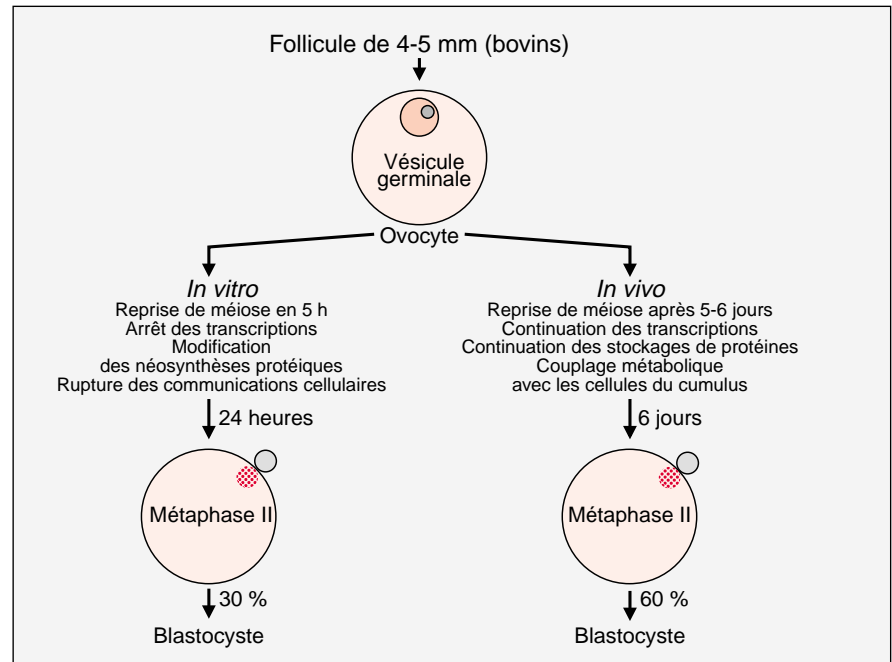


Figure 6. **Comparaison de la destinée d'un ovocyte bovin dans un follicule de 4-5 mm selon qu'il est mis en culture ou laissé dans son follicule jusqu'à l'ovulation.** La reprise de méiose rapide lors de la mise en culture prive cet ovocyte d'une période préparatoire de 5 ou 6 jours au cours de laquelle il aurait pu continuer à stocker des transcrits et des protéines en contact étroit avec les cellules somatiques du follicule. Cet ovocyte atteindra sans encombre le stade de métaphase II après maturation *in vitro* (24 heures) mais ses chances de se développer normalement après fécondation seront réduites.

Chez les rongeurs, ces techniques sont plus avancées, pour au moins deux raisons. D'une part, l'AMPc joue un rôle central dans la régulation de la reprise de méiose et des agents agissant sur cette voie de transduction sont capables de bloquer cette reprise à long terme. D'autre part, la folliculogénèse étant plus courte dans ces espèces (environ 14 jours chez la souris au départ de follicules préantraux [36]), il est envisageable de réaliser *in vitro* la presque totalité de la croissance ovocytaire (pour revue, voir [37]). Pour conclure, il est évident que l'ovocyte représente l'un des modèles les plus intéressants de l'étude du cycle cellulaire et de son contrôle chez les mammifères. En dehors de l'intérêt fondamental de cette étude, elle devrait également permettre à l'avenir une meilleure exploitation de l'immense potentiel reproducteur porté par l'ovaire. En effet, la maturation *in vitro* est actuellement maîtrisée dans la plupart des espèces, lorsqu'elle s'adresse à des ovocytes provenant de gros follicules, relativement proches de l'ovulation. La progression des connaissances concernant les mécanismes de blocage et de reprise de méiose devra permettre de descendre vers des ovocytes de stades folliculaires plus précoces, plus abondants. En outre, une meilleure connaissance des aspects cytoplasmiques de la maturation devrait permettre de mieux comprendre les points importants pour la compétence finale de l'ovocyte à être fécondé puis à se développer et donc d'affiner les conditions de maturation de manière à optimiser cette compétence. Si certaines techniques sont maîtrisées et certains mécanismes moléculaires commencent à être connus, de nombreux aspects de la maturation ovocytaire restent peu élucidés et nécessiteront encore d'importants travaux. La diversité des modèles animaux utilisés dans ces travaux permet d'apprécier les variations spécifiques importantes qui existent dans le contrôle de la maturation. Cela favorisera l'extrapolation des observations vers l'ovocyte humain et sa maturation dont la maîtrise représente un enjeu important pour les techniques de reproduction assistée ■

#### \* ABREVIATIONS \*

**DIV**: développement embryonnaire in vitro.  
**FIV**: fécondation in vitro.  
**GVBD**: germinal vesicle breakdown ou rupture de la vésicule germinale.  
**MIV**: maturation in vitro.  
**MPF**: M-phase promoting factor.  
**OMI**: ovocyte meiosis inhibitor.

#### RÉFÉRENCES

- Gosden R, Krapez J, Briggs D. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays* 1997; 19: 875-82.
- Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD, eds. *Physiology of reproduction*, 2nd ed, vol. 1 et 2. New York: Raven Press, 1994; A79-122.
- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 485-9.
- Taieb F, Thibier C, Jessus C. On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 397-411.
- Hirao Y, Eppig JJ. Parthenogenetic development of mos-deficient mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 391-6.
- Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. Expression of mos proto-oncogene in bovine oocytes during maturation *in vitro*. *Biol Reprod* 1997; 56: 260-5.
- Hoodbhoy T, Talbot PR. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 439-48.
- Cecconi S, Colonna R. Influence of granulosa cells and of different somatic cell types on mammalian oocyte development *in vitro*. *Zygote* 1996; 4: 305-7.
- Salustri A, Camaioni A, D'Alessandris C. Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. *Zygote* 1996; 4: 313-5.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 338-44.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 1996; 54: 1412-21.
- Izadyar F, Van Tol HTA, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 1996; 47: 175-80.
- Vandervoort CA, Cherr GN, Overstreet JW. Hyaluronic acid enhances the zona pellicula-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J Androl* 1997; 18: 1-5.
- De Smedt V, Crozet N, Gall L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J Exp Zool* 1994; 269: 128-39.
- Hue I, Dedieu T, Huneau D, Ruffini S, Gall L, Crozet N. Cyclin B1 expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 222-8.
- Lefèvre B, Nagyova E, Pesty A, Testart J. Acquisition of meiotic competence is related to the functionality of the phosphoinositide/calcium signaling pathway in the mouse oocyte. *Exp Cell Res* 1997; 236: 193-200.
- Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 293-8.
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C, Mermillod P. The prepubertal oocytes as a negative model in the study of bovine oocyte developmental competence acquisition. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 231-9.
- Mermillod P, Le Bourhis D, Lonergan P, Khatir H, Heyman Y. Assessment of cytoplasmic competence of prepubertal calf oocytes by use of nuclear transfer. *Theriogenology* 1998; 49: 187.
- Dekel N. Molecular control of meiosis. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6: 165-9.
- Whitaker M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1996; 1: 127-35.
- Dostal J, Pavlok A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod Nutr Dev* 1996; 36: 681-90.
- Downs SM. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 1993; 39: 65-80.
- Richard F, Sirard MA. The effect of coculture of follicular components with bovine oocytes on meiotic resumption. *Biol Reprod* 1993; 48 (suppl 1): 123.
- Kotsuji F, Kubo M, Tominaga T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *J Reprod Fert* 1994; 100: 151-6.
- Ismail RS, Dubé M, Vanderhyden BC. Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. *Dev Biol* 1997; 184: 333-42.
- Parrish JJ, Kim CI, Bae IH. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology* 1992; 38: 277-96.
- Tsafriiri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJW, Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 1996; 178: 393-402.



## RÉFÉRENCES

29. Downs SM, Hunzicker-Dunn M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev Biol* 1995; 172: 72-85.
30. Homa ST. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 122-34.
31. Carroll J, Swann K, Wittingham D, Whittaker M. Spatiotemporal dynamics of intracellular ( $Ca^{2+}$ ) oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* 1994; 120: 3507-17.
32. Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil* 1995; 49 (suppl): 321-33.
33. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation *in vitro* of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 44: 109-18.
34. Silva CC, Knight PG. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 58: 558-65.
35. Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production *in vitro* following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 355-65.
36. Cortvriendt R, Smits J, Van Steirteghem AC. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11: 2656-66.
37. Chesnel F, Eppig JJ, Boujard D. Croissance et maturation ovocytaire *in vitro*: l'exemple de la souris. *Contracept Fertil Sex* 1997; 25: 538-42.

## Summary

### Mammalian oocyte maturation

The oocyte is a very special cell within an organism. Its maturation represents the final step of a long process of preparation for successful fertilization and embryo development. This preparation progresses throughout folliculogenesis. From birth to ovulation (which could take several years) the oocyte's nucleus remains blocked at the germinal vesicle stage (meiotic prophase) due to follicular inhibition of meiotic progression. Meiosis resumes only in a fully grown oocyte (in a fully grown follicle) following the preovulatory LH surge. This review describes some of the regulatory mechanisms involved in the control of meiotic arrest/resumption in the oocyte. We attempt to find some indicators of oocyte competence and to examine how this knowledge can be used in *in vitro* maturation techniques for assisted reproduction in humans and animals, basic studies of cell cycle control, and implementation of new biotechnologies.

## TIRÉS À PART

P. Mermillod.

## OFFRE D'EMPLOI

Le laboratoire « Génétique des eucaryotes-endocrinologie moléculaire », UMR 6547 Cnrs/Université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand, propose **2 postes** à pourvoir en **septembre 1999** :

- un poste de **Professeur de Biologie et Physiologie moléculaires (65<sup>e</sup> section CNU)**
- un poste de **Maître de Conférences de Physiologie (66<sup>e</sup> section CNU)**

Les candidats assureront des enseignements de physiologie (MCF) et de biologie et physiologie cellulaire et moléculaire (PR) en 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> cycles. La recherche s'effectuera dans l'équipe « Reproduction et Développement » de l'UMR 6547. L'équipe travaille actuellement sur des gènes modèles dont l'expression est régulée par une restriction tissulaire (tractus génital - surrénales), le stade de développement (pré ou postnatal) et des stimuli hormonaux empruntant la voie des récepteurs nucléaires (androgènes notamment) et/ou membranaires.

L'équipe souhaite étendre ses recherches à d'autres gènes dont l'expression, au cours de la morphogenèse et dans différentes conditions physiologiques, est contrôlée par des facteurs utilisant les récepteurs nucléaires. Une expérience dans le domaine de la transgénèse et de l'inactivation de gènes par recombinaison homologue sera appréciée.

**Contacts** : G. Veyssière : Tél. : 04.73.40.74.15  
Email : veyssiere@cicsun.univ-bpclermont.fr  
Cl. Jean : Tél. : 04.73.40.74.14  
Email : jean@cicsun.univ-bpclermont.fr

## COLLOQUE FRANCO-AMÉRICAIN SUR LA SIGNALISATION ET LA BIOMINÉRALISATION

Sous le patronage des Universités  
de Paris V et Paris XII, de l'Inserm  
et de l'Université de Pennsylvanie  
à Philadelphie

**Lieu** : Faculté de Chirurgie Dentaire  
Université Paris V  
1, rue Maurice-Arnoux  
92120 Montrouge - France

### Organisateurs :

M. Goldberg  
(Faculté de Chirurgie Dentaire - Paris V)  
J. Hanoune  
(Inserm U. 99, IM3, Créteil)  
D. Malamud  
(Dental School, University of Pennsylvania,  
Philadelphia)  
J. Shapiro  
(Dental School, University of Pennsylvania,  
Philadelphia)

### Orateurs :

Dr Sherril ADAMS (U. Penn) ; Dr  
Ariane BERDAL (Paris V) ; Dr Joe  
BRAND (U. Penn) ; Dr Marc CHER-  
RUAU (Paris V) ; Dr Don DEMUTH  
(U. Penn) ; Dr Michel GOLDBERG  
(Paris V) ; Dr Gaston GODEAU  
(Paris V) ; Dr Ellis GOLUB (U.  
Penn) ; Dr Jacques HANOUNE  
(Inserm U. 99) ; Dr Eileen JAFFE (U.  
Penn) ; Dr Phoebe LÉBOY (U.  
Penn) ; Dr Daniel MALAMUD (U.  
Penn) ; Dr Hyun-Duck NAH (U.  
Penn) ; Dr Françoise PECKER  
(Inserm U. 99) ; Dr Bernard PELLAT  
(Paris V) ; Dr Jean-Louis SAFFAR  
(Paris V) ; Dr Jean-Michel SAUTIER  
(Paris VII) ; Dr Irving SHAPIRO (U.  
Penn) ; Dr Maria-Angelica TORRES-  
QUINTANA (Paris V).

### Informations et inscriptions :

Pr M. Goldberg  
Faculté de Chirurgie Dentaire  
Université Paris V  
1, rue Maurice-Arnoux  
92120 Montrouge - France  
Tél. : 01 46 57 12 86  
Fax : 01 42 53 43 25  
E-mail : mgoldod@ad.com

**Date limite de soumission  
des résumés :**  
**15 avril 1999**

La participation des auditeurs sera  
libre et sans frais d'inscription. Il  
sera possible de présenter des pos-  
ters. Un prix pour le meilleur d'entre  
eux est prévu.