



301THV-1

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de L'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université SAAD DAHLEB BLIDA
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques
Département des Sciences Vétérinaires**

**PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

Thème :

**INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES SUR LA QUALITE DES
OVOCYTES CHEZ LA VACHE**

(OVAIRES RECOLTES AU NIVEAU DE L'ABATTOIR)

Réalisé par :

NOUL. Nesrine

TOUATI. Meriem

Jury:

**Présidente du jury : Dr Ferrouk
Examineur : Dr Dechicha
Promoteur : Dr Adel**

**MAT(USDB)
MAT(USDB)
MAT (USDB)**

Promotion 2008 /2009

REMERCIEMENTS

A « ALLAH » le tout puissant, pour sa bénédiction et sa protection divine.

A Monsieur le promoteur Dr Adel

Pour nous avoir encadré et soutenu dans la réalisation de ce travail

Puissiez-vous trouver ici l'expression de notre profonde gratitude ainsi que nos sincères vœux de réussite dans l'accomplissement de vos projets.

A Monsieur Ferrouk

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre thèse,
Hommage respectueux

A Madame Dechicha

Pour avoir accepté de juger notre travail

Sincères remerciements

A tout le personnel de l'abattoir de Blida ainsi qu'au personnel de la station expérimentale.

Au Professeur Boucekine pour sa gentillesse.

A Fares et Foudil pour leur aide.

A la famille Noui pour leur accueil et leur générosité.

A la famille Touati pour leur gentillesse.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A ma famille, mon père Toufik, ma mère Nadia, ma sœur Aicha et mon petit frère Réda, m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes choix. Merci

A mes chères et adorables tantes, mes oncles et Nabila qui m'ont hébergé et soutenu, mais surtout supporté et beaucoup gâté tout au long de ces 5 années, Merci.

A amou Moukhtar et tata Naima pour leur gentillesse et leur serviabilité.

A djallal sans qui je n'aurais pas pu réaliser mon rêve.

A mes petits cousins : Nabil, Manel, Rayan.

A mes copines : Chourouk, Nesrine, Wafia, merci pour tous les fous rire qui nous ont permis de réussir, pour les nombreux délires partagés en 5 ans et qui n'amusaient que nous, merci pour cette rencontre qui nous a fait grandir

A Brahime, Amine et Fares vous avez contribué à rendre ces quelques années bien agréables, chargées de rire et d'amitié.

A ma très sympathique amie Fahima.

A mes amis de promo : Foudil, Anissa, Mouh la légende, Amar, Houcine (ENV), pour tous ces moments passés avec vous.

Meriem

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents, ma sœur Rym, mes frères Mehdi et Yasser, pour tout votre amour et votre confiance pour tout ce que vous m'avez offert, Aucune phrase ne sera le juste reflet de mes sentiments. Je vous aime

A mes tantines Sissi, Rado, hamou, ma petite cousine chérie Mayssa, et mes petits cousins Doucha et Aymen.

A mes copines d'amour Wafia, Meriem et Chourouk, pour cette complicité éternelle et tous les moments uniques qu'on a partagé et ceux à venir que beaucoup nous envient encore. Merci

A Redha pour tous les moments inoubliables qu'on a partagé et tous ceux qu'on partagera. Merci

A Brahim, Amine et Fares, pour ces années super sympathiques à vos cotés, Merci

A Seyl et Inesse pour tous nos fous rires en cous .Merci

A Foudil, Anissa, Farah, Mouh et Amar mes amis de promo pour ces 5 années à vos cotés .Merci

A Yacine, Mounir, Raouf, Rahim, Midou, Assia, Houcine (ENV), Driss, Dalia, Amina, Walid, comment dire ça en 4 lignes ? Merci

A toute la promo vétérinaire 2009 de Blida.

A tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas.

Nesrine

Abréviations

°C :	Degré Celsius
bFF :	bovine follicular fluid
BMOC-3 :	Milieu de brinster
BRL:	Buffalo rat liver
Cm:	Centimètres
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
COC :	Cumulus -oocyte complex (complexe cumulus-ovocyte)
CR1:	Milieu rosenkrans
ECS:	Estrus cow serum
EGF:	Epidermal growth factor
FCS:	Fetus calf serum
FIV:	Fécondation in vitro
FSH:	Folliculo-stimulating hormone (hormone folliculo-stimulante)
GH:	Growth hormone
GVBD:	Germinal vesicle breakdown (rupture de la vesicule germinale)
IBR:	Rhinotracheite Bovine Infectious
IGF:	Insulin-like growth factor
IGF-I:	Insulin-like growth factor I
LH:	Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
M II:	Metaphase II
M-199:	Milieu de culture de base
MDBK:	Madin Darby bovine kidney
Mg, ug, ng, g:	Milli, micro, nano, gramme
MIV:	Maturation in vitro
NaCl:	Chlorure de sodium
OMI:	Oocyte maturation inhibiting factor
OPU:	Ovum pick up
PACAP:	Pituitary adenylate cyclase activating peptide
PIV:	Production d'embryons in vitro
PMSG:	Prégnant Mare Sérum Gonadotrophine
SOF:	Synthetic oviductal fluid
TALP:	Tyrode Albumine lactate pyruvate

TGF: Transforming growth factor
TGFB: Transforming growth factor beta
UI: Unité international
VERO : Cellules de rein de singe vert
ZP3 : Glycoprotéine de la zone pellucide

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures.....	
Liste des photos.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.	
Abstract	
Résumé.....	
Introduction.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LA GAMÉTOGÈNE CHEZ LA VACHE

1. Introduction.....	2
2. ovogenèse.....	2
3. Folliculogenèse.....	2
3.1 Phase non hormono- dépendante.....	3
3.2 Phase hormono-dépendante.....	3
3.2. a. recrutement, sélection, dominance.....	3
3.2.b notion de vague folliculaire.....	5
3.3 Atrésie.....	6
4. Maturation ovocytaire in vivo.....	7
4. a. Maturation nucléaire.....	7
4. b. Maturation cytoplasmique.....	7
4. c. Maturation membranaire.....	8
4. d. Expansion du cumulus.....	8

CHAPITRE II : PRODUCTION D'EMBRYONS IN VITRO

1. Introduction	11
2. Prélèvement in vitro des ovocytes	11
2. a. Méthode décrite par C.Hanzen.....	11
2. b. Méthode décrite par Blondin et Sirard.....	12
3. Prélèvement in vivo: Ovum Pick Up (OPU).....	12
3.1. Méthode de ponction intravaginale.....	12
3.2. Le matériel.....	13

3.3. Intérêt de l'OPU.....	13
4. Collecte et sélection.....	13
4.a Critères de détermination selon C.Hanzen.....	14
5. Maturation ovocytaire in vitro.....	15
5.1 Milieux de culture.....	15
5.2 Principes généraux.....	16
5.3 Méthode de culture.....	17
5.4 Evaluation de la maturation ovocytaire.....	18
6. Fécondation in vitro	18
6.1 Capacitation des spermatozoïdes et fécondation in vitro.....	18
6.2 Capacitation in vivo.....	18
6.3 Capacitation in vitro.....	19
6.4 Fécondation proprement dite.....	19
7. La culture des embryons	20
7.1 La culture d'embryons in vivo.	20
7.2 La culture d'embryons in vitro.....	20

PARTIE EXPERIMENTALE

1.	
Introduction.....	22
2. Matériels et méthodes	22
2.1. Matériels.....	22
2.1. a. ovaires.....	22
2.1. b. Matériels.....	22
2.2. Méthode de travail.....	24
2.2. a. collecte des ovocytes.....	24
2.2. b. récolte par ponction ovarienne et classification des ovocytes.....	24
3. Résultats	25
4. Discussion	30
4. conclusion.....	31

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau n°1 : Facteurs capables de stimuler la maturation nucléaire ovocytaire (Reynaud K, 2003).....	7
Tableau n°2 : Facteurs capables de stimuler la maturation cytoplasmique ovocytaire (Reynaud K, 2003).....	8

Partie expérimentale

Tableau I : Illustration des résultats obtenus au cours de notre travail.....	25
Tableau II : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de la race des animaux abattus.....	26
Tableau III : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'âge des animaux abattus.....	27
Tableau IV : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'état d'embonpoint des animaux abattus.....	28

LISTE DES PHOTOS

Photo n°1 : le matériel utilisé pour la récolte des ovocytes.....	23
Photo n° 2 : microscope inversé	23
Photo n°3 : ponction folliculaire.....	24
Photo n° 4 : ovocyte classe 1.....	29
Photo n° 5: ovocyte classe 2.....	29
Photo n° 6 : ovocyte classe 3	29
Photo n° 7 : ovocyte classe 4.....	29

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Sécrétion des hormones gonadotropes (LH, FSH) et des facteurs de contrôle (œstradiol et inhibine) au cours des phases de recrutement, sélection et dominance (V. Gayrard,2007).....	5
Figure n°2 : Vagues de croissance folliculaire au cours du cycle œstral de la vache (V.Gayrard, 2007).....	6
Figure n°3 : Les différents stades de développement folliculaire (V.Gayrard ,2007).....	6
Figure n° 4 : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à la fécondation (Mermillod P ,1999)	10
Figure n°5 : Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de la race des animaux abattus	26
Figure n°6 : Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'âge des animaux abattus.....	27
Figure n° 7 : Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'état d'embonpointdes animaux abattus.....	28

Liste des Annexes :

Annexe 1 : Tableau des signes cliniques d'évaluation de l'état d'embonpoint (L : région lombaire, Q : région de la queue).

Résumé

Les techniques de maturation et de fécondation in vitro chez les mammifères d'élevage ont fait des progrès considérables durant ces dernières années et sont d'ores et déjà utilisables pour produire des embryons destinés à l'expérimentation et à des applications d'intérêt agronomique.

La récolte d'ovaires et la collecte d'ovocytes bovins après abattage représente la première étape de la production d'embryons in vitro.

Notre travail s'est intéressé à l'étude de certains paramètres tels que : la race, âge, état d'embonpoint influençant sur la qualité des ovocytes collectés, sur une période allant de (Mai à Juin) à l'abattoir de Blida et au niveau de la station expérimentale, nous avons collectés 72 ovaires (droit et gauche) avec 618 ovocytes récupérés suite aux ponctions de 849 follicules . Cette étude nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants estimant le taux de récupération à 72,79% avec une moyenne de récolte de 8.58 ovocytes par ovaire.

Mots clés : ovocyte, récolte, classification, maturation, fécondation, in vitro

ABSTRACT

The techniques of ripening in vitro and in vitro fertilization to the mammals of animal husbandry made considerable progress during these last years and are already useful to produce intended embryos intended in experimentation and in applications of interest.

The crop of ovaries and the collection of bovine oocytes after butchery represent the first stage of the production of embryos in vitro.

Our job was interested in the study of certain parameters such as: the breed, age, state of portliness influencing on the quality of the collected oocytes, over period going from (May to June) to the abattoir of Blida and at the level of the experimental station, we collected 72 ovaries (right and left) with 618 oocytes recovered further to the punctures of 849 follicles. This study allowed us to acquire satisfactory results estimating the rate of recovery in 72, 79 % with an average of crop of 8.58 oocytes by ovary.

Key words: oocyte, crop, classification, ripening, conception, in vitro.

Introduction générale

On appelle biotechnologies de l'embryon l'ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l'embryon.

Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80, d'abord dans l'espèce bovine où la reproduction des animaux était, depuis déjà trente ans, largement organisée autour de l'insémination artificielle. chez cette espèce, l'embryon a d'abord été produit exclusivement in vivo après stimulation hormonale des femelles donneuses. ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation. Plus récemment une deuxième génération de technologies est apparue qui s'appuie sur la production d'embryons en culture, après maturation et fécondation in vitro d'ovocytes prélevés sur l'animal.

Sous une forme chronologique, la production d'embryons in vitro englobe les différentes étapes entre la collecte d'ovocytes et l'obtention in vitro d'embryons transférables à savoir :

La collecte des ovocytes et l'évaluation de leur qualité, leur maturation in vitro, leur fécondation puis la culture des embryons obtenus.

Notre travail a porté sur la première étape à savoir la collecte des ovocytes et l'évaluation de leur qualité en fonction de l'influence de certains paramètres.

Partie Bibliographique

CHAPITRE I

Gamétogenèse chez la vache

1) INTRODUCTION :

Chez les espèces diploïdes, les gamètes sont des cellules haploïdes spécialisées dans la fusion sexuée. Elles sont spécifiques d'espèces. De plus, les animaux domestiques sont qualifiés d'hétérogamétiques car les deux sexes produisent des gamètes morphologiquement distincts. Leur formation relève des mêmes mécanismes fondamentaux dont le principal est la réduction chromatique ou méiose par laquelle le nombre de chromosomes est réduit de moitié passant ainsi de l'état diploïde à l'état haploïde

2) Ovogénèse :

L'ovogénèse débute au 30ème jour de la vie embryonnaire et peut durer 2 à 20 ans et plus (Braw –Tal et Yossefi 1997).Elle s'arrête à la prophase méiotique laissant les ovocytes I entourés de cellules folliculeuses, le nombre de ces follicules primordiaux 235000 à la naissance chez la vache(Mialot et al ,2001),diminuera avec l'âge par dégénérescence.au cours de la succession des cycles ,certains ovocytes iront jusqu'à la maturation et la ponte ovulaire ,tandis que la majorité dégénérera dans les follicules atrétiques.

Seulement quelques centaines d'ovocytes primordiaux achèveront ainsi la première division de la méiose pour évoluer en ovocytes II avec émission des premiers globules polaires ; suivie de la seconde division méiotique. C'est au stade métaphase de cette division, qu'a lieu l'ovulation ; et la maturation finale se déroulera lors de la fécondation, avec émission du second globule polaire.

3) Folliculogénèse :

La folliculogénèse est définie par les étapes successives de la croissance et de la différenciation du follicule depuis son émergence de la réserve constituée au cours de la vie fœtale .selon Gougeon (1982) ce sont les temps et évènements compris entre le stade follicule primordial et le stade follicule antral pré-ovulatoire (Driancourt MA et al , 1999).Elle dure 05 mois chez la vache pubère (Drion PV et al 2002) ,elle concerne peu de follicules ,plus de 99% de ceux ci deviendront atrétiques n'aboutissant jamais à l'ovulation .On estime que chez la vache environ 50-80 follicules primordiaux quittent chaque jour la réserve ovarienne et entament une phase de croissance ou deviennent atrétiques ,seul un follicule ovulera par cycle de 21 jours (Claudel .C , 2007) La folliculogénèse est régulée par deux phases :

❖ Phase non hormono-dépendante

❖ Phase hormono-dépendante

3-1 phase non hormono-dépendante :

Le follicule primordial est la forme initiale constitué d'un ovocyte et de quelques cellules de la granulosa aplaties. Le développement de ce follicule primordial (30 micro mètres de diamètre) à un follicule tertiaire recruté (5mm) pour être intégré à une vague folliculaire dure plus de 6mois (Ennuyer 2000).

Le stock de follicules primordiaux est acquis pendant la vie fœtale chez les ruminants ; Puis ils sortent de leur quiescence continuellement et graduellement pour subir croissance, sélection et différenciation ; processus suivi par un nombre spécifique de follicules aboutissant à l'ovulation ou à l'atrésie (Fortune JE 1994).

Les follicules primordiaux évoluent ainsi en follicules primaires comprenant une couche de cellules folliculaires qui se différencient lors de l'évolution en follicules secondaire, nous observons une multicouche cellulaire avec des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque ; séparées des cellules de la granulosa murales par la lame basale (Van Den Hurk et al, 2000)

Le follicule tertiaire ou follicule à antrum (0,2-0,4mm de diamètre) qui se caractérise par la présence d'une cavité résultant de l'accumulation de liquide folliculaire sécrété par les cellules de la granulosa.

3-2 phase hormono-dépendante :

On distingue trois étapes sous le contrôle de la FSH :

3.2.a Recrutement, sélection et dominance :(cf .figure n°1)

- le recrutement correspond à l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonado-dépendants dont le diamètre est de 2mm environ, ce sont donc des follicules pré-ovulatoires (Drion PV et al, Youngquist RS 1997).l'augmentation des concentrations plasmatiques en FSH après l'ovulation pourrait stimuler le mécanisme qui contrôle le recrutement (Touati K, 1993).le futur follicule ovulatoire sera sélectionné dans cet ensemble.
- Le follicule sélectionné devient alors dominant, il est le plus gros, mais également capable d'initier l'atrésie des autres follicules et d'ovuler au moment approprié.

Un grand nombre d'hormones interviennent ainsi que certains facteurs de croissance :

- ✓ Progestérone, 17 β -œstradiol, androgènes ;
- ✓ inhibine, activine, follistatine ;
- ✓ Hormones hypophysaires : FSH, LH, GH, PRL ;
- ✓ Facteurs de croissance : IGF, EGF, TGFB.

Ce follicule évolue vers la phase ovulatoire malgré la chute du taux de FSH survenant par la suite, de par son acquisition d'un nombre plus élevé de récepteurs à FSH au niveau de sa granuleuse (Drion PV et al ,2002).

➤ La dominance est le moyen par lequel le follicule sélectionné empêche le recrutement d'une nouvelle cohorte de follicules. L'établissement de la dominance de ce follicule dépend (Drion PV et al, 2002) :

- ❖ de l'augmentation de sa capacité à réaliser au niveau de sa granuleuse l'aromatization en œstradiol des précurseurs d'androgènes issus de sa thèque interne.
- ❖ de la sécrétion par sa granuleuse de l'inhibine.
- ❖ de facteurs paracrines.
- ❖ de l'amplification chez ce follicule de sa réponse à un niveau donné de FSH par un mécanisme autocrine.

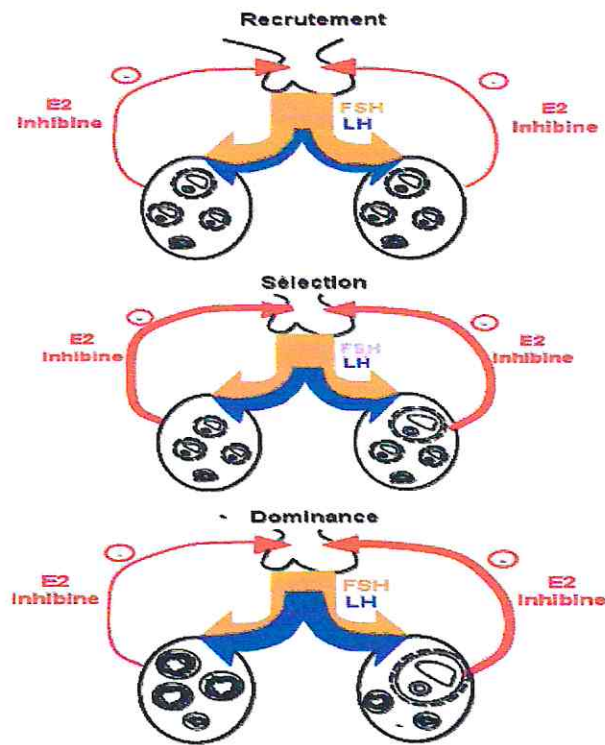


Figure n°1: sécrétion des hormones gonadotropes (LH, FSH) et des facteurs de rétrocontrôle (œstradiol et inhibine) au cours des phases de recrutement, sélection et dominance (Gayrard.V ,2007).

3.2. b Notion de vague folliculaire :(cf.figure n°2)

Des études échographiques ont prouvé que le développement folliculaire évolue sous la forme de vagues de croissance et de dégénérescence successives du follicule (Ireland JJ, Roche JF.1987).

Une vague a une durée d'environ 7 à 9 jours et elle est caractérisée par l'émergence de plusieurs follicules de diamètre au moins égal à 5mm, malgré l'existence d'un corps jaune actif. On observe donc deux à trois vagues folliculaires par cycle œstral complet ; la dernière vague aboutissant à l'émergence du follicule dominant ovulatoire.les vagues non ovulatoires ne sont pas soumises aux phénomènes de sélection et de dominance.

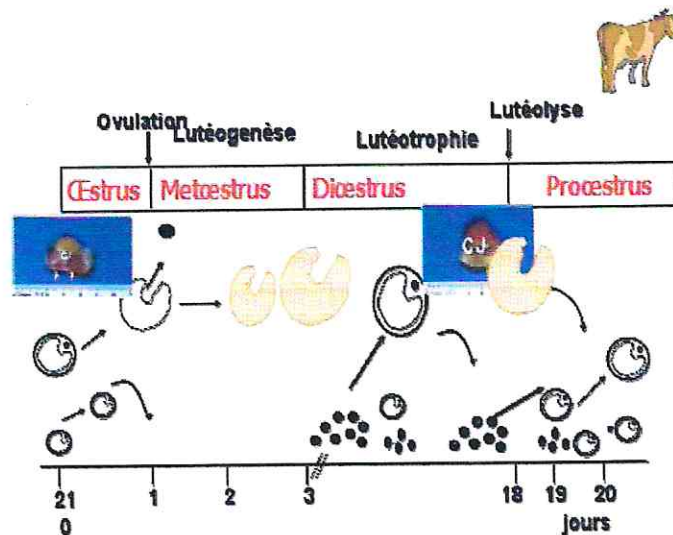


Figure n°2 : Vagues de croissance folliculaire au cours du cycle œstral de la vache (Gayrard .V, 2007).

3-3 Atrésie : (cf.figure n° 3)

Encore appelée involution folliculaire, l'atrésie constitue le devenir de la majorité (99,9%) des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle joue donc indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation ; elle peut se produire à n'importe quel moment de la folliculogénèse. L'atrésie est contrôlée par un mécanisme de mort cellulaire programmée, appelée apoptose ; par une réduction de la FSH secondaire aux sécrétions d'œstradiol et d'inhibine par le follicule dominant. (Drion PV et al,1996).

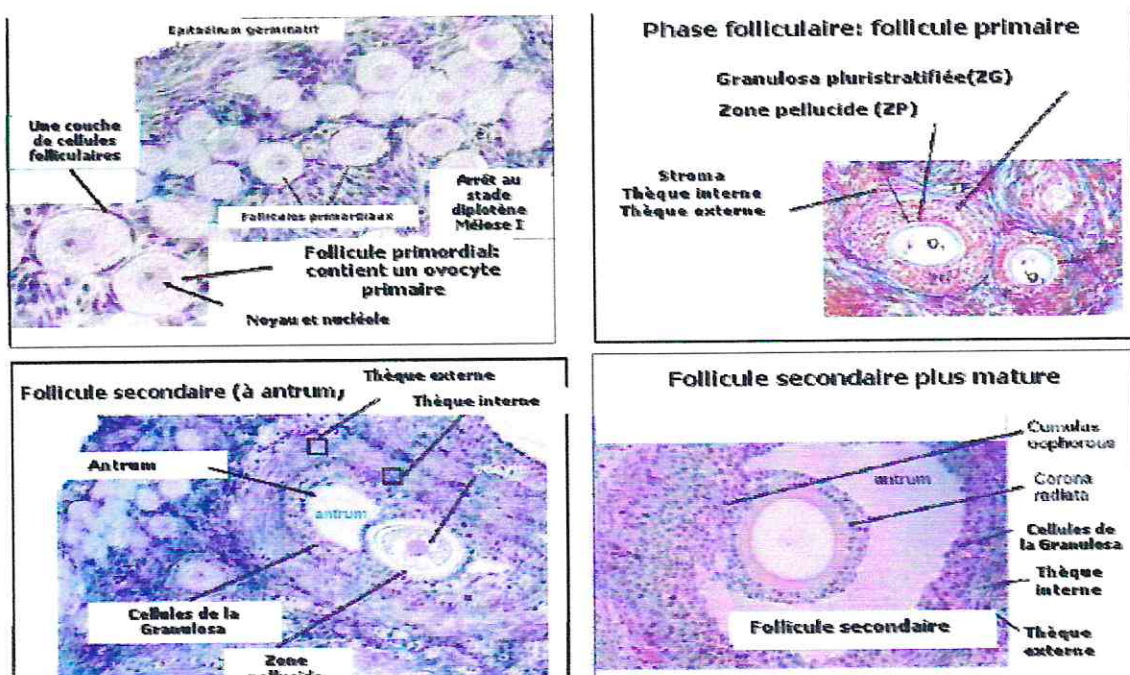


Figure n° 3 : Les différents stades de développement folliculaire (Gayrard .V,2007)

4) Maturation ovocytaire in vivo

4. a Maturation nucléaire :

La maturation nucléaire désigne les modifications observées à l'intérieur du noyau de l'ovocyte arrêté en prophase de première division de méiose jusqu'en M II .le processus dure 24h.Il commence 4 à 8h après le pic de LH(Hyttel P et al 1997) ou ,in vitro 4 à 8h après l'extraction du COC hors du follicule.la première étape visible est le stade GVB avec rupture de la membrane nucléaire et condensation de la chromatine environ après 6h de maturation, le stade MI est atteint après 12 à 19 h de maturation.

Au bout de 20h de maturation, la majorité des ovocytes sont au stade MII (Sirard et al 1989).

Les facteurs capables de stimuler la maturation nucléaire ovocytaire sont représentés par Reynaud. K ,2003 sur le tableau n°1.

Tableau n°1 : Facteurs capables de stimuler la maturation nucléaire ovocytaire (Reynaud .K, 2003)

Facteurs	Espèce	Références
EGF	souris	Downs et al, 1988
	vache	Lonergan et al, 1996
	femme	Goud et al, 1998
Activine	ratte	Sadatsuki et al, 1993
	femme	Alak et al, 1998
TGFB	ratte	Feng et al, 1988
Inhibine	vache	Stock et al, 1997
	vache	Lorenzo et al, 1994
IGF-1	femme	Nardo et al, 2001
bFGF	souris	Lapott et al, 1990
GH	vache	Izadyar et al, 1996
PACAP	ratte	Apa et al, 1997

4. b Maturation cytoplasmique :

La maturation nucléaire s'accompagne d'une série de changements ultra structuraux. chez les bovins, le cytoplasme des ovocytes immatures comporte un grand nombre de vésicules distribuées uniformément, des mitochondries en amas, des granules corticaux en périphérie, des complexes de Golgi bien développés et de grandes citernes de réticulum endoplasmique lisse(Hyttel P et al,1997 ,Kruip Tam et al,1983),il n'y a que peu d'espace

périvitellin et la pellucide se trouve en contact avec les nombreuses digitations des cellules du cumulus pour former des jonctions serrées.

Un important remodelage morphologique se produit dans le cytoplasme au cours de la maturation. Le plus remarquable consiste en la migration des organelles en son centre et donc à l'apparition d'une zone corticale qui en est exempte. Seul reste en périphérie les granules corticaux et chez les bovins, des éléments du réticulum endoplasmique lisse. 22h après le pic de LH, les granules corticaux se disposent à proximité de la membrane plasmique ovocytaire. Les jonctions serrées disparaissent et un espace péri vitellin plus important apparaît. Les facteurs capables de stimuler la maturation cytoplasmique ovocytaire sont représentés par Reynaud.K ,2003 sur le tableau n°2.

Tableau n° 2 : Facteurs capables de stimuler la maturation cytoplasmique ovocytaire (Reynaud K, 2003).

Facteurs	Espèce	Références
EGF	souris	Das et al, 1991
	vache	Loergan et al, 1996
	femme	Das et al, 1991
Kit ligand	souris	Reynaud et al, 2000
	femme	Smikle et al, 1998
Activine	Vache	Yshioka et al, 1998
IGF-1	Vache	Herrler et al, 1992
Inhibine	Vache	Stock et al, 1997

4. c Maturation membranaire :

Les cellules folliculaires vont induire l'acquisition par la zone pellucide d'une protéine ZP3. Cette protéine Mzp3 constitue le facteur d'attachement du spermatozoïde à la pellucide ; le spermatozoïde n'est donc pas capable de reconnaître l'ovocyte avant la synthèse de cette protéine et l'acquisition de cette spécificité chimique de la zone pellucide confère à l'ovocyte sa compétence membranaire pour la fécondation (Drion PV et al ,1996).

4. d Expansion du cumulus :

La population des cellules de la granulosa entourant l'ovocyte est communément appelée 'cellules du cumulus' ou cumulus oophorus. cet ensemble forme le complexe ovocyte cumulus 'COC'. Simultanément à la maturation du follicule pré ovulatoire se met en place la maturation de ce complexe.

Un des aspects de la maturation de ce dernier est l'expansion des cellules du cumulus (après 9 à 12h de maturation in vivo et 12 à 18h in vitro (Hyttel .Pet al 1989).

Cette expansion correspond à une modification de l'organisation des jonctions perméables qui lient les cellules les unes par rapport aux autres permettant ainsi les échanges intercellulaires.

Cette modification se traduit par un assouplissement des jonctions et une dissociation des cellules, conséquence de la diminution progressive des connexines 43, protéines entrant dans la composition de ces jonctions 'gap' (sutovsky P et al 1993).

L'expansion est le résultat de la production par les cellules de cumulus d'une matrice viscoélastique riche en acide hyaluronique, cette matrice permet à l'ensemble ovocyte cumulus de conserver son intégrité même après la disruption des complexes de jonction et permet donc aux cellules de cumulus de continuer à envoyer des facteurs diffusibles vers l'ovocyte en cours de maturation. De plus, ce cumulus expansé facilitera la capture de l'ovocyte par le pavillon et influencera la fécondation (Hamamah 1999).

La synthèse de l'acide hyaluronique par les cellules du cumulus et sous la dépendance de la FSH (Salustri.A et al 1985) la LH agit en levant l'effet des inhibiteurs de FSH déjà présente dans le liquide folliculaire au moment du pic ovulatoire.

Cependant certains facteurs de croissance tels l'EGF et l'IGF-I améliorent cette expansion d'où la nécessité de leur présence in vitro.

Les Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à la fécondation sont représentés par Mermillod.P ,1999 sur la figure n° 4.

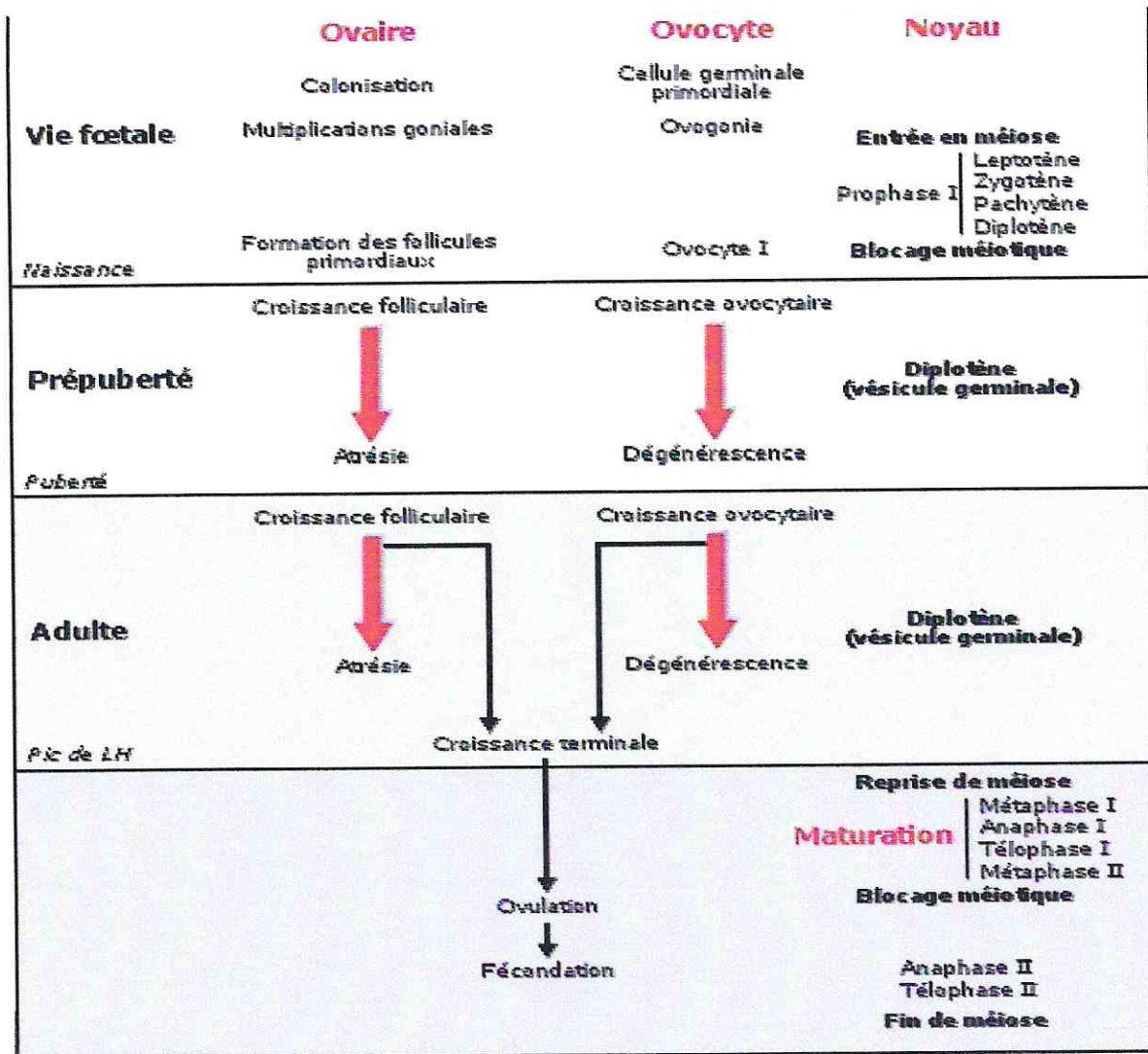


Figure n°4 : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à la fécondation (Mermillod P, 1999).

CHAPITRE II

Production d'embryons in vitro

1) Introduction :

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'assurer 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.

L'étude de certains mécanismes régulateurs impliqués dans les différentes étapes de la vie de l'ovocyte permet de tirer quelques enseignements pour la mise en œuvre des techniques de maturation in vitro.

2) Prélèvement in vitro des ovocytes :

2.a. Méthode décrite par C. Hanzen :

Le prélèvement in vitro des ovocytes est effectué après prélèvement des ovaires à l'abattoir. Il importe de réduire le temps de stockage des ovaires et de veiller à respecter des conditions de température optimales.

Les ovaires doivent être prélevés dans les deux heures suivant l'abattage de l'animal et seront stockés à une température comprise entre 24 et 30 °C. Le prélèvement des ovocytes sera effectué dans les 4 heures qui suivent le prélèvement des ovaires.

Le prélèvement des ovocytes par aspiration (trompe à eau : 1 à 2 cm de Hg) du liquide folliculaire au moyen d'une aiguille (19G à biseau court) est une des méthodes les plus anciennes. Elle permet en moyenne de récupérer 9 à 16 ovocytes par Ovaire soit 30 à 60 % des follicules ponctionnés. La dissection préalable des follicules permet l'obtention de 16 à 17 follicules par ovaire.

Cette seconde méthode offre l'avantage d'augmenter le pourcentage d'ovocytes morphologiquement normaux (60 à 63 % vs 31 à 80 %), conséquence possible du fait que la dissection permet de mieux identifier les follicules non atrétiques. Elle est cependant plus lente que la première. La découpe de l'ovaire en tranches (slicing ovary) offre pour avantage d'augmenter le nombre d'ovocytes récupérés (20 à 55 par ovaire).

D'autres méthodes ont également été envisagées comme celle impliquant la digestion préalable de l'ovaire au moyen de la trypsine (221 ovocytes par ovaire) (Hanzen 2008-2009).

2.b Méthode décrite par Blondin et Sirard :

Les ovaires bovins dans leurs différents stades de cycle de reproduction sont collectés à l'abattoir puis transportés au laboratoire dans une solution saline à une température comprise entre 30 et 35°C. La solution saline est représentée par le Na Cl 0.9% (supplémentée de 100.000 UI pénicilline, 100 mg de streptomycine et 250 ug d'amphotéricine B 250 ug). Le contenu des follicules de 1 à 5 mm est aspiré au moyen de seringue de 10 ml à 18-gauge needle. Le contenu sera versé dans des tubes de 50 ml. Après sédimentation, le COCs sera prélevé à l'aide d'un stereomicroscope (Sirard et Blondin .1996).

3) Le prélèvement in vivo : l'Ovum Pick Up (OPU)

3-1 La méthode de ponction intra vaginale :

La position anatomique des ovaires de la vache, situés au bord antérieur du bassin à une largeur de main du col de l'utérus facilite l'utilisation de la méthode dans cette espèce.

L'animal placé dans un travail de contention est éventuellement tranquilisé par une injection d'hydrochloride de détomidine (1 mg / 100kgs) (Domosedan ND) ou de xylazine (Rompun ND).

Une anesthésie locale (épidurale) permet de réduire les efforts expulsifs de l'animal. Une relaxation plus complète du rectum peut être obtenue par une injection de 4 mg / 100 kg d'hyoscine-N-butylbromide (Buscopan ND).

Les matières fécales sont évacuées du rectum. Au besoin, la vessie est vidée au moyen d'une sonde de Foley. La région vulvaire est lavée et désinfectée pour éviter tout risque de contamination des ovocytes prélevés. La sonde échographique est guidée au travers de la cavité vaginale jusqu'à son extrémité antérieure paracervicale au moyen d'un guide métallique.

L'ovaire manipulé par voie transrectale est amené sur l'extrémité de la sonde échographique. Les follicules présents sur l'ovaire apparaissent sur l'écran de l'échographe sous la forme de zones noires anéchogènes. Le déplacement de l'ovaire et / ou de la sonde permet d'ajuster la position du follicule à ponctionner sur le trajet de l'aiguille de ponction identifié par une ligne sur l'écran de l'échographe. L'aiguille est poussée vers l'avant de manière à traverser successivement la paroi vaginale puis celle du follicule.

Une fois le follicule ponctionné, le liquide folliculaire est aspiré et la zone anéchogène disparaît suite à la vidange du follicule. Après la ponction, le contenu de chaque tube de récolte est maintenu à une température de 35 à 38°C. Il est filtré et examiné pour isoler et mettre en maturation les ovocytes récupérés (Hanzen 2008-2009).

3-2 Le matériel :

Simple en apparence, la méthode de ponction échoguidée suppose néanmoins la parfaite maîtrise de divers aspects pratiqués parfois, différents selon les équipes.

- Le matériel échographique
- Les aiguilles de ponction
- Le rinçage de la cavité folliculaire
- Les tubulures de connexion
- La pression d'aspiration
- Le milieu de récolte

3-3 Intérêt de l'OPU :

La technique de l'OPU-FIV présente trois intérêts principaux pour la sélection.

- ✓ à raison de deux sessions d'OPU par semaine est d'environ 1.5 embryons transférables par session, le nombre de veaux qui peut être obtenu par unité de temps est pratiquement multiplié par quatre par rapport au nombre de veaux produits après super ovulation et collecte classique.
- ✓ le deuxième intérêt est que l'OPU-FIV permet de réaliser des accouplements in vitro et donc de mieux planifier le choix des reproducteurs males.
- ✓ le troisième intérêt potentiel de l'OPU-FIV est l'obtention des descendants des femelles qui ne répondent pas à la super ovulation.
- ✓ l'OPU-FIV est incontestablement une technique dont peuvent en bénéficier les schémas d'amélioration génétique des reproducteurs (C.Hanzen, 2008-2009).

4) Collecte et sélection :

Il existe plusieurs systèmes de récolte des ovocytes et embryons en vue d'une PIV.

Sur l'animal vivant, la laparoscopie (Sirard et Lambert .1986) permet de visualiser l'intérieur de l'abdomen alors que la technique «ovum pick-up» (OPU) utilise l'échographie pour sélectionner les follicules à ponctionner (Kruip et al.1991).

L'application de cette dernière technique généralement associée à un traitement hormonal est néanmoins critiquée. En effet, la fréquence des ponctions doit être étudiée pour ne pas affecter la qualité et le rendement en ovocytes (McEvoy et al.2006). L'optimisation de la ponction du COC a été étudiée chez le mouton, impliquant le choix du matériel utilisé et la pression d'aspiration (Rodriguez et al.2006).Récouter les COCs après abattage de l'animal, ne compromet pas la qualité de l'ovocyte (Blondin et al.1997). En cas de besoin de stockage des ovaires entre le moment de l'abattage et de la collecte du COC, la température doit être

contrôlée. Alors que la qualité du COC chez la vache ne semble pas affectée par un stockage d'une durée de 24 h à une température de 10°C suivi d'une maturation in vitro avec sérum, elle diminue lorsque la température est de 0°C (Matsushita et al.2004) ou de 37-39°C (Nakao et Nakatsuji.1992).

Lorsque la dimension des follicules nécessite une grande exactitude, la collecte des Ovocytes se fait généralement après dissection et mesure du follicule (Lequarre et al.2005). Les différentes méthodes de récolte de l'ovocyte permettent de jouer sur la maturité du follicule en se basant sur la taille folliculaire, le statut folliculaire ou le traitement hormonal (Mourot M. 2006).

La sélection des COCs est fréquemment basée sur sa morphologie. Ainsi, après Leibfried et First (1979), plusieurs auteurs ont proposé une classification des COCs en se référant à l'aspect et au nombre des couches de cellules du cumulus entourant l'ovocyte ainsi que sur l'aspect de l'ovocyte lui-même. Généralement, les ovocytes désignés comme les plus compétents sont décrits avec un cytoplasme homogène légèrement granulé et entourés par moins de trois couches de cellules de cumulus. Pourtant les caractéristiques morphologiques de l'ovocyte ne semblent pas toujours suffisantes pour prédire son niveau de compétence (Hagmann et al.1999, Vassena et al.2003). Blondin et Sirard (1995) ont travaillé sur des follicules de 2 à 18 mm de diamètre et ont proposé 6 classes de COCs indépendamment de la taille folliculaire en se fiant au nombre de couches de cellules du cumulus, au niveau d'atrésie et à l'aspect du cumulus et de l'ooplasmе. Ils ont conclu à une plus forte compétence des classes 1, 2 et 3 correspondant à des COCs non atrétiques ou en début d'atrésie, possédant au moins trois couches de cellules et un cytoplasme homogène.

4.a Critères de détermination selon C. Hanzen :

La sélection des ovocytes repose essentiellement sur des critères morphologiques (microscope optique) ou ultra structurels (microscope électronique) du Cumulus Oocyte Complexe (COC). Les ovocytes bovins immatures peuvent être répartis en 4 catégories selon le degré de compacité des cellules du cumulus et de transparence de l'ooplasmе. Il semble évident que les différences éventuellement identifiées lors de l'examen peuvent être attribuées à des stades divers de maturation, celle-ci s'accompagnant d'importantes modifications de surface et donc de contact entre l'ovocyte proprement dit et les cellules du cumulus :

1. Le COC a un aspect transparent. Le cumulus (cellules de la granuleuse) est compact et entoure complètement l'ovocyte. L'ooplasmе ovocytaire a un aspect homogène.
2. Le COC a le même aspect que dans la classe 1 mais l'ooplasmе a un aspect plus irrégulier, une zone plus Sombre pouvant être visible à sa périphérie.

3. L'ensemble du COC est sombre, le cumulus est moins compact, l'ooplasm est plus irrégulier et présente des Amas plus sombres.

4. Le cumulus est complètement expansé voire absent (ovocytes nus : naked oocytes).

La présence du cumulus pendant au moins 12 heures est plus essentielle à la maturation cytoplasmique de l'ovocyte qu'à sa maturation nucléaire. Une preuve indirecte en est donnée par l'effet positif exercé par l'addition de cellules de la granuleuse au milieu de maturation des ovocytes. A l'inverse, les ovocytes nus sont beaucoup moins fertiles.

5) Maturation ovocytaire in vitro :

Divers méthodes ont été proposées. Une première possibilité est de réaliser cette maturation ovocytaire en plaçant les follicules disséqués dans un milieu de culture. Cette méthode réservée aux follicules de petit diamètre (1 à 2 mm) requiert une expérience certaine. Dans l'espèce équine certains auteurs ont avec succès réussi le transfert d'ovocytes sur des follicules pré ovulatoires de juments, celles-ci étant ensuite récoltées après insémination. Habituellement, les ovocytes sont Placés en maturation par groupe de 10 à 20 dans des micros puits renfermant de 50 à 100 microlitres de milieu.

Il est bien démontré que la température de maturation ovocytaire comme celle assurant une pénétration optimale des spermatozoïdes lors de la fécondation est de 39°C. La maturation in vitro des ovocytes est soumise à l'influence de nombreux facteurs dont la plupart restent à préciser. En effet, alors qu'en moyenne 60 à 85 % des ovocytes maturés in vitro sont fécondés et se divisent, seuls 25 à 30 % atteignent le stade blastocyste. La réussite de la MIV dépend de nombreux facteurs dont un des plus importants est la technique de stade blastocyste. La réussite de la MIV dépend de nombreux facteurs dont un des plus importants est la technique de maturation et en particulier la composition du milieu de culture utilisé. En effet, 50,3 % des ovocytes maturés in vivo atteignent après fécondation in vitro le stade de blastocyste. Lors de maturation in vitro ce pourcentage est de 29,8 %.

5-1 Milieux de culture :

La plupart des milieux de culture cellulaires sont aptes à assurer la maturation ovocytaire et la réaction acrosomique des spermatozoïdes. Il en est de simples et de complexes. Les plus couramment employés sont le milieu 199, le TALP (Tyrode Albumine lactate pyruvate) et le Krebs Ringer bicarbonate. Le plus souvent, les milieux de maturation renferme du sérum Celui ci peut être du sérum foetal (FCS Fetus Calf Serum), de taureau castré, de vache superovulée, en prooestrus ou en oestrus ECS : Estrus Cow Serum). L'origine du sérum utilisé ne semble pas influencer les résultats obtenus. De même, l'addition de liquide folliculaire (bFF : bovine Follicular Fluid) à la concentration maximale de 20 % a

également été préconisée. A plus forte concentration, ce liquide aurait un effet inhibiteur sur la reprise de la méiose et donc empêcherait la maturation ovocytaire. Compte tenu des risques sanitaires que comportent l'utilisation de sérum (BSE), des substituts de sérum ont été recommandés (Exemple : l'Ultroser G). Le problème réside dans la détermination aussi précise que possible de leur composition quantitative et qualitative. De même et pour les mêmes raisons, des essais de maturation dans des milieux ne renfermant pas de sérum ont été envisagés. L'addition de cellules de la granuleuse voire de cellules thécales, provenant éventuellement d'autres espèces a également été recommandée. L'addition de substances tampons (bicarbonate, pyruvate, lactate et glucose) dépendra notamment de la mise en place ou non de ces milieux dans une étuve exposée à l'air ou à un flux de CO₂. Les milieux seront exempts d'endotoxines.

Les milieux plus complexes renferment en outre divers acides aminés (glycine présente à grandes concentrations dans l'oviducte) et des vitamines (acide ascorbique au pouvoir antioxydant), de l'albumine, des antibiotiques (pénicilline G, aminosides), des agents inophores de l'adrénaline pour ses effets de capacitation et de stimulation de la mobilité des spermatozoïdes, de la caféine ou de la théophylline pour également leurs effets de stimulation de la mobilité des spermatozoïdes ou le plus souvent de l'héparine (effet de capacitation). Cette glycosaminoglycane est présente dans le milieu folliculaire. Elle favorise la capacitation à faibles doses mais l'inhibe à doses élevées. Ces milieux simples ou complexes se distinguent par la concentration de leurs constituants. Les uns comme les autres doivent être préparés au moyen d'une eau ultra pure, distillée, désionisée et débarrassée de ses germes et éléments pyrogènes (Système Millipore). Leur pH doit être ajusté à 7.4 et leur pression osmotique sera comprise entre 280 et 300 mOsmoles/kg d'eau.

La plupart des auteurs démontrent l'importance d'une *complémentation hormonale*. L'efficacité de l'addition d'hormone LH a été reconnue. L'addition de FSH serait plus de nature à favoriser les premiers stades du développement embryonnaire que la phase de maturation proprement dite. La prolactine serait sans effet. Dans l'espèce porcine, certains auteurs ont observé un effet favorable de l'insuline et de l'hormone de croissance. Le rôle potentiel de l'inhibine, de l'activine, de l'ocytocine, des cytokines et des facteurs de croissance restent à démontrer. (C.Hanzen 2008-2009).

5-2 Principes généraux :

Les conditions de maturation doivent être observées avec précision : température, osmolarité (de 275-285 mOsmoles par Kg d'eau), pH (7.2), teneur en oxygène et dioxyde de

carbone, volume du milieu, durée de maturation, densité des ovocytes incubés semblent être les critères les plus importants.

Les ovocytes de ruminants et de porcs, sont incubées a 38.5°C ou 39°C, sous 5% de Co2 dans l'air (incubateur à Co2) (Bryuere G.2002), contrairement à ce qui a été démontré pour la culture de l'embryon bovin, la réduction des taux d'oxygène de 20%(taux dans l'air) à 5% pendant la MIV n'a pas permis d'améliorer les résultats (Watson et al.2000).

Une faible pression en oxygène du milieu devient alors bénéfique avec une meilleure compétence au développement des ovocytes maturés sous 5% d'O2 (Hashimoto et al.2000).

L'osmolarité doit être contrôlée. En effet à partir de 315 mOsmoles par Kg d'eau, il y'a mort des ovocytes bovins (Guyader 1998), l'utilisation de la lumière doit être réduit autant que possible ce qui permet de limiter le stress induit par l'exposition des cellules à la lumière (Bryuere G 2002).

5-3 Méthodes de culture :

Les Co-cultures sur cellules folliculaires (cellules de la granulosa) ont été développées et sont largement utilisées chez les ruminants et le porc.

De nombreuses études ont montré l'effet positif de la présence de cellules du cumulus : les COCs sont plus aptes à maturer in vitro que les ovocytes dénudés (Bryuere G.2002).

Les cellules de granulosa sont prélevées par aspiration du contenu des follicules lors de la collecte des COCs puis mises en culture dans le milieu de maturation. On en compte entre 10^6 et $7.5 \cdot 10^6$ par ml de milieu. Elles sont utilisées soit en suspension (système non statique) soit en monocouche (système statique). Il semblerait que le système optimum soit le système non statique chez les bovins (taux de blastocystes maximum), le système statique comportant de trop nombreuses cellules et ayant un effet délétère sur les ovocytes. Rappelons que ces cellules somatiques doivent être actives pour exercer leurs activités endocrines, paracrines et autocrines et nécessitent par la même des substrats énergétiques (Nagai 2001).

Le volume de milieu de maturation varie selon les équipes de 10 microlitres (microgouttes sous huile minérale) à 1 ml (plaques multipuits), l'huile minérale (paraffine) évite l'évaporation et les modifications de pression osmotique consécutive, le nombre d'ovocytes par puits ou gouttes varie de 1(goutte de 10 microlitres) à plusieurs dizaines (puits de 1 ml).les systèmes de cultures individuels, en milieu chimiquement défini, semblent être déficients : l'absence d'interactions ovocytaires pénaliserait la maturation cytoplasmique des ovocytes bovins (Fukui Y et al .2000).on parle d'effet de groupe.

5-4 Evaluation de la maturation ovocytaire :

In vitro, l'ovocyte placé dans des conditions optimales et donc soustrait à l'influence inhibitrice du milieu folliculaire et de L'OMI (Oocyte Maturation Inhibiting factor) en particulier, reprend spontanément sa division méiotique.

L'expulsion du premier globule polaire (fin de la maturation) prend habituellement 18 à 24 heures. Elle peut néanmoins déjà s'observer après 3 à 12 heures de culture. On peut à ce moment aisément différencier la membrane pellucide, le noyau, et l'espace périvitellin renfermant le premier globule polaire. Morphologiquement, les cellules du cumulus apparaissent beaucoup plus dispersées (trois fois le diamètre de l'ovocyte c'est-à-dire plus de 300 microns) (=cumulus expansion) sous l'effet semble-t-il de l'acide hyaluronique sécrété par les cellules de la granuleuse en réponse à la libération de l'hormone LH. Cette expansion s'accompagne également d'une mucification plus intense des cellules. Elle facilite l'ovulation et le passage des spermatozoïdes. L'absence de globule polaire n'implique pas nécessairement l'absence de maturation nucléaire au sein du noyau on peut observer également la migration centrale des vésicules, mitochondries et autres gouttelettes lipidiques, donnant à ce dernier un aspect plus condensé. Il est cependant difficile de conclure à la maturation de l'ovocyte sur son seul examen morphologique. Un complément d'information sera obtenu après coloration à base d'une solution de Tyrode et de fuchsine. Le critère définitif sera néanmoins le développement de l'ovocyte fécondé jusqu'au stade blastocyste (C.Hanzen 2008-2009).

6) La fécondation in vitro :

6-1 Capacitation des spermatozoïdes et fécondation in vitro :

La capacitation est un processus spécifique à l'espèce rendant le spermatozoïde apte à la fécondation. Il a chez les bovins une durée comprise entre 4 et 6 heures. Il comporte essentiellement une augmentation de la mobilité et du type de déplacement du spermatozoïde et des phénomènes membranaires dont la réaction acrosomique dans laquelle est largement impliqué le calcium (C.Hanzen 2008-2009).

6-2 Capacitation des spermatozoïdes in vivo :

La capacitation a lieu uniquement dans l'utérus et dans les trompes (Thibault 2001). C'est essentiellement par l'enlèvement des protéines déposées sur la membrane des spermatozoïdes dans l'épididyme et/ou apportées par les glandes annexes et l'enlèvement d'une partie du cholestérol intercalé entre les phospholipides membranaires, que le spermatozoïde devient capable (Hamamah 1999).

6-3 Capacitation in vitro :

La capacitation se produit quand sont présents dans le milieu de suspension des spermatozoïdes un glycosaminoglycane, l'héparine et de l'albumine sérique, accepteur du cholestérol (Hamamah 1999).

Divers techniques de capacitation in vitro ont été mises au point. Ainsi l'addition d'héparine dans le milieu de culture est couramment utilisée pour capaciter les spermatozoïdes de taureau (Parrish et al.1985).

Dans une population de spermatozoïdes soumise a un traitement de capacitation, on ignore le pourcentage (probablement faible) de ceux qui sont réellement capités. Cela conduit à inséminer les ovocytes avec un nombre incomparablement plus élevé de spermatozoïdes de celui qui existe in vivo.il en résulte un taux de polyspermie très largement supérieur (ruminants 10-20%, porc 50%) à celui que l'on observe in vivo (1%).

La capacitation incomplète des spermatozoïdes au moment de l'insémination peut entraîner un retard de fécondation de plusieurs heures, conduisant à un vieillissement des ovocytes en culture qui est préjudiciable au développement ultérieur (Galli et Moor.1991).la meilleure méthode pour évaluer l'efficacité d'un système de capacitation est de contrôler le moment de la fécondation après la mise en contact des gamètes.

Chez la vache après capacitation des spermatozoïdes en présence d'héparine, 40% environ des œufs sont fécondés dans les 8 heures qui suivent l'insémination (Leibfried-Rutledge et al.1989).

Les conditions de la fécondation sont aussi très importantes. On sait que la température est un facteur déterminant, comme pour la MIV, la température optimale pour réaliser la FIV Chez les espèces domestiques est de 39°C (Crozet .1992).

6-4 Fécondation proprement dite :

Le milieu de fécondation le plus utilisé chez les bovins est le TALP (Tyrode albumine lactate pyruvate) avec un pH de 7.4 et une pression osmotique comprise entre 280 et 350 mOsmoles (Guérin et al.1996), il permet la fécondation mais également la fin de la capacitation et les premiers stades de développement embryonnaire, rôle assuré in vivo par les sécrétions tubaires. On incorpore a ce milieu de l'hypotaurine (Guérin et al.1995), de la pénicillamine et de l'épinephrine (Bryuere 2002).

La fécondation est réalisée dans une goutte de 50 à 100 microlitres de milieu sous huile de paraffine ou minérale pour éviter toute évaporation.

Chaque goutte renferme une vingtaine d'ovocytes et environ 100.000 spermatozoïdes (2 millions par ml). L'incubation dure 18 heures à 39°C dans une atmosphère d'air renfermant

5% de CO₂. L'atmosphère sera également saturée d'humidité pour éviter toute évaporation du milieu. Une augmentation du temps de l'incubation est un facteur de risque de polyspermie. Il est important par ailleurs que le laboratoire soit maintenu à une température comprise entre 25 et 30°C (C.Hanzen.2008-2009).

7) La culture des embryons :

La culture des embryons est une étape cruciale de la production d'embryons. Chez les mammifères domestiques, c'est au stade blastocyste que l'embryon est transférable dans l'utérus de la femelle porteuse, la culture jusqu'à ce stade embryonnaire est donc indispensable. Elle a en outre un effet de sélection en permettant l'élimination des embryons non viables (porteurs d'anomalies chromosomiques, géniques ou biochimique). De plus, au stade blastocyste, l'embryon est plus apte à supporter la congélation/décongélation, sans doute du fait de la petite taille des blastomères. La culture de l'embryon pendant plusieurs jours, indispensable peut suivre plusieurs protocoles (Bryuere 2002).

7-1 Culture d'embryon in vivo :

Le transfert des embryons in vivo dans des *oviductes de lapine ou de brebis* ne présente plus à l'heure actuelle qu'un intérêt Historique. Ces méthodes ont néanmoins permis de mieux comprendre la physiologie des premiers stades du développement embryonnaire. Ainsi, 5 à 20 embryons étaient transférés dans l'oviducte ligaturé d'une lapine, ils en étaient récupérés après 3 à 7 jours.

Des résultats semblables ont été obtenus après transfert d'embryons dans des oviductes (10 à 50 embryons par oviducte) de brebis préalablement synchronisées au moyen d'une éponge vaginale et d'une injection de PMSG, les embryons étant introduits après ligature des oviductes un à deux jours après l'ovulation. De différentes études réalisées (55.797 embryons transférés), il apparaît que 56 % des embryons peuvent être récupérés après une semaine, 24 % d'entre eux ayant franchi la phase de blocage et atteint le stade morula-blastocyste.

D'autres méthodes ont également été évaluées : transfert à des oviductes de vaches ou à des femelles bovines pré pubères, culture dans le sac amniotique d'embryons de poulet (C.Hanzen.2008-2009).

7-2 Culture d'embryon in vitro :

Les embryons ne peuvent se développer dans les milieux traditionnellement utilisés pour les cultures cellulaires. Il leur faut Pour franchir avec succès la phase de blocage, être cultivés en présence de cellules (ou de leur produit de sécrétion) d'origine le plus souvent tubaire ou autre : c'est la coculture.

Certaines méthodes ont recours à des milieux chimiquement définis se rapprochant le plus de la composition des sécrétions tubaires. Ce sont des milieux salins additionnés d'acides aminés tels que le SOF (Synthetic oviductal fluid), le CR1 (milieu de Rosenkrans) ou le BMOC-3 (milieu de Brinster).

La culture des embryons dans ce type de milieu permet de mesurer directement l'impact de divers facteurs sur le développement embryonnaire sans qu'il y ait besoin de prendre en considération l'effet des cellules.

En coculture, les embryons sont placés en contact avec un substrat nourricier (cellules feeder). Ces cellules peuvent être trophoblastiques, tubaires, cellules de la granuleuse ou somatiques.

Ces dernières telles les MDBK (Madin darby bovine kidney), BRL (Buffalo rat liver) ou VERO (Cellules de rein de singe vert) offrent l'avantage de pouvoir être contrôlées sur le plan sanitaire (absence de virus IBR ou BVD) ce qui n'est pas le cas des autres types cellulaires, le plus souvent prélevées à l'abattoir. Ces cellules sont placées en culture dans un milieu (le plus souvent le milieu M-199) ajouté parfois d'OCS ou de divers facteurs de croissance tels (l'IGF, le TGF, l'EGF, l'insuline...) (C.Hanzen.2008-2009).

Partie

Expérimentale

1. INTRODUCTION :

Sous une forme chronologique, la production d'embryons in vitro présente les différentes étapes entre la collecte d'ovocytes et l'obtention in vitro d'embryons transférables à savoir : la collecte d'ovocytes à partir d'ovaires de vaches abattus ou bien par la technique OPU l'évaluation de leur qualité, leur maturation et fécondation in vitro, la préparation des spermatozoïdes puis la culture des embryons obtenus.

Notre travail a porté sur la récolte d'ovocytes à partir d'ovaires issus de 36 vaches d'abattoir (race : Holstein, Montbéliarde, et races croisées) et réaliser leur classification, tout en prenant en considération l'influence de certains paramètres tels : l'âge, la race, et l'état d'embonpoint.

2. Matériels et méthodes :

2-1 Matériels :

2.1. a Les ovaires :

Les ovaires sont collectés au niveau de l'abattoir de Blida. Ils sont ensuite transférés dans les 2 heures qui suivent la récolte au niveau de la station expérimentale de l'université Saad Dahlab de Blida.

Nous avons collecté 72 ovaires (droit et gauche) et récupéré 618 ovocytes .

2.1. b Matériels :

Le matériel utilisé pour la récolte des ovaires, la ponction des follicules, et la classification des ovocytes récoltés comporte :

- ❖ Ciseaux.
- ❖ Sachets de congélation.
- ❖ Glacière contenant de l'eau tiède pour la préservation et le transport des ovaires.
- ❖ Thermomètre pour le contrôle de la température pendant le transport des ovaires.
- ❖ Seringues stériles et aiguilles (G : 18) pour la ponction des follicules.
- ❖ Boîtes de pétri quadrillées pour faciliter le comptage des ovocytes récoltés.
- ❖ Eau physiologique (NaCl 0.9 %).
- ❖ Microscope inversé.

Le matériel utilisé est représenté par les photos n°1 et n°2.



Photo n°1 : le matériel utilisé pour la récolte des ovocytes

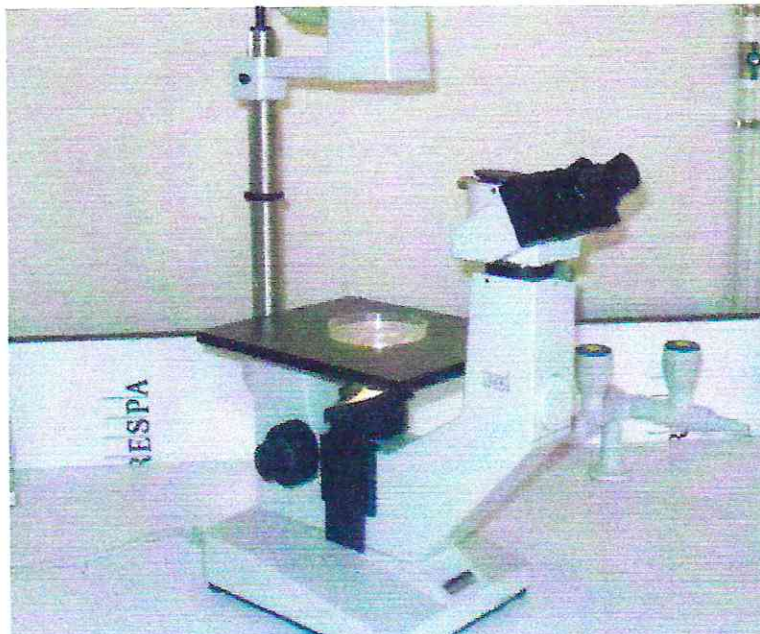


Photo n° 2 : microscope inversé

2-2 Méthode de travail :

Notre travail consiste en :

- ❖ l'identification de l'âge de l'animal
- ❖ La race
- ❖ L'état d'embonpoint
- ❖ la collecte des ovaires.
- ❖ la récolte et la classification des ovocytes au niveau du laboratoire.

2.2.a Collecte des ovaires :

Avant d'aller à l'abattoir une glacière contenant des sachets de congélation remplis d'eau tiède de 30 à 35 °C est préparée pour maintenir une température optimale durant le transport. Le contrôle de la température est permis à l'aide d'un thermomètre placé à l'intérieur de la glacière.

Les ovaires sont prélevés à l'abattoir de Blida de façon propre et dans les 2 heures qui suivent l'abattage de la vache, ces derniers sont ensuite placés dans la glacière et transportés jusqu'à la station expérimentale.

2.2.b La récolte par ponction ovarienne et classification des ovocytes :

La récolte des ovocytes par ponction ovarienne doit se faire dans les 04 heures suivant la récupération des ovaires. La ponction se fait à l'aide de seringue, ovaire maintenu entre les 02 doigts en appliquant une légère pression pour mettre en évidence les follicules. Le liquide folliculaire récupéré est versé dans des boîtes de pétri quadrillées facilitant le comptage et la classification des ovocytes au microscope inversé, à grossissement (G x10) puis (G x 40). C'est à la classification de C.Hanzen qu'on s'est référé au cours de notre travail.

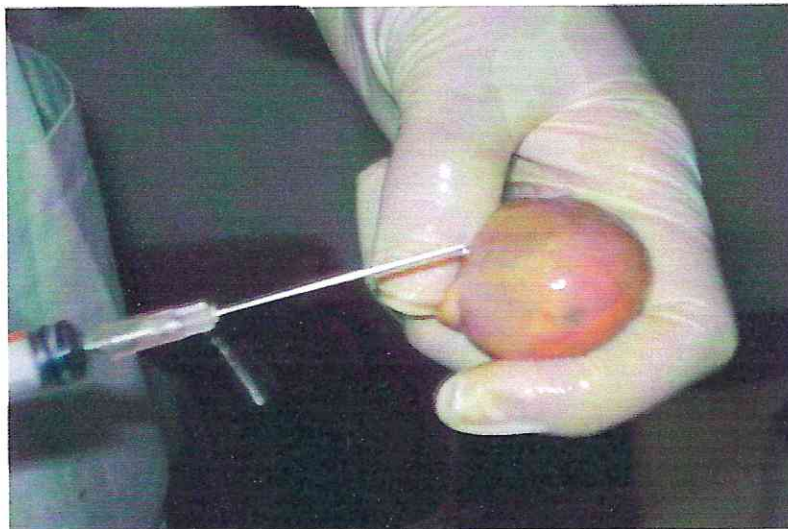


Photo n°3 : ponction folliculaire

3. **Résultats** : nous avons illustré nos résultats sous formes de tableaux et d'histogrammes, représentés ci-dessous.

Récolte	Nombre D'ovaires	Nombre et taux de follicules En fonction de la taille		Nombre D'ovocytes récoltés	Taux D'ovocytes récoltés (%)
		< 6 mm n(%)	>6 mm n(%)		
1	06	88 (95.65)	04 (4.34)	47	51.08
2	04	45 (80.35)	11 (19.64)	35	62.5
3	06	82 (91.11)	08 (8.88)	52	57.77
4	08	90 (90)	10 (10)	75	75
5	10	80 (91.95)	07 (8.04)	80	91.95
6	10	75 (86.20)	12 (13.79)	74	85.05
7	12	183 (96.82)	06 (3.17)	121	64.02
8	04	42 (93.33)	03 (6.66)	44	97.77
9	10	70 (87.5)	10 (12.5)	64	80
10	02	20 (86.95)	03 (13.04)	26	113.04
Total	72	775 (91.28)	74 (8.71)	618	72.79

Tableau I : Illustration des résultats obtenus au cours de notre travail.

Le tableau ci-dessus représente les résultats obtenus au cours des 10 récoltes réalisées .Sur les 72 ovaires collectés, 618 ovocytes ont été récupérés suite aux ponctions de 849 follicules, ce qui représente un taux de récupération de 72,79%.Le taux de follicules de grandes tailles (supérieurs à 6 mm) est de 8,71% , il est largement inférieur à celui des follicules de petites tailles (inférieurs à 6 mm) représenté par un taux de 91,28%.

Tableau II : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de la race des vaches abattus.

Nombre de vaches	Race	Nombre et taux d'ovocytes récupérés Selon les classes				Total
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	
17	Holstein	53 (14.44)	105 (28.61)	133 (36.23)	70 (19.07)	376
		(43.05)		(55.3)		
14	Montbéliarde	27 (14.51)	49 (26.34)	73 (39.24)	37 (19.89)	186
		(40.85)		(59.13)		
06	Autres	(13.84)	(26.15)	(43.07)	(16.92)	65
		(39.99)		(53.99)		

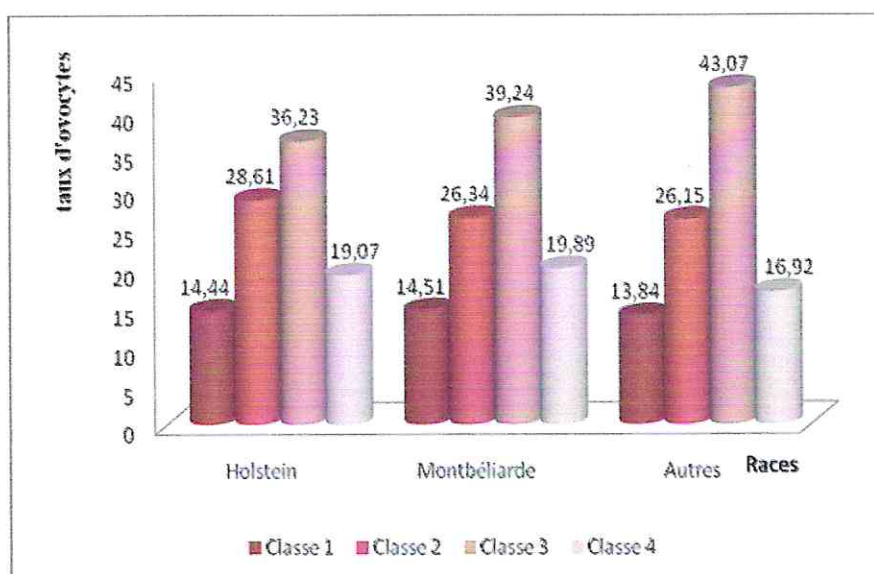


Figure n° 5: Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de la race des animaux abattus.

Le taux de récupération d'ovocytes de classe 1 et classe 2 qui représentent les ovocytes de bonne qualité chez la race Holstein est de 43,05%, contre un taux de 55,3% de classe 3 et classe 4 qui représentent les ovocytes de mauvaise qualité. Pour la race montbéliarde le taux d'ovocytes de bonne qualité est de 40,85% contre 59,13% pour les ovocytes de mauvaise qualité. En ce qui concerne les autres races croisées le taux de récupération d'ovocytes de bonne qualité et de mauvaise qualité est respectivement de 39,99% et 53,99%.

Tableau III : le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'âge des animaux abattus

Nombre de vaches	classe Age	Nombre et taux d'ovocytes récupérés selon Les classes				Total
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	
03	14 mois à 24 mois	09 (11.68)	29 (37.66)	23 (29.87)	16 (20.77)	77
		49.34		50.64		
07	36 mois	25 (20.83)	38 (31.66)	39 (32.5)	18 (15)	120
		52.49		47.5		
10	48 mois	42 (21.76)	98 (50.77)	39 (20.20)	14 (7.25)	193
		72.53		27.45		
08	60 mois	35 (21.08)	67 (40.36)	53 (31.92)	11 (6.62)	166
		61.44		38.54		
05	72 mois à 84 mois	02 (5.12)	14 (35.89)	16 (41.02)	07 (17.94)	39
		41.01		58.96		
03	96 mois à 108 mois	04 (17.39)	05 (21.73)	09 (39.13)	05 (21.73)	23
		39.12		60.86		

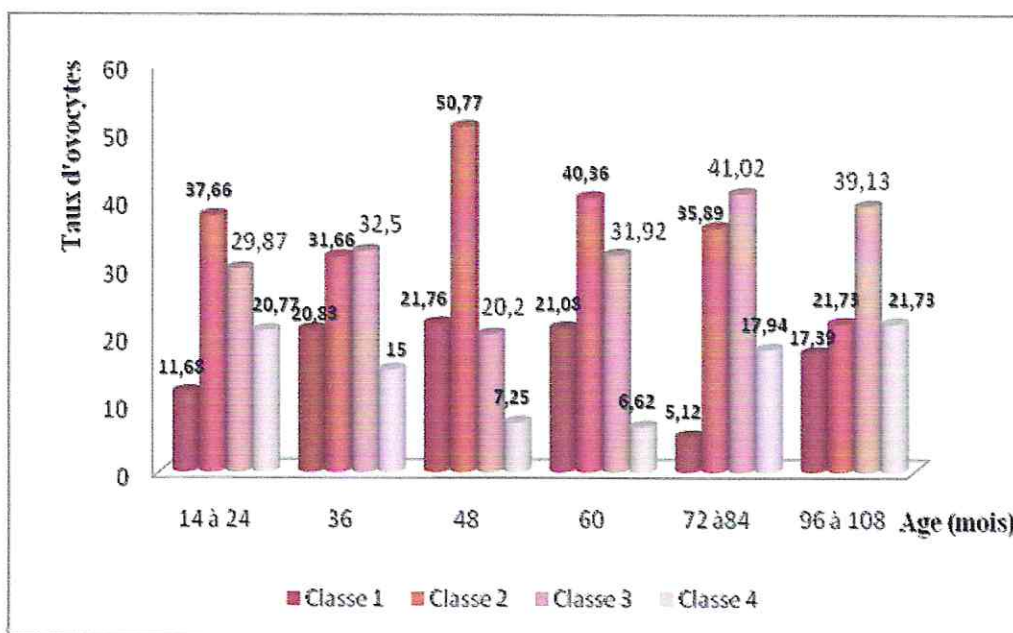


Figure n° 6: Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'âge des animaux abattus.

Le taux d'ovocytes de bonne qualité en fonction de l'âge des animaux est de 72,53% et 61,44% représenté par la tranche d'âge de 48 à 60 mois contre un taux de 27,45% et 38,54% pour les ovocytes de mauvaise qualité.

Pour les vaches âgées de 14 à 24 mois le taux d'ovocytes de bonne qualité a été estimé à 49,34% contre 50,64% pour les ovocytes de mauvaise qualité et respectivement un taux de 52,49% et 47,5% d'ovocytes de bonne et de mauvaise qualité pour les vaches âgées de 36 mois

Tableau IV : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'état d'embonpoint des vaches abattus.

		Nombre et taux d'ovocytes récupérés selon Les classes				Total
Nombre de vaches	Classe	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	618
	Etat corporel					
04	2	10 (9.80)	21 (20.58)	38 (37.25)	33 (32.35)	102
		30.38		69.6		
12	2.5	53 (24.88)	68 (31.92)	56 (26.29)	36 (16.90)	213
		56.8		43.19		
17	3.5	59 (23.50)	83 (33.06)	77 (30.67)	32 (12.74)	251
		56.56		43.41		
03	4	13 (25)	20 (38.46)	11 (21.15)	08 (15.38)	52
		63.46		36.53		

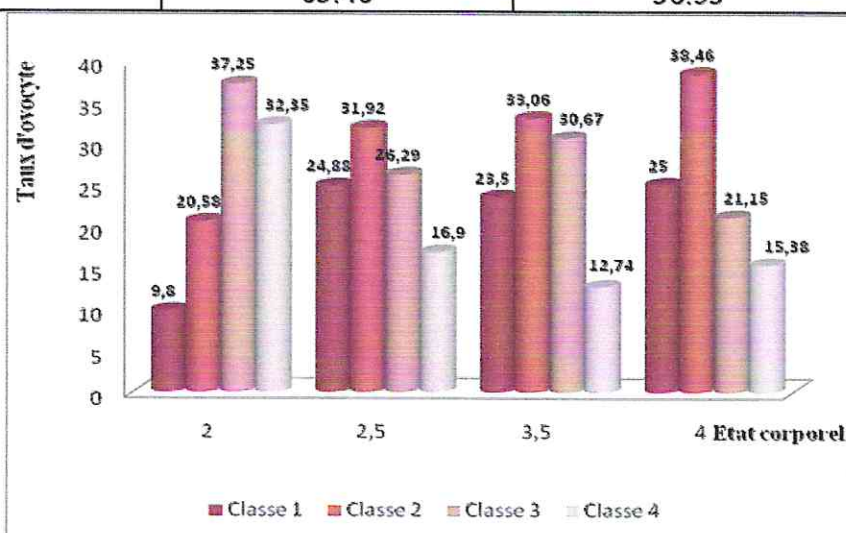


Figure n° 7: Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'état d'embonpoint des animaux abattus.

On note que le meilleur taux d'ovocytes de bonne qualité est celui des vaches dont l'état corporel est de 4 et qui est de 63,46% suivit des taux de 56,8% et 56,56% qui sont respectivement ceux des vaches dont l'état corporel est de 3,5 et 2,5. le taux le plus bas est noté chez les vaches avec un état corporel de 2.

On constate en revanche que le taux le plus élevé d'ovocytes de mauvaise qualité et qui est de 69,6% correspond aux vaches dont l'état corporel est de 2, puis ceux des vaches avec un état corporel de 2,5, 3,5, 4 dont les taux sont respectivement de 43,19%, 43,41% et 36,53%.

Photos des différentes classes d'ovocytes (photos personnelles) :



Photo n° 4 : ovocyte classe 1



Photo n° 5: ovocyte classe 2



Photo n° 6 : ovocyte classe 3



Photo n° 7 : ovocyte classe 4

DISCUSSION

Dans notre partie expérimentale ,les résultats obtenus après récupération des ovocytes par ponction folliculaire sont estimés à un taux de (72,79 %) avec une moyenne de récupération de(8,58 %)ovocytes par ovaire ,résultats comparables à ceux de Shioya et ses collaborateurs (1988) qui ont estimé le taux de récupération à(74,30 %)et à ceux de C.Hanzen lors de son travail réalisé sur des ovaires d'abattoir avec un taux compris entre(30-60 %) avec une moyenne de récolte de 9-16 ovocytes par ovaire, ainsi qu'aux résultats déjà obtenus par(Khellaf .M ,Boukhalfa.M ,2006) et (Abdelli .L ,2007)qui ont estimé respectivement le taux de récupération à(67,07 %) et (71 ,34 %) avec une moyenne de 8,54% et 7,7 % ovocytes par ovaire.

Lors de l'étude de l'influence des paramètres races, âge, et état corporel sur la qualité des ovocytes, nous avons constaté que le taux le plus important d'ovocytes de bonne qualité a été estimé à (43,05 %) chez la race Holstein, suivit de (40,85%) chez la Montbéliarde et de (39,99%) chez les autres races croisées. En revanche le taux d'ovocytes de mauvaise qualité le plus élevé a été évalué à(59,13%)et(59,99 %)chez la race Montbéliarde et les races croisées et en fin de(55,3 %)chez la Holstein , contrairement aux résultats obtenus par (Abdelli.L)qui a estimé le taux d'ovocytes de bonne qualité le plus élevé chez la race Montbéliarde avec (46,59 %)et le taux d'ovocytes de mauvaise qualité le plus important estimé à(67,78 %)chez la Holstein.

En ce qui concerne le paramètre âge le taux le plus important d'ovocytes de bonne qualité a été attribué à la tranche d'âge de 48-60 mois avec des taux de (72,53%) et (61,44%) résultats comparables à ceux rapportés par(Abdelli.L) avec un taux de (78,47%) chez les vaches âgées de 54 mois. Pour ce qui est des ovocytes de mauvaise qualité, le taux le plus considérable a été remarqué dans la tranche d'âge comprise entre 96-108 mois, à l'inverse le taux le plus élevé a été rapporté chez les vaches de 36 mois par (Abdelli.L)

Pour le dernier paramètre étudié concernant l'état d'embonpoint , nos résultats sont transposables à ceux rapportés par (Abdelli.L) avec un taux important d'ovocytes de bonne qualité correspondant à l'état corporel 4 estimé dans notre étude à (63,46%)et (63,78%) pour l'ancienne étude, En revanche le taux d'ovocytes de mauvaise qualité estimé à (69,6%) pour les vaches ayant un état corporel de 2 dans notre étude , et estimé à (95,64 %) pour un état corporel de 1 rapporté par l'étude de (Abdelli.L).

CONCLUSION

Notre travail avait pour objectif la réalisation et la maîtrise de la maturation ovocytaire et la fécondation in vitro chez l'espèce bovine, mais par défaut de moyens et de produits, notre travail c'est limité à la première étape de la production d'embryons in vitro à savoir la collecte des ovocytes à partir de vaches d'abattoirs et leur classification en se référant à celle de C.Hanzen

Nous avons pris en considération certains facteurs qui ont une influence sur la qualité des ovocytes tels que : l'âge, race, état d'embonpoint.
Les résultats obtenus sont satisfaisants avec un taux de récupération d'ovocytes estimé à 72,79 % avec une moyenne de récolte de 8,58 ovocytes par ovaire

Pour conclure on dira que notre travail ouvrira de nouvelles portes pour les travaux à venir en vue de la production d'embryons in vitro en Algérie.

Recommandations :

Au terme de notre étude, nous sommes arrivés à ses quelques recommandations, qui pourraient améliorer les résultats et la qualité du travail :

- Un laboratoire équipé avec du matériel adéquat pour la réalisation de la collecte d'ovocytes.

- D'avoir de bonnes conditions dans les abattoirs, surtout l'hygiène pour éviter la contamination des ovaires.

- Essayer d'emblée de porter son choix sur des vaches avec un bon état, pour pouvoir augmenter les taux d'ovocytes de bonne qualités.

ANNEXES

ANNEXE 01

Interprétation des signes cliniques d'évaluation de l'état d'embonpoint
(HANZEN ,2003), (L : région lombaire ; Q : région de la queue)

SCORE 0: état d'émaciation de l'animal

Q: Région sous-caudale très nettement cavitaire
Peau tendue sur les hanches et les tubérosités ischiatiques

L: Apophyses transverses et épineuses nettement visibles et saillantes

SCORE 1: état pauvre (état des vaches hautes productrices ou des vieilles vaches)

Q: Région sous-caudale nettement cavitaire
Hanches saillantes sans palpation de graisse sous-cutanée

L: Extrémités des apophyses transverses dures au toucher
Surface supérieure des apophyses transverses aisément palpées
Effet de planche des apophyses épineuses
Profonde dépression entre les hanches et les vertèbres lombaires

SCORE 2: état moyen

Q: Légère dépression sous-caudale et entre les tubérosités ischiatiques
Tubérosités ischiatiques aisément palpées et bien visibles

L: Extrémités des apophyses transverses enrobées
Pression requise pour palper la partie supérieure des apophyses transverses
Présence d'une dépression entre les vertèbres lombaires et les hanches
Apophyses épineuses nettes mais sans effet de planche

SCORE 3: état bon

Q: Peau souple étant donnée la présence d'un léger dépôt de graisse
Tubérosités ischiatiques palpables et d'aspect arrondi

L: Pression requise pour palper l'extrémité des apophyses transverses
Légère dépression entre les vertèbres lombaires et les hanches
Hanches arrondies

SCORE 4: état gras

Q: Dépôt de graisse autour de la queue et des tubérosités ischiatiques
Pression à exercer pour palper les tubérosités ischiatiques

L: Apophyses transverses non palpables, Hanches peu palpables
Pas de dépression entre les vertèbres lombaires et les hanches

SCORE 5: état très gras

Q: Tubérosités ischiatiques non visibles
Distension cutanée

L: Apophyses transverses et hanches non visibles

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alak BM, Coskun S, Friedman CI, Kennard EA, Kim MH, Seifer DB. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertil Steril* 1998 ; 70 : 1126-30.
2. Apa R, Lanzone A, Mastrandrea M, Miceli F, Macchione E, Fulghesu AM, Caruso A, Canipari R. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and denuded rat oocytes. *Biol Reprod* 1997 ; 57 : 1074-9.
3. Blondin P, Guilbault LA, Coenen K, Sirard MA .1997. In vitro production of bovine embryos :developmental competence is acquired before maturation .*Theriogenology* 47(5):1061-1075.
4. Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle
5. Bryuere G. maturation ovocytaire in vitro chez la vache .Thèse vétérinaire ENV Lyon 2002.
6. Claudel.C, Congélation du cortex ovarien de la vache. Thèse vétérinaire ENV Lyon 2007.
7. Crozet N. La maturation des ovocytes et la fécondation in vitro chez les animaux domestiques de ferme.Cahiers de l'agriculture 1992.
8. Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991 ; 55 : 1000-4.
9. Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor : evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool* 1988 ; 245 : 86-96.
10. Driancourt MA, Gougeon A, Folliculogénèse.Ovocyte et embryon, de la physiologie à la pathologie, Hamamah S, Ménézo Y, Ellipses / Editions Marketing, 1999, Paris, 368p.
11. Drion PV, Beckers JF, Ectors, Hanzen C, Houtain J-Y, Lonergan P.1996.Régulation de la croissance folliculaire et lutéale Numéro Spécial « Reproduction des Ruminants », Le Point Vétérinaire, 28,881-900.
12. Drion PV,Beckers JF, Derivaux J, Ectors F, Physiologie de la reproduction tome 1 (Université de liège).
13. Ennuyer M, 2000, Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction – Point Vet, 2000 ; 31(209) : 377-383.
14. Feng P, Catt KJ, Knecht M. Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 1988 ; 122 : 181-6.

15. Fortune JE, Ovarian follicular growth and development in Mammals. *Biol. Reprod*, 1994,50 : 225-232.
16. Fukui Y, Kikuichi Y, Kondo K, Mizushima S, Fertilizability and development capacity of individually cultured bovine oocytes, *Theriogenology*, 2000,53 :1553-1565.
17. Galli C, Moor RM. Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro. *Bull Ass Anat* .1991, 75 :67-71.
18. Gayrard V, *Physiologie de la reproduction des mammifères*, septembre 2007. ENV Toulouse.
19. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes : role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 1638-44.
20. Gueérin P , Mermillod P, Leguienne B ,growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 109(1):165-171.
21. Guérin P, Guyader-Joly C, Mermillod P, Leguienne B, La production in vitro et la cryoconservation de l'embryon chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, 1996,28 n° spécial,184p.
22. Guérin P, Tappaz M, Guillaud J, Menézo Y, Demonstration of cysteine sulfinatase decarboxylase in cultured oviduct epithelial cells in cows and goats. *C.R Acad. Sci* ,1995,318 :523-528.
23. Guyader-Joly C, *Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit in vitro*. Thèse de doctorat de sciences biologiques fondamentales et appliquées, université de Paris VI, 1998,197p.
24. Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ ,Ledgard A, Peterson AJ, Schurmann A, Tervit HR. 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles :Interactive effects of estrus cycle stage, follicle size and atresia-*Mol Reprod Dev* 53(4) :451-458.
25. Hanzen C ..2008-2009. Production d'embryons in vitro
progcours.ulg.ac.be/cocoon/.../U012685.html
26. Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N, Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol.Reprod.Dev* .2000,57 :353-360.

27. Herrler A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 1213-24.
28. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47 : 23-32.
29. Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1989 ; Suppl 38 : 35-47.
30. Ireland JJ, Roche JF. 1987. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In : *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*, Editions JF Roche and O'Callaghan, 1-18.
31. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1996 ; 45 : 372-7.
32. Kruip TA , Pieterse MC, van Beneden TH , Vos PL , Wurth YA , Taverne MA . 1991. A new method for bovine embryo production : a potential alternative to superovulation . *Vet Rec* 128(9) :208-210.
33. Kruip Tam, Cran DG, Van Deneden et Coll. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo . *Gametes Res*, 1983 :29-47.
34. LaPolt PS, Yamoto M, Veljkovic M, Sincich C, Ny T, Tsafriri A, Hsueh AJ. Basic fibroblast growth factor induction of granulosa cell tissue-type plasminogen activator expression and oocyte maturation : potential role as a paracrine ovarian hormone. *Endocrinology* 1990 ; 127 : 2357-63.
35. Leibfried-Rutledge ML , Crister ES, Parrish JJ, First NL. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989,31 :61-74.
36. Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P . 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63(3) :841-859.
37. 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 in vitro. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 1420-9.
38. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. 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. *J Reprod Fertil* 1994 ; 101 : 697-701. undergoing ovarian hyperstimulation with different gonadotropin preparations. *Gynecol Endocrinol* 2001 ; 15 : 413-20.

39. 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. *Anim Reprod Sci* 84(3-4) :293-301.
40. Mermillod P, Marchal R. *Médecine/sciences* 1999, 15: 148-56, Maturation de l'ovocyte de mammifères.
41. McEvoy TG ,Alink FM , Moreira VC, Watt RG ,Powell KA .2006.Embryo technologies and animal health-consequences for the animal following ovum pick-up,in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 65(5) :926-942.
42. Mialot JP ,Constant F, Chastant- Maillard S, Ponter AA, GRIMARD B,2001,La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications – Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie,Paris, Novembre 2001 : 163-168.
43. Mourot M.2006. Identification de gènes de compétence ovocytaire chez la vache .Université Laval Quebec.
44. Nagai T, The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocyte, *Theriogenology*, 2001,55 :1291-1301.
45. Nakao H, Nakatsuji N.1992.Effect of Storage Conditions of Bovine Ovaries and Oocytes on the success Rate of In vitro Fertilization and Culture. *J Reprod Dev* 38(1) :11-13.
46. Parrish JJ, Sussko-Pariish JL,First NL , Role of heparin in bovine sperm capacitation .*Biol Reprod* 1985, 32(suppl.I) :211.
47. Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt MA. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 2000 ; 56 : 483-94.
48. Reynaud K , *Medecine thérapeutique endocrinologie et reproduction*, volume 5, n°2, 85-93, Avril 2003, revue.
49. Rodriguez C, Anel L, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Chamorro CA, de Paz P.2006.Ovum pick -up in sheep :A comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval .*Reproduction in Domestic Animals* 41(2) :106-113.
50. Sadatsuki M, Tsutsumi O, Yamada R, Muramatsu M, Taketani Y. Local regulatory effects of activin A and follistatin on meiotic maturation of rat oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 196 : 388-95.

51. Salusstri A, Petrungaro S, De Felici M, Conti M, Siracusa G. 1985. Effect of follicles stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultures in vitro. *Biol Reprod* 1985 ,33 :797-802.
52. Sirard MA ,Blondin P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42 :417-426.
53. Sirard MA , Lambert RD . 1986. Birth of calves after in vitro fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec* 119(8) :167-169.
54. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge MC, Barnes FL, Sims ML, First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40(6) :1257-1263.
55. Smikle CB, Dandekar PV, Schriock ED, Givens CR. Elevated ovarian follicular fluid stem cell factor concentrations are associated with improved pregnancy rates in in-vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 1998 ; 69 : 70-2.
56. Stock AE, Woodruff TK, Smith LC. Effects of inhibin A and activin A during in vitro maturation of bovine oocytes in hormone- and serum-free medium. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 1559-64.
57. Sutovsky P, Flechon JE, Flechon B, Motlik J, Peynot N, Chesne P and Heyman Y, 1993. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biology of Reproduction* 49 :1277-87.
58. Thibault C .and Levasseur, M .2001. 'La reproduction chez les mammifères et l'homme' INRA, Paris.
59. Touati Kamal .1993. Contribution à l'étude de la production et de la cryoconservation d'embryons et demi-embryons dans l'espèce bovine.
60. Van Den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bever MM, Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum. Reprod*, 2000, Update 6 : 457-474.
61. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status – *Theriogenology* 60(5) :923-932.
62. Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Weshusin ME, Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development , cell number and apoptosis. *Biol, Reprod* ,2000,62 :355-364.
63. Yoshioka K, Suzuki C, Iwamura S. Activin A and follistatin regulate developmental competence of In vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 1017-22.

64. Youngquist RS.1997. Current therapy in large animal theriogenology, Library of Congress Cataloging data, 898p.