



Université Saad Dahleb Blida
faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques
Département des sciences vétérinaires

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

Thème :

**Influence d'états de vaches
sur la qualité d'ovocytes récoltés à partir d'ovaires d'abattoir**

Présenté par : ABDELLI Lyes.

Membres de jury:

- ✓ **Président de jury : Mm. BOUMAHDI.Z**, chargée de cours à l'université de Blida.
- ✓ **Examineurs : Mr. GHARBI.I**, chargé de cours à l'université de Blida.
Mr. YAHIMI.A, chargé de cours à l'université de Blida.

Encadré par :

Mr. ADEL.D, chargé de cours à l'université de Blida.

Résumé

Dans un objectif de sélection et de production d'embryon *in vitro* chez l'espèce bovine à partir d'ovaire de vaches abattues, la recherche d'une nouvelle technologie à utiliser est nécessaire pour arriver à ses fins. C'est ainsi que les chercheurs dans ce domaine ont mis au point une technique qui nous permet d'utiliser le potentiel des ovaires des vaches abattues en récupérant les ovocytes présents au niveau de l'ovaire.

Notre travail fait l'objet d'une étape primaire pour la production d'embryons *in vitro* à savoir l'étude de l'influence de certains paramètres tels que la race, l'âge et l'état d'embonpoint des animaux concernés par la collecte de leurs ovocytes, la récolte d'ovocytes d'ovaires bovins après abattage et qui repose sur la ponction folliculaires et la classification d'ovocytes obtenus qui est une technique qui nous a permis d'obtenir des résultats encourageants, estimant le taux de récupération à 71,34 % avec une moyenne de récupération de 7.77 ovocytes par ovaire.

Mots clés :

Ovocytes

Embryon

Culture

Ponction folliculaire

Fécondation *in vitro*

Summary

In an objective of selection and production of *in vitro embryo* at the bovine species starting from ovary of cut down cows, the search for a new technology to be used is necessary to arrive at its ends. Thus the researchers in this field developed a technique which enables us to use the potential of the ovaries of the cows cut down by recovering the oocytes present at the level of the ovary.

Our work is the primary stage object for the production of *in vitro* embryos to knowing the study of the influence of certain parameters such as the race, the age and the state of plumpness of the animals concerned with the collection of their oocytes, the harvest of oocytes of bovine ovaries after demolition and which rests on the puncture follicular and the classification of oocytes obtained which is a technique which us A makes it possible to obtain encouraging results, estimating the rate of recovery at 71, 34 and 7.77 from ovary.

DEDICACES

A la plus belle femme au monde (ma maman), Personne ne sait aussi bien que toi m'écouter, me comprendre, et me donner confiance... Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci d'être là si proche de moi.

A mon père, l'enthousiasme, l'amour et la disponibilité font de toi le plus beau des pères, merci de m'avoir encourager à aller tout droit.

A mes sœurs ; Djamila, Samia et ma mignonne Adila la fierté de vous avoir en mes coté fait de moi un homme complet... Je vous aime toutes les trois.

Une attention particulière à Sider Merbah, pour son soutien quotidien et l'amitié qui s'est tissée entre nous ; merci aussi pour toute la connivence fraternelle qui existe à jamais.

A Adel Berkat, merci pour tous cher ami, et pour être sincère ; t'aurais du être mon binôme.

A Mes très chers anciens copains de chambre, Hocine et Yacine ; j'en ai qu'à vous respecter d'avantage chers amis, et de tout cœur vous me manquer.

A ma très chère amie Houda , que la vie te soit belle à jamais.

A mes amis, Hakim, Mohand, Makhlouf, et Nadir ; en toute authenticité, ça été vraiment très jolie de passer un aussi long cursus en votre compagnie chers amis, merci de m'avoir soutenu et supporter.

A mes très chers, Nassim, Nordine, Mohamed et Karime, je vous ai beaucoup dérangé et je suis très conscient de tous ; j'en ai qu'à m'excuser d'avantage...

REMERCIEMENTS

A Madame Docteur **BOUMAHD**

Du département des sciences vétérinaire de Blida

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire.

A Monsieur **G**

Du département des sciences vétérinaires de Blida

Qui nous fait l'honneur de juger notre travail.

A Monsieur le docteur **YAHIMI**

Du département des sciences vétérinaires de Blida

Qui nos fait l'honneur d'examiner notre projet de fin d'étude.

A Monsieur **ADEL**

Du département des sciences vétérinaires de Blida

Qui ma fait l'honneur de m'encadrer, de m'orienter et surtout de passer une aussi belle année avec lui. Merci encor monsieur.

Au personnels de l'abattoir de **Blida**.

De m'avoir faciliter la tache de récupération des matrices.

SOMMAIRE

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Résumé.....	III
Sammary.....	IV
Sommaire.....	V
Abréviation.....	IX
Liste des Tableaux.....	X
Liste des Figures et Photos.....	XI

Synthèse bibliographique

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Chapitre I : Rappels physiologiques.

1-Introduction.....	03
2-Gamétogénèse.....	03
2-1- Le développement prénatal.....	03
2-Le développement post natal.....	05
3- La folliculogénèse.....	06
3-1- Le stock folliculaire.....	06
3-2- la croissance folliculaire.....	06
3-3-La vague folliculaire chez la vache.....	07
3-4- L'atrésie folliculaire.....	08
4- La croissance de l'ovocyte.....	12
4-1- la maturation cytoplasmique.....	12
4-2- la reprise de la méiose.....	13
5-L'ovulation.....	13
5-1- les premières divisions aux stades morule.....	13
5-2- le blastocyste:formation du blastocoele, expansion, éclosion et allongement..	14

6 -Le cycle oestral chez la vache laitière	16
--	----

Chapitre II : La fécondation *in vitro*

1-Introduction.....	19
2- La fécondation <i>in vitro</i>	19
2-1- Introduction.....	19
2-2- Le début de la fécondation <i>in vitro</i>	20
2-3- Importance économique de la fécondation <i>in vitro</i>	21
2-4- importance scientifique de la fécondation <i>in vitro</i>	22
2-5- Les étapes de la fécondation <i>in vitro</i>	22
2-5-1 : les techniques de récolte d'ovocytes	23
2-5-1-1- la récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir	23
a- Méthode citée par Christian Hansen	23
b- Méthode décrite par Blondin et M. A. Sirard	24
2-5-1-2- la récolte d'ovocytes <i>in vivo</i> par la technique d'OPU	24
2-5-1-2-1-Matériel et techniques.....	27
A- Le matériel échographique	27
B- Les aiguilles de ponction	27
C-Le rinçage de la cavité folliculaire.....	28
D- Les tubulures de connexion	28
E- La pression d'aspiration	28
F-Le milieu de récolte.	29
2-5-1-2-2-La méthode de ponction intra vaginale.....	29
2-5-2-Qualité des ovocytes	30
2-5-2-1 : chez l'animal.....	30
A- Critères de classification.....	30
A-1-La classification citée par Christian Hansen	30
A-2-Classification utilisé par Blondin, M.A. Sirard.....	31
A-3-Classification utilisée par DELOOS et al	31
2-5-2-2- Chez l'homme.....	32
A- Classification utilisée par S. Hamamah, et al.....	32
2-5-3-L'interet de l'ovum pick up.....	33
2-5-4- Facteurs d'influences.....	34

2-5-4-1-1-L'ovaire et le follicule.....	35
2-5-4-1-2-Aspects morphologiques.....	36
2-5-4-1-3-Aspects hormonaux	37
2-6-La maturation de l'ovocyte de mammifères <i>in vitro</i>	38
2-6-1-Introduction.....	38
2-6-2-Techniques de mise en culture	38
2-6-2-1-La culture <i>in vitro</i>	38
2-6-2-1-1-Les milieux de culture	39
2-6-2-1-1-1- : Historique des milieux de culture	39
a- Milieu de base.....	39
b- Les Hormones	40
c- Les facteurs de croissances	41
2-7- Méthode de la fécondation <i>in vitro</i>	41
a- sélection des spermatozoïdes.....	41
b- Induction de la capacitation	42
c- Induction et entretien de la mobilité	42
d-La fécondation proprement dite	42
2-8-Les critères de fécondation	43
2-9-La culture <i>in vitro</i> des embryons	44
2-9-1-Les conditions de culture des embryons.....	45
2-9-1-1-L'atmosphère gazeuse.....	45
2-9-1-2-La culture sous huile.....	46
2-9-1-3-L'humidité et température	46

Partie expérimentale

1-Introduction	47
2- Matériels et organes utilisés	47
2-1- Le matériel	47
2-2- Les organes	48
2-3- Méthode de travail	49
A- La collecte des ovaires	49

B- La récolte et la classification des ovocytes	49
3- Résultats	53
4- Classification des ovocytes	61
5- Discussion	65
6- Conclusion	66
7- Recommandations	67
8- Références bibliographiques.	

Liste Des Abréviations

ADN	: Acide Désoxiribonucléique.
AL	: All
AMPc	: Adenosine Monophosphate Cyclique.
ARN	: Acide Ribonucléique
BSA	: Bovin Sérum Albumine.
CO₂	: Gaz Carbonique.
COC	: Complexe Ovocytes Cumulus.
DIV	: Développement d'Embryon <i>In Vitro</i> .
E₂	: Oestrogène.
EGF	: Epidermal Growth Factor.
FD	: Follicules Dominants.
FGF	: Fibroblaste Growth Factor.
FIV	: Fécondation <i>In Vitro</i> .
FS	: Follicules Subordonnés.
FSH	: Follicle Stimulating Hormone.
GH	: Growth Hormone.
GnRH	: Gonadotrophine Releasing Hormone.
GV	: Vésicule Germinale.
Hg	: Mercure.
ICM	: Masse Cellulaire Interne.
ICSI	: Intra Cytoplasmic Spermatozoa Injection.
ICSI	: Intra Cytoplasmic Sperm Injection.
IGF	: Insuline Like Growth Factor.
IGF	: Interferon Growth Factor.
J	: Jour
KGF	: Keratinocyte Growth Factor.
LH	: Hormone luteinisante.
M	: Métaphase.
MEM	: milieu de culture.
MET	: Transition Maternelle Embryonnaire.
MHZ ,mm,cm,ml,mg,kg	: Mégahertz, millimètre, centimetre, millilitre, milligramme, Kilogramme
MIV	: Maturation <i>In Vitro</i> .
NaCl	: Chlorure de Sodium.
OPU	: Ovium Pick Up.
PBS	: Phosphate Buffered Saline.
PDGF	: Platele Derived Growth Factors.
PGC	: Cellules Germinale Primordiales.
PHE	: Penicillamine, Hypotamine et Epinephrine.
PIV	: Production <i>In Vitro</i> .
SOF	: Synthétique Oviductal Fluid.
SUZI	: Subzonal Sperm Injection.
TALP	: Tyrod, Albumine, Lactate , Pyruvate.
TCM	: milieu de culture.
TE	: Transfert Embryonnaire.
ZD	: Zona Drilling.
ZP	: Zone Pellucide.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale

La reproduction joue un rôle fondamental dans la production animale, non seulement elle multiplie les animaux à élever, mais elle est aussi l'instrument principal sur lequel se base l'amélioration génétique et la sélection.

Les nouvelles techniques de reproduction assistée ont grandement évolué ce qui a permis aux généticiens d'augmenter la pression de sélection sur la lignée féminine (Lohuis, M.M. 1995), et elles sont utilisées dans le domaine animal non seulement pour soigner les problèmes de fertilité mais surtout pour augmenter le nombre d'embryons produits par chaque vache donneuse. Un autre aspect important de la reproduction assistée est la possibilité d'exploiter les acquis du séquençage du génome à des fins sélectives, au moyen de ces techniques reproductives et grâce à la détermination du génotype des embryons évolués chez les bovins. On peut citer à titre d'exemple de biotechnologies L'insémination artificielle qui a marqué sa participation à l'évolution du monde animal au milieu du 20^{ème} siècle qui a eu, et a encore, l'impact le plus important sur l'élevage de bovins parce qu'elle permet l'utilisation de peu de reproducteurs génétiquement supérieurs, sur la plupart des animaux élevés ; en revanche elle ne permet que la production dans le meilleur des cas qu'1 seul veau par an et par vache. C'est ces objectifs génétiques et économiques qui ont été à la base du développement des biotechnologies de la reproduction telle que les ovulations multiples, le transfert embryonnaire au début des années soixante-dix et aussi la fécondation *in vitro* (FIV) ou bien la production d'embryon *in vitro*.

Les techniques de reproduction des embryons *in vitro* se basent sur le prélèvement des ovocytes qui ont atteint un stade de développement adéquat dans le follicule ovarien. Seulement les ovocytes présents dans les follicules ayant un diamètre de plus de 2 mm sont idoines au développement embryonnaire successif (L.Galli, C and Moor, R.M. 1991), (Lazzari, G. and Galli, C. 1993), les ovocytes sont prélevés dans les ovaires de l'animal après l'abattage (ou bien ils sont prélevés (Galli, C. and Lazzari, G. 1996) dans les animaux vivants par voie intra vaginale (Galli, C. and Lazzari, G., 1994). une fois visualisés au moyen d'une sonde échographique (La typologie d'embryon produite, varie en fonction des modalités de prélèvement des ovocytes ainsi qu'en fonction de la valeur génétique des vaches donneuses. Au cours de ces derniers vingt ans de nombreux progrès ont été faits dans le domaine de la maturation des ovocytes *in vitro* ; pendant les premières heures de maturation les interactions entre les cellules qui entourent l'ovocyte (cellules granuleuses) et l'ovocyte même, se sont

révélées particulièrement intéressantes. La maturation *in vitro* est obtenue en 24 heures de culture à température et atmosphère contrôlées ; ensuite, la semence congelée, habituellement utilisée pour l'insémination artificielle, est préparée pour la fécondation *in vitro*. Les spermatozoïdes sont séparés par centrifugation et activés par l'ajout d'héparine, ensuite ils sont mis en contact avec les ovocytes mûrs. Après 18- 24 heures de culture avec les spermatozoïdes, les ovocytes sont déplacés dans un medium idoine au développement embryonnaire et après 7 jours ils atteignent le stade de blastocystes, stade où ils peuvent être transplantés par voie intra cervical, dans l'utérus d'une vache receveuse ou bien congelés et conservés dans l'azote liquide jusqu'au moment de l'implantation. Le succès de la maturation *in vitro* est très importante (plus de 90% des ovocytes, atteint la deuxième métaphase), ainsi que celui de la fécondation *in vitro* (avec plus de 70%). La phase la plus critique (même pour sa durée temporelle) est le passage de l'ovocyte fécondé à blastocyste, à ce moment la réussite oscille entre 30 et 40%. La culture des zygotes de bovin dans l'oviducte de mouton permet de dépasser la plupart des difficultés provoquées par les systèmes de culture inadéquats. Il est cependant vrai qu'aujourd'hui, grâce au développement continu de nouvelles formulations des medium semi définis on obtient des embryons de bonne qualité et appropriés à la congélation.

CHAPITRE -I- :

RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

1-introduction :

L'ovule est considéré comme une cellule immortelle. Effectivement, suite à la fécondation l'ovocyte devient finalement l'ovule, un gamète haploïde. Cependant, un autre processus est déjà enclenché: le développement embryonnaire. Suite à la fécondation, les premières cellules de l'embryon sont totipotentes. Cette totipotence se perd très rapidement lors de la différenciation cellulaire embryonnaire. Toutefois, très tôt dans le développement embryonnaire, une lignée de cellules germinales est formée. Ces cellules germinales se multiplient par mitose et débiteront leur méiose pour former un nouveau pool d'ovocytes qui entreront en repos. Lorsque l'ovocyte sortira de son repos, il continuera sa croissance afin de devenir prêt à être fécondé et à supporter les premières étapes du développement embryonnaire et ainsi de suite.

2-Gamétogénèse :

2-1- le développement prénatal :

La lignée de cellules germinales commence lors de l'apparition des cellules germinales primordiales (PGC). Les PGC sont de très grosses cellules rondes avec beaucoup de ribosomes libres et un très gros noyau. Les PGC possèdent une très haute activité phosphatase alcaline, ce qui permet de les distinguer des cellules somatiques (Eddy, 1984). Chez les mammifères, avant l'apparition des marqueurs cellulaires des PGC, la présence des cellules potentielles des PGC peut être déduite par l'étude du potentiel de la différenciation cellulaire. Chez la souris, jusqu'au stade de 8-cellules, les blastomères sont totipotents. Les premières différenciations cellulaires apparaissent entre le stade 8 et le stade 16 cellules. Il y a les cellules externes et internes qui deviendront respectivement les cellules du trophoctoderme (TE) et de la masse cellulaire interne (ICM). Chez le bovin, c'est au stade de 32 cellules que se produit cette différenciation (Van Soom, et al., 1997).

Au stade de blastocyste, seulement l'ICM conserve le pouvoir de produire des PGC. Chez la souris, au stade E4.5, c'est-à-dire 4.5 jour après la fécondation, si une cellule de l'épi blaste est transplantée dans un blastocyste (E3.5), elle possède toujours la capacité de se développer en cellules germinales ou somatiques. Toujours chez la souris, au stade E7, les PGC sont identifiées pour la première fois dans l'endoderme du sac vitellin, à la racine de l'allantoïde dans la partie postérieure de la ligne primitive (Ginsburg, et al., 1990). Chez la souris, comme chez les autres mammifères, les PGC sont donc d'origines extra gonadiques et même extra embryonnaires (Magre and Vigier, 2001).

Lorsque toutes les PGC se sont regroupées dans l'allantoïde au jour E7.5, elles se divisent en deux populations qui vont migrer respectivement vers la crête génitale droite ou gauche (Chicoine, 1954). Les PGC migrent par une combinaison de mouvements amiboïdes et de transfert passif par les tissus environnants (Zamboni and Merchant, 1973).

Outre le terme PGC, le mot gonias peut être utilisé pour les cellules germinales indifférenciées qui peuvent se diviser par mitose (Byskov, 1981). Lorsque les gonades deviennent morphologiquement identifiables, les cellules germinales femelles sont appelées ovogonies (Byskov, 1981). Et finalement, quand les cellules germinales entrent en méiose, le terme ovocyte est utilisé. Chez le bovin, les PGC ou gonias arrivent au niveau de la crête génitale qu'au 30e jour de la gestation. Au 57e jour, les PGC arrêtent de se déplacer et des ponts intercellulaires se créent entre elles afin de synchroniser leurs divisions mitotiques. Cette période de division se produit entre les jours 62 et 82 de la gestation. À ce stade, il y a un mélange de deux types d'ovogonies. Une partie des ovogonies sont en mitose et les autres attendent en interphase afin de fournir davantage d'ovogonies. Au 82e jour de gestation, lorsque la production d'ovogonies est complétée, les premières méioses sont observées et elles deviennent ainsi des ovocytes (Russe, 1983).

Selon les espèces, le début de la méiose commence à différents moments du développement ovarien. Il en existe deux groupes. Le premier groupe, appelé "méiose immédiate", est caractérisé pour avoir les premières ovogonies qui entrent en prophase méiotique presque simultanément ou très peu de temps après que les cordes testiculaires se soient formées chez leur homologue mâle du même âge (souris et homme). Le deuxième groupe, appelé "méiose retardée" entre en méiose après la différenciation sexuelle (mouton, porc, lapin et bovin). Ces deux groupes diffèrent également dans la distribution des ovogonies. Dans les premiers groupes, les ovogonies sont distribuées uniformément dans les gonades, tandis que dans le deuxième groupe, elles sont entourées de cordons cellulaires distincts qui sont à leur tour, enveloppés légèrement de tissu mésenchymateux durant la période précédant la méiose.

Le début de la méiose, autant que la formation et la croissance folliculaire commencent toujours au centre de l'ovaire. Des études ont montré que la première ovogonie à entrer en méiose, est la première qui entre en contact avec les cellules du rete dérivées du mésonephros. Ces dernières cellules sont essentielles pour générer la méiose. Il n'existe qu'une petite fenêtre où elles ont ce pouvoir car, ensuite, elles inhibent la méiose. Les cellules provenant du rete dérivées du mésonephros deviennent les cellules de la granulosa (Byskov,

1981). Chez le bovin, la méiose fœtale arrête vers la 90^e journée de gestation au stade dictié de la prophase I. L'arrêt de la méiose coïncide avec la formation du follicule autour de l'ovocyte. Ainsi, la forme dormante de l'ovocyte se retrouve enveloppée dans le follicule primordial (Erickson, 1966). À partir de ce moment, le noyau de l'ovocyte est appelé la vésicule germinale (GV). Les follicules primordiaux se retrouvent au niveau du cortex de l'ovaire. Aux environs du 140^e jour de la gestation, les vagues folliculaires apparaissent puisque les premiers follicules primordiaux activés sont observés.

Il existe un dogme chez les mammifères stipulant que le pool d'ovocytes produit lors du développement embryonnaire représente le nombre maximal d'ovocytes, et que le pool diminue par la suite jusqu'à l'épuisement des stocks (Zuckerman, 1951). Ce dogme explique entre autres la ménopause chez la femme. En 2004, une publication de Johnson et collaborateurs a ébranlé ce dogme (Johnson, et al., 2004). Cette étude démontrerait la présence potentielle de cellules souches germinales chez un mammifère, la souris adulte. Certaines réticences à cette nouvelle découverte ont été publiées par la suite (Gosden, 2004, Greenfield and Flaws, 2004), bien qu'ils incitent la communauté scientifique à confirmer ou infirmer le dogme à l'aide des nouveaux outils technologiques. Toutefois, la même équipe vient de publier leur nouvelle recherche qui démontre que des cellules souches de la moelle osseuse seraient capables de produire de nouvelles structures semblables aux ovocytes en 24h (Johnson, et al., 2005). Néanmoins, comme la ménopause est un fait indéniable, il y aurait une limite à la capacité de ces cellules souches de repeupler l'ovaire.

2-2-Le développement post natal :

Selon les espèces, les vagues folliculaires débutent bien avant ou très tôt après la naissance, pourtant un ovule mature ne pourra être produit avant la puberté due à l'immaturité de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien (Kinder, et al., 1995). Toutefois, durant la période prépubère, l'ovocyte acquiert progressivement la capacité à produire un ovocyte apte à engendrer un embryon suite à la fécondation (Presicce, et al., 1997). Chez la souris, les premières vagues folliculaires débutent autour de la naissance. Entre la 14^e et la 16^e journée, l'ovocyte atteint pour la première fois sa taille maximale, mais les follicules n'atteignent leur taille maximale qu'à la 20^e journée. À partir de la 21^e journée, les souris peuvent répondre à des traitements hormonaux. Mais normalement, la première ovulation ne se produit qu'à 1 mois (Bachvarova, 1985). Chez le bovin, avant le 5^e et le 6^e mois post natal, la compétence au développement est très faible suite à des traitements de suroovulation (Earl, et al., 1998, Majerus, et al., 1999, Salamone, et al., 2001, Camargo, et al., 2005). Avec l'âge, la

taille maximale du follicule dominant (FD) augmente, de même que celle des follicules subordonnés (FS). L'influence du FD sur ces derniers augmente également avec l'âge. L'augmentation de la sécrétion des gonadotropines autour du 5^{ème} mois coïncide avec l'augmentation du diamètre folliculaire de même que du nombre maximum de follicules à la surface des ovaires (Evans, et al., 1994). Chez le bovin, la première ovulation se produit autour de 1 an (Evans, et al., 1994).

3-la folliculogénèse :

L'ovaire, organe paire est la gonade spécifique du sexe femelle, c'est-à-dire que c'est le lieu de tous les processus de la reproduction aboutissant à la production du gamète femelle appelé ovocyte. ce phénomène a été décrit pour la première fois en XVII^{ème} siècle par l'anatomiste hollandais Reinnier De Graaf dans son ouvrage intitulé «De mulierum organis generationi inservientibus tractus novus ».

3-1 Le stock folliculaire

Chez les mammifères, la phase de multiplication par mitoses successives des ovogonies est en général terminée avant peu après la naissance. Chez la vache, la multiplication mitotique des ovogonies s'étend du 45^{ème} au 150^{ème} jour de la vie intra-utérine ; ainsi les ovaires contiennent jusqu'à deux millions d'ovogonie pendant la vie fœtale.

Sitôt la phase mitotique terminée, ces dernières accomplissent leur dernière réplication d'ADN et entament le processus de méiose qui s'interrompt en fin de la phase 1 marquant la fin de l'ovogénèse. Seuls ceux s'entourant de quelques cellules folliculaires et d'une lame basale persisteront pour former les follicules primordiaux ; chez la vache le stock folliculaire est supérieur à 2000.000 à la naissance et diminue au cours de l'âge, par dégénérescence : c'est l'atrésie.

3-2- la croissance folliculaire :

Chez le bovin et l'humain, un follicule prend environ 5 à 6 mois pour passer du follicule primordial au follicule pré ovulatoire (Lussier, et al., 1987), comparativement à environ 3 semaines chez la souris (Bachvarova ., 1985) et 8 semaines chez le rat (Hirshfield, 1991).

En ce qui concerne le bovin et l'être humain ; le passage d'un follicule primordial à un follicule secondaire nécessite une durée de 70 jours (Russe ., 1983) or que l'accumulation

du liquide folliculaire chez les jeunes follicules antraux se fait 20 jours plus tard pour se rendre à leur tour en follicule tertiaire (Russe 1983 Lussier ; et al., 1987). .
a partir des follicules antraux, il se produit dans un premier temps la croissance des follicules de 0.13 à 0.67mm pendant environ 27 jours. Ensuite, il faut 6 à 8 jours pour passer de 0.68 à 3.87 mm et 7 à 8 jours de 3.68 à 8.56 mm. (Lussier et al 1987). C'est à partir de 4 mm que la croissance folliculaire est régulée par la notion de vagues folliculaires qui se subdivisent principalement en trois phases : le recrutement, la sélection et dominance.

Il a été longtemps considéré que seuls les follicules plus grands que 4 mm présentaient une dynamique de croissance en vague folliculaire. Il a été démontré que les follicules entre 1 et 3 mm présentent également un patron de croissance en vague. Leur nombre varie inversement aux follicules de 4mm, c'est-à-dire qu'ils sont plus nombreux durant la dominance où il n'y a que le FD et quelques follicules secondaires et diminue lors du recrutement et de la sélection (Jaiswal, et al., 2004).

3-3-La vague folliculaire chez la vache :

La majorité des cycles oestriques (>95%) présentent 2 ou 3 vagues folliculaires (Ginther, et al., 1989, Adams, 1994). Une vague dure entre 8 à 10 jours. Dans un cycle à deux vagues, elle débute aux jours 0 et 10. Dans un cycle à trois vagues, elle débute aux jours 0, 9 et 16 (Ginther, et al., 1989). Outre le temps, il y a une autre différence entre les cycles oestriques à 2 et 3 vagues : la présence d'un nombre plus élevé de follicules lors de la vague ovulatoire que ce soit la 2e ou la 3e vague. Ces deux différences semblent être reliées, car en réduisant le temps entre les vagues, la période de suppression de la FSH est moins importante et permettrait la croissance d'un plus grand nombre de follicules (Ginther, et al., 1989).

La vague folliculaire normale se divise en 4 étapes : le recrutement, la sélection, la dominance et la divergence. Toutefois, lorsqu'une vague folliculaire émerge (4mm), la prochaine est en préparation (1-3 mm) (Jaiswal, et al., 2004). La FSH est l'hormone qui régit les vagues folliculaires. La sécrétion de FSH présente un patron diurne (Jaiswal, et al., 2004). La sécrétion augmente progressivement durant la journée pour atteindre un maximum en soirée. La vitesse de croissance des follicules d'une vague folliculaire suit le même patron de sécrétion que la FSH, mais décalée de 6h. Ainsi la vitesse de croissance folliculaire est maximale 6h après le pic de FSH journalier (Jaiswal, et al., 2004). Environ 60h avant le début de la vague folliculaire normale (ou pendant la dominance de la vague précédente) commence la croissance de la prochaine vague folliculaire (Adams, et al., 1992, Jaiswal, et al., 2004). Le nombre de follicules de 1-3mm augmente. Dès lors, le futur FD ainsi que le futur premier et le

deuxième FS peuvent être distingués parmi la population de petits follicules. Leur croissance est régie par la sécrétion diurne de FSH qui est trop faible pour les FS de la vague précédente, mais suffisante pour leur croissance.

Le recrutement ou le début de la vague folliculaire (J0) coïncide avec le pic de FSH. Les FD et FS mesurent entre 4-5 mm. Ils sont dits être FSH-dépendants (Adams, et al., 1992, Gong, et al., 1995, Gong, et al., 1996). La sélection du FD (J2.5) est caractérisée par la taille significativement plus grande du FD (8.5 mm) (Ginther, 2000) et une augmentation de la concentration d'inhibine qui entraîne la diminution de la sécrétion de FSH. La croissance des FS est ralentie. Le FD ayant augmenté le nombre de ses récepteurs à la LH, il entre en phase de dominance. Durant environ 2 jours, les FS sont toujours bons et prêts à remplacer le FD, c'est la phase statique. Le FD sécrète toujours de l'E2 et de l'inhibine afin d'inhiber la sécrétion de FSH qui entraîne vers le 5^e jour l'atrésie des FS (Adams, et al., 1992, Adams, et al., 1993, Kaipia and Hsueh, 1997).

Selon le moment du cycle œstral, la phase de divergence, impliquera l'atrésie du FD ou l'ovulation si le cycle est respectivement en phase lutéale ou folliculaire. Dans les deux cas, la perte du FD engendre une nouvelle vague folliculaire (Adams, et al., 1993).

3-4- L'atrésie folliculaire :

L'atrésie folliculaire réfère à la dégénérescence de tous les follicules qui n'ovuleront pas, soit plus de 99.9% des follicules. L'atrésie peut survenir à n'importe quel moment de la croissance folliculaire (Gougeon, 1986), à l'exception du stade final, le corpus luteum.

L'atrésie est le terme utilisé en reproduction pour décrire l'apoptose des cellules du follicule (Hsueh, et al., 1994). L'atrésie est régulée au niveau endocrinien par la FSH et la LH, ainsi que par des facteurs paracrines tels que l'IGF-I, le EGF, le bFGF, l'activine et l'IL-1 β . Parmi les facteurs induisant l'atrésie, appelés facteurs atrérogéniques, on retrouve le TNF- α , la GnRH, les androgènes, l'IL-6 et les radicaux libres (Kaipia and Hsueh, 1997).

L'atrésie est un événement cellulaire actif qui nécessite la transcription de gènes spécifiques et la traduction de nouveaux facteurs (Svanberg and Billig, 1999). Selon la littérature, la majorité, sinon la totalité des inhibiteurs d'atrésie sont régulés par la FSH et la LH (Markström, et al., 2002).

Il existe deux familles de régulateurs intracellulaires de l'apoptose : la famille des caspases et celle de Bcl-2. Les caspases sont reconnues pour exécuter l'apoptose: dégradation des protéines du cytosquelette et de la membrane nucléaire, ainsi que la digestion de l'ADN.

Les membres de la famille de Bcl-2 sont responsables de la régulation de l'apoptose. La famille Bcl-2 est constituée d'autant de membres anti (Bcl-2 et Bcl-XL) que pro-apoptose (Billing, et al., 2002). Les mitochondries sont cruciales dans la machinerie apoptotique, car elles renferment des agents pro-apoptotiques (Cytochrome c, apoptosis-inducing factor (AIF) et plusieurs pro-caspases) qui sont relâchés dans le cytoplasme suite à un signal spécifique.

Au stade primordial, l'ovocyte semble être le responsable de la dégénérescence folliculaire (Morita and Tilly, 1999, Reynaud and Driancourt, 2000). Comme facteurs anti-apoptotiques, il y a l'interaction de Kit avec le ligand de Kit (Driancourt, et al., 2000) et le facteur GDF-9 (Dong, et al., 1996) qui sont cruciaux pour la survie des ovocytes et des petits follicules. D'autres facteurs anti-apoptotiques sont produits dans le follicule préantral, comme le Keratinocyte growth factor (KGF) et le Fibroblaste growth factor (FGF) (McGee, et al. 1999) qui aident également à la croissance et la différenciation. Les estrogènes (Billing, et al, 2002), le GMPc (Mc Gee, et al., 1997) et la vitamine C (Murray, et al., 2001) jouent également un rôle anti-apoptotique.

Vers la fin de la croissance du follicule, la réduction du grand nombre de follicules en croissance pour arriver qu'à un seul follicule ovulatoire est principalement dû à l'apoptose des cellules de granulosa (Hsueh, et al., 1994, Reynaud and Driancourt, 2000). Après l'entrée en apoptose des cellules de granulosa et le début de l'invasion des leucocytes suite au bris de la membrane basale du follicule, le complexe ovocyte et cellules du cumulus (COC) est un des derniers à être affecté par l'atrésie (Kruip and Dieleman, 1982). À ce stade, l'ovocyte entre en pseudo-GVBD. Dans ces circonstances, ce phénomène est appelé pseudo maturation. Ce phénomène serait le résultat de la perte de contact entre les cellules du cumulus et l'ovocyte. Lors de la vague folliculaire, le début de l'atrésie se produit au stade tardif de la phase statique et au début de la phase de régression des follicules (Salamone, et al., 1999).

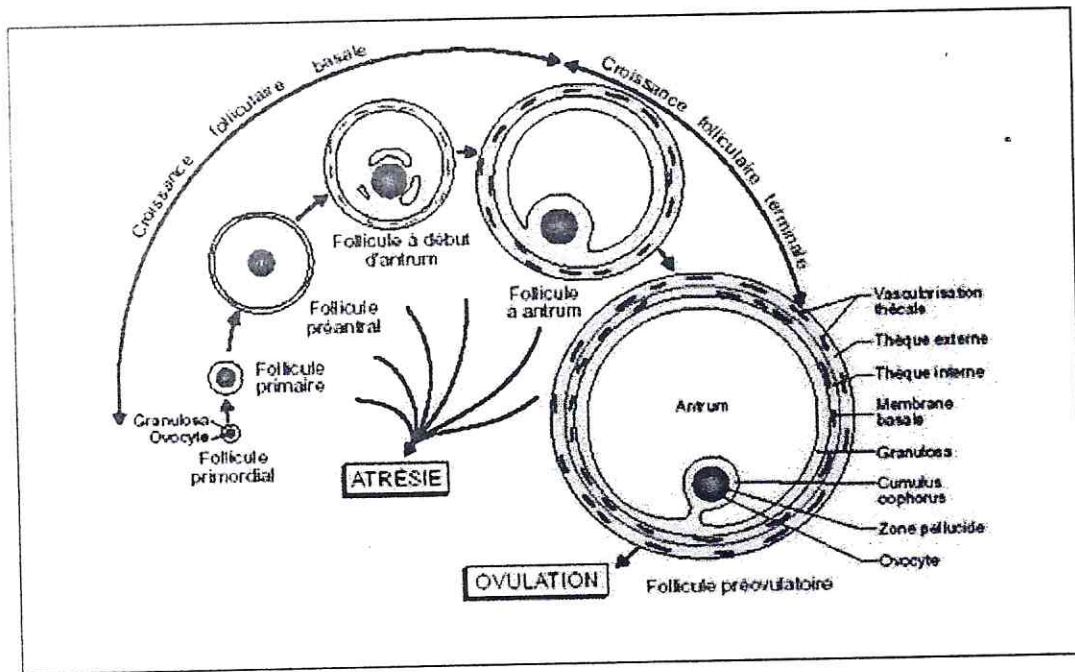


Figure n° 1 : Les différentes étapes de la folliculogénèse.

Source : Monniaux et al., 1999

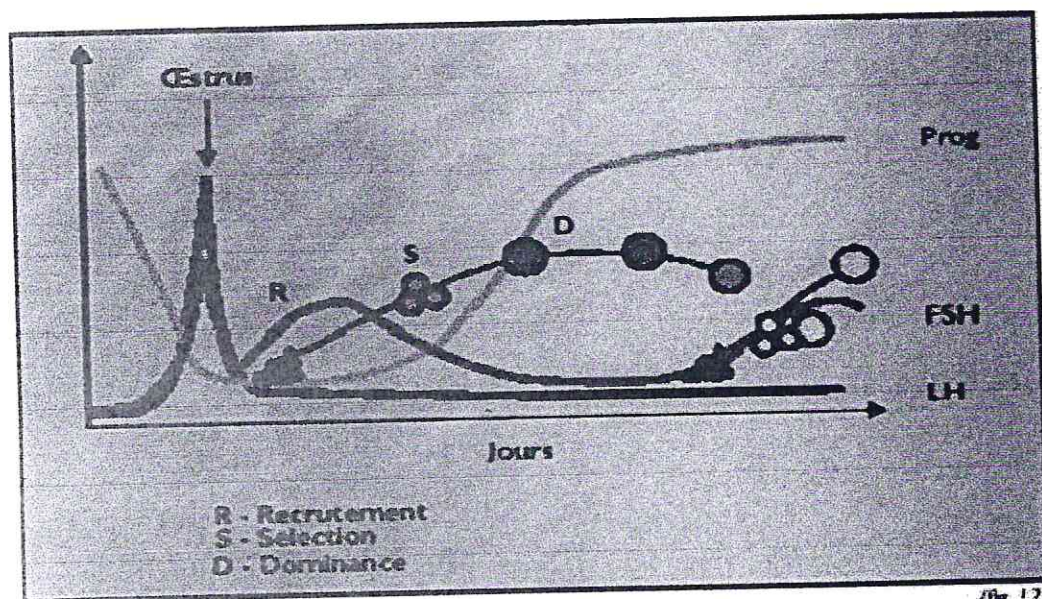


Figure n° 2 : Emergence d'une vague folliculaire. Source : Roche, 2003

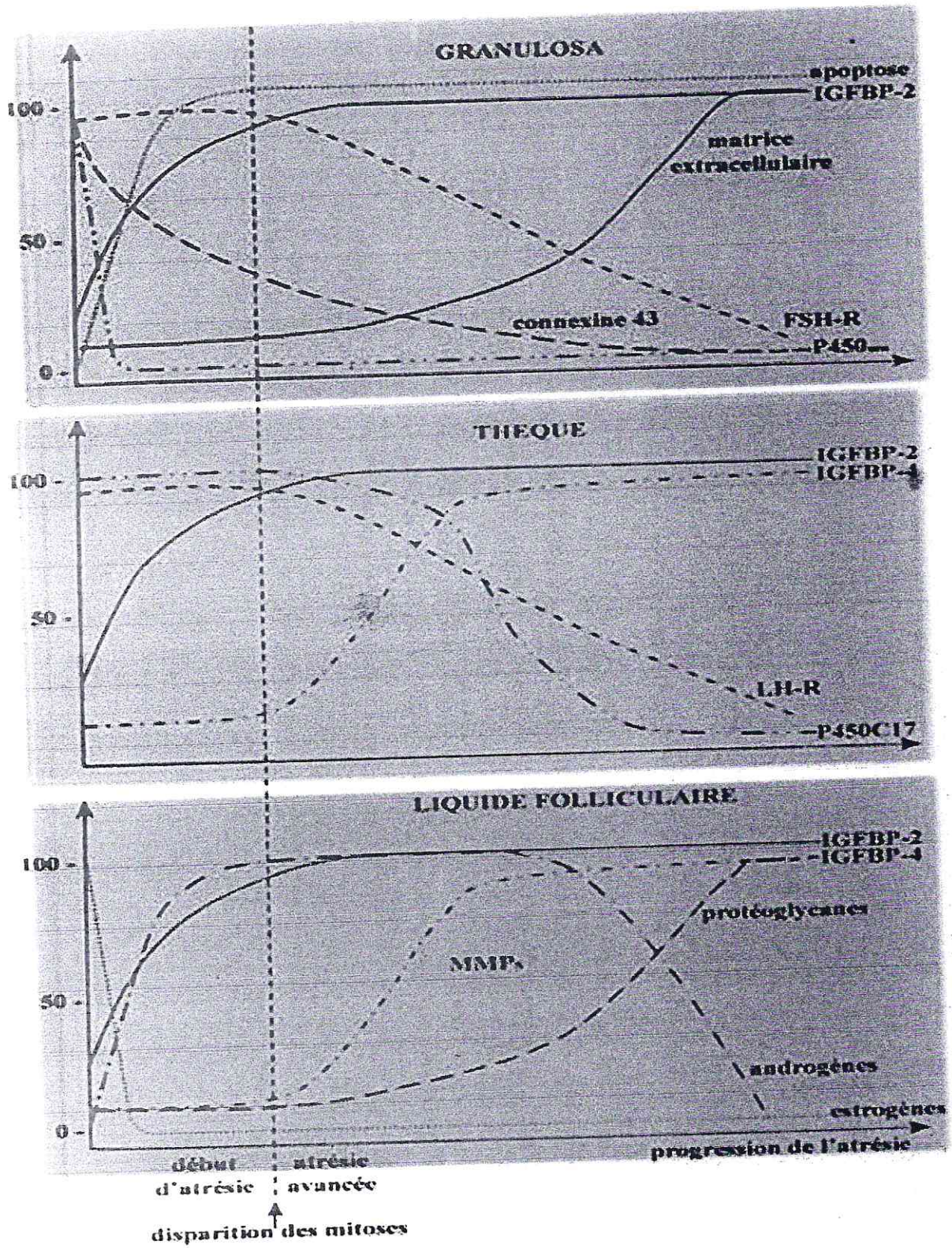


Figure n° 3 : le phénomène de l'atresie folliculaire.

Source : (Monniaux et al., 1999).

4- La croissance de l'ovocyte:

La croissance ovocytaire est un processus complexe au niveau nucléaire et cytoplasmique qui prépare l'ovocyte à être apte à reprendre la méiose, à être fécondé, ainsi qu'à supporter le développement embryonnaire et à coordonner l'activation du génome embryonnaire. L'activation du génome embryonnaire est appelée la transition maternel-embryonnaire (MET). Tout au long de sa croissance, l'ovocyte est maintenu en arrêt méiotique jusqu'au pic de LH.

4-1- la maturation cytoplasmique :

La maturation cytoplasmique est un processus qui se déroule durant tout le développement embryonnaire. L'apparition, la migration, l'augmentation de la taille et du nombre, ainsi que des changements morphologiques des organelles se produisent durant la croissance de l'ovocyte. Plus particulièrement, les granules corticaux apparaissent au stade du follicule secondaire. Ils se regroupent ensemble et augmentent leur nombre jusqu'à l'ovulation. Les mitochondries adoptent une morphologie différente des cellules somatiques. Elles sont rondes ou allongées au début et deviennent rondes avec une vacuole ouverte sur le cytoplasme vers la fin. Durant la croissance, elles sont plus en périphérie et suite à l'ovulation, elles se regroupent au centre. Les gouttelettes lipidiques augmentent en nombre et taille, et suivent le patron de migration des mitochondries.

Suite au pic de LH, l'ovocyte subit des transformations importantes qui représentent la maturation finale, appelée également la capacitation de l'ovocyte. Les transformations sont les suivantes. Le nucléole prend la forme d'un anneau avant de disparaître lors de la GVBD. Une perte de contact entre les cellules du cumulus et l'ovocyte, l'alignement des granules corticaux sous l'oolemma afin de prévenir la polyspermie suite à la fécondation, l'association des gouttelettes lipidiques avec les mitochondries et leur migration au centre de l'ovocyte, la diminution des appareils de Golgi et la redistribution des ribosomes près des chromosomes (Hyttel, et al., 1997) sont des changements qui se produisent dans les 24h suivant le pic de LH. Ces changements cumulatifs indiquent un statut métabolique moins actif. Cette baisse d'activité métabolique indique que l'ovocyte est mûr et prêt à être fécondé (Dieleman and Bevers, 1993).

4-2- la reprise de la méiose :

In vivo, l'ovocyte reprend la méiose suite au pic de LH. La reprise de la méiose se fait en deux étapes. La première consiste au passage du stade GVBD à la métaphase 1 (M1). La deuxième étape constitue la poursuite en métaphase II (M2). Toutefois, la reprise de la méiose peut être provoquée artificiellement par le remis de l'ovocyte dans son follicule (Edwards, 1965; Pincus et Enzmann, 1965). Cette propriété de l'ovocyte a permis d'observer que la capacité de l'ovocyte à reprendre la méiose, aussi appelée la compétence méiotique, s'acquière bien avant d'avoir atteint la compétence au développement.

La compétence au développement est la capacité de l'ovocyte à produire un embryon suite à la fécondation. Plus particulièrement, les ovocytes dont la taille est inférieure à 90 µm sont incapables de reprendre la méiose. lorsqu'ils sont plus grands que 91 µm, ils peuvent entrer en GVBD, mais il ne compléteront pas la M1 avant d'avoir atteint la taille de 101 µm. Ce n'est qu'à 110 µm que les ovocytes peuvent compléter la M2 (Fair et al., 1995).

5-L'ovulation :

La fécondation résulte de l'union d'un gamète mâle, le spermatozoïde et d'un gamète femelle qui est bien l'ovule ; chez la vache cette fécondation s'accomplirait près de la jonction isthmo-ampoulaire de l'oviducte peu de temps après l'ovulation (environ 2 heures) (Hunter, 1985).

Après la fécondation, l'embryon se dépouille des dernières cellules de la corona radiata l'entourant mais conserve intacte sa zone pellucide (ZP) (Crozet, 1984). La zone pellucide est une structure imperméable, cellulaire et translucide entourant déjà l'ovocyte dans sa cavité folliculaire. Elle est traversée par des canaux permettant aux extensions des cellules de la corona radiata un contact avec l'oocyte (Fléchon et Gwatkin, 1980). La présence de la ZP jusqu'au stade morule compacte serait essentielle au développement normal de l'embryon, elle permettrait la cohésion des blastomères et jouerait un rôle de protection et de maintien de l'homéostasie de l'espace périvitelin (Trounson et Moore, 1974). Elle joue aussi un rôle important dans le contrôle de la polyspermie (Wolf, 1981).

5-1- les premières divisions aux stades morule :

Le zygote bovin entreprend une série de clivage successifs, des divisions mitotiques séparées par des interphases. *In vivo*, le premier clivage se produirait de 24 à 28

heures après l'ovulation et le deuxième clivage commencera le deuxième jour (Thibault 1966). Jusqu'au stade de huit cellules, les jeunes blastomères sont arrondis et couverts de microvillosités sauf aux endroits où ils se touchent. Le stade huit cellules est un stade de transition où l'on voit apparaître des zones focales de contact entre les blastomères. Le cytoplasme sous ces zones de contact devient dense aux électrons au stade de 16 cellules (Betteridge et Fléchon, 1988). Les jeunes embryons bovins sont habituellement décrits par leur nombre de blastomères, mais ceci devient progressivement plus difficile à compter parce qu'ils contiennent de nombreux globules de gras les rendant opaques (Betteridge et Fléchon, 1988).

L'embryon bovin quitte l'oviducte pour entrer dans l'utérus environ quatre jours après l'ovulation. Il compte alors 16 cellules aux contours bien distincts et ressemble à une petite mure, d'où le nom de la morula (morule) qui lui est donné. Entre 32 et 64 cellules, la morule entreprend la compaction (morule compacte), un processus caractérisé par un remaniement et une opacification du contenu cytoplasmique rendant indistincts les contours cellulaires. De nombreux changements structuraux sont associés à la compaction : perte de la forme sphérique des blastomères, perte d'un grand nombre de vésicules intracytoplasmiques, modification des mitochondries, formation des (tight junction) entre les blastomères ... La compaction est pré-requis à la formation du blastocoele puisque la présence des tight junction rendra les membranes imperméables et permettra l'accumulation du liquide à l'intérieur du blastocoele (Betteridge et Fléchon, 1988)

5-2- le blastocyste : formation du blastocoele, expansion, éclosion et allongement :

La formation du blastocoele débute vers le sixième jour après la fécondation (Lindner et Wright, 1983). Les cellules de la morule se réorganisent alors autour d'une cavité centrale, appelée cavité blastocoele. Au début, la cavité contenant le fluide est très petite, c'est le jeune blastocyste ; mais progressivement le liquide repousse les cellules au pourtour et la cavité s'agrandit, c'est alors le blastocyste. La formation du blastocoele est un processus actif qui impliquera la production d'eau au sein des mitochondries grâce au métabolisme des lipides, il commencera avant l'acquisition des barrières imperméables entre les cellules (Betteridge et Fléchon, 1988). Chez le lapin, la formation du blastocoele serait liée à l'élaboration d'un système de pompes sodium / potassium (Na^+ / K^+) qui permettrait le transport d'ions à travers les membranes cellulaires vers l'intérieur de la morule (Benos Biggers 1981).

Au stade blastocyste les cellules embryonnaires se différencient en deux populations distinctes qui prolifèrent pour former d'une part le disque ou bouton embryonnaire et d'autre part les membranes extra embryonnaires (trophectoderme).

Sous la pression de plus en plus forte du blastocoele qui prend de l'expansion, la ZP^e entourant l'embryon s'amincit progressivement, c'est le blastocyste en expansion. Entre les huitième et dixième jours, le blastocyste sort de sa zone pellucide, c'est le blastocyste éclos ((Betteridge et Flechon, 1988). Le blastocyste pourrait faciliter sa propre éclosion en lysant partiellement la ZP par une activation du plasminogène en plasmine (Menino et Williams, 1987).

Au début, le blastocyste éclos et de forme sphérique puis il devient ovoïde avant de commencer à s'allonger progressivement entre le douzième et le quatorzième jour (Betteridge et coll, 1980), et former un filament pouvant atteindre 70 mm de longueur vers le seizième jour (Betteridge 1977). Les cellules trophoblastiques se différencient alors en deux populations distinctes ; les cellules trophoblastiques ordinaires (cuboïdes ou cylindriques) et les cellules géantes (Greenstein et Coll., 1958). Les cellules géantes, bien reconnaissables dès le seizième jour, seraient la source de lactogène placentaire chez les ovins et les bovins et pourraient jouer un rôle important dans le maintien du corps jaune en début de gestation (Wooding, 1982). C'est aussi dans cette période que l'embryon doit signaler sa présence à la mère afin de prévenir la luteolyse. L'incapacité de l'embryon à produire le signal anti-luteolytique peut être l'une des causes de la mortalité embryonnaire dans l'espèce bovine (Thather et Cool., 1984a, 1989a, 1989b ; Heap et Coll 1988 ; Roberts et coll., 1990).

Durant la phase de pré-implantation, l'embryon bovins est libre dans les fluides tubaires des jours 1 à 4 (Hunter, 1980), puis sans attache vraiment intime avec l'utérus avant le jour 30 (King et Coll., 1982). Durant cette longue période, il est totalement dépendant pour sa nutrition de ses réserves internes et des sécrétions contenues dans la lumière tubaire et utérine. La composition de ces sécrétions est complexe et varie rapidement en début de gestation sous l'influence des stéroïdes ovariens maternels (Roberts et Bazer, 1988 ; Ashworth et Bazer, 1989). La synchronicité embryo-maternelle est essentielle pour la survie embryonnaire puisque lors d'une asynchronie importante les embryons ne peuvent s'implanter et deviennent anormaux (Wilmot et Sals, 1981). Deux hypothèses peuvent expliquer pour quoi les embryons sont incapables de s'implanter dans un utérus asynchrone. Premièrement, l'embryon peut être incapable de donner les signaux embryonnaires nécessaires afin de transformer l'endomètre pour répondre à ses besoins nutritifs, d'induire un état de tolérance immunologiques chez la mère et de prévenir la luteolyse (Ashworth et Bazer, 1989) Deuxièmement, les sécrétions utérines asynchrones peuvent être incapables de combler

les besoins (facteurs de croissance et nutriments) des embryons en développement (Ashworth et Bazer, 1989 ; Ashworth, 1992). On croit que l'asynchronie serait une cause fréquente de mortalités embryonnaires dans l'espèce bovine (Wilmuth et Sales, 1981 ; Maurer et Echtenkamp, 1982 ; Pope, 1988 ; Albihn et Coll., 1991) surtout lors des transferts embryonnaires.

6 -Le cycle oestral chez la vache laitière :

Chez la vache, la durée du cycle œstral est de 20 ou 23 jours selon qu'il est constitué de 2 ou 3 vagues folliculaires. Le cycle oestral débute à l'ovulation. Suite à l'ovulation, les cellules de la thèque et de la granulosa du FD complètent leur transformation en cellules lutéales et prolifèrent afin de former le corps lutéal (CL). C'est la phase lutéale chez le bovin. C'est en partie la durée de cette phase qui détermine le nombre de vagues folliculaires lors d'un cycle oestral (Ginther, et al., 1989, Fortune, 1993). Le CL sécrète de la P4 et un peu d'œstrogènes afin de diminuer la fréquence des pulses de GnRH, ayant pour conséquence d'empêcher un pic de LH pré ovulatoire en réponse à la croissance d'un nouveau FD, et ainsi empêcher son ovulation (Savio, et al., 1993, Stock and Fortune, 1993).

Une autre fonction de la P4 est la préparation de l'utérus à l'implantation. Le CL persiste jusqu'au jour 16 ou 18 du cycle selon le nombre de vagues. À ce moment, s'il n'y a pas de gestation, le CL cesse la sécrétion de P4, c'est le début de la phase folliculaire. La phase folliculaire est caractérisée par une augmentation du niveau d'œstrogènes, plus particulièrement de l'E2 produite en grande partie par le FD. Arrivée à un certain seuil, l'E2 perd son rôle de rétroaction négative sur l'hypophyse et permet à cette dernière de répondre à nouveau aux pulsations de GnRH. La pulsativité de la GnRH permet la libération des gonadotrophines, mais surtout de la LH. Suite à un pic de GnRH, un pic de LH est produit ainsi qu'un pic de moindre envergure de FSH. En réponse au pic de LH, il y a déclenchement de l'œstrus (J20-J23) qui dure entre 12-16h (Déziel, 1996) et l'ovulation est observée au jour (J0) soit 10 à 15h après la fin de l'œstrus ou 29-31h après le pic de LH (Driancourt, et al., 2001).

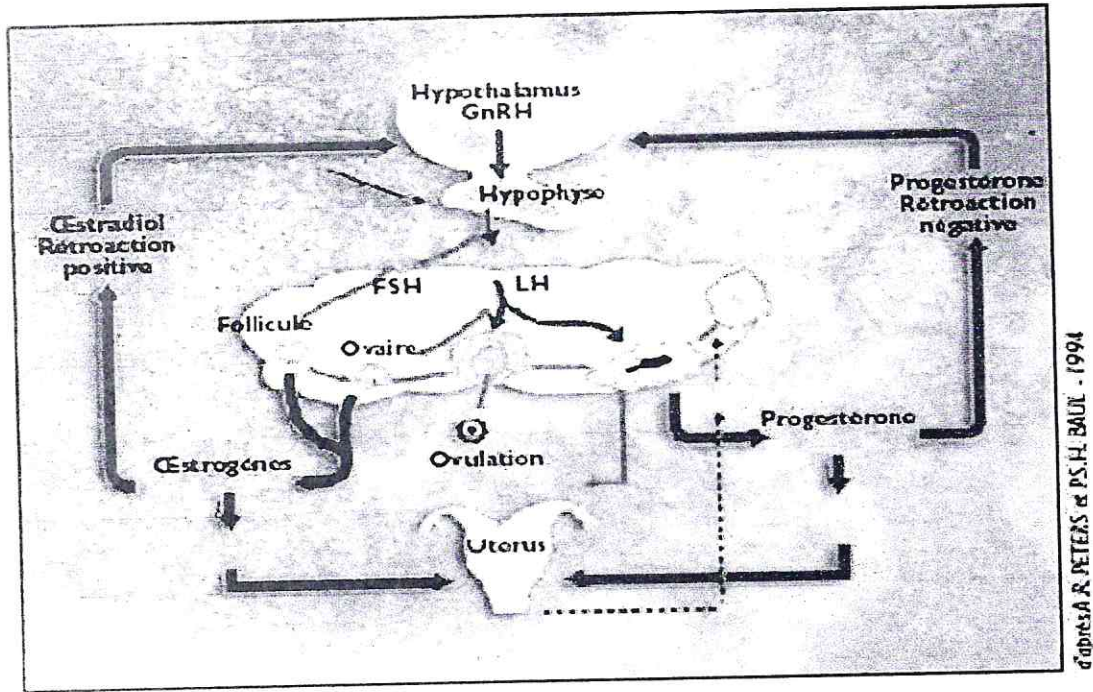


Figure n°4: régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire .

Source : (Peters et Baul, 1994)

Tableau n° 1 :

Compétence au développement d'ovocytes de ruminants issus de follicules de différentes tailles cultivés pendant 7 jours après maturation et fécondation *in vitro*.

Source : Crozet et al., 1995, Pavlok et al., 1992

	Diamètre folliculaire (mm)	% d'œufs clivés	% de blastocystes
Chèvre	2-3	46	6
	3,1-5	55	12
	>5	69	26
Vache	< 2	20	0
	2-4	64	21
	4-8	69	28

CHAPITRE -II- :
FECONDATION IN VITRO

1-Introduction:

Les biotechnologies animales présentent un enjeu économique majeur puisque l'on estime à environ 100 000 milliards de dollars les pertes économiques mondiales annuelles dues aux mortalités des animaux, au coût des traitements et aux pertes de production. (Babiuk L. A., Philips J.P., 1989).

Ces biotechnologies présentent la potentialité de développer une grande variété de produits nouveaux (naturels, synthétiques, ou recombinants) et d'améliorer les productions animales en augmentant la productivité des troupeaux ou en diminuant leurs coûts. Les biotechnologies de l'élevage font également appel aux nouvelles stratégies de la reproduction telles que la maîtrise des cycles sexuels, l'insémination artificielle et surtout les biotechnologies de l'embryon : transfert embryonnaire, la congélation des embryons, sexage, fécondation *in vitro* (FIV) et en fin la transgénèse et le clonage.

Certaines de ces technologies sont passées de l'animal à l'homme comme la fécondation *in vitro*, le transfert embryonnaire et la congélation des embryons. D'autres technologies animales de la reproduction comme le sexage, la transgénèse germinale ou le clonage reproductif sont heureusement pour des raisons d'éthiques, absolument interdites dans l'espèce humaine. Cependant, certaines méthodes comme la transgénèse somatique ou thérapie génique sont expérimentées pour des applications thérapeutiques chez l'homme.

D'autre technique comme le diagnostic préimplantatoire couramment employé actuellement en élevage pour le sexage des embryons commence à être utilisé dans l'espèce humaine pour prévenir des maladies génétiques majeures telles que la mucoviscidose et éviter ainsi des avortements thérapeutiques tardifs.

Il convient d'observer une prudence extrême dans la transposition des biotechnologies de la reproduction animale à l'espèce humaine. Il nous paraît sage de continuer de considérer que la manipulation du génome embryonnaire humain reste totalement prohibée. Nous nous devons à la fois de faciliter les progrès de la recherche animale au bénéfice de l'homme tout en restant extrêmement vigilant quand aux risques de dérives eugéniques. (Postel-Vinay O., Millet A., 1997), (Testart J., 1992)

2- La fécondation *in vitro* :

2-1- Introduction :

L'obtention d'embryons par fécondation *in vivo* comporte plusieurs inconvénients relativement au nombre d'embryons produits qui reste limité par le nombre d'ovocytes

maturés à chaque cycle, même après super ovulation et au prix des embryons qui reste ainsi relativement élevé.

La possibilité de produire l'ensemble de ces événements intégralement *in vitro* a permis de changer de manière significative la situation car au moment actuel il est possible d'accéder à la maturation des ovocytes *in vitro* ; c'est un événement qui correspond essentiellement à l'ovulation, il faut donc pour cela obtenir tout d'abord des ovocytes en cours de maturation. De tels ovocytes sont disponibles en relative abondance dans les ovaires d'une femelle sexuellement mature.

2-2- Le début de la fécondation *in vitro* :

Nos connaissances précises de la fécondation sont relativement récentes, puisqu'elles ne remontent qu'à la fin du XIX^e siècle. C'est en 1879 que FOL observe dans l'eau de mer, pour la première fois, chez les invertébrés une fécondation *in vitro* naturelle à partir des gamètes d'étoile de mer.

Chez les mammifères, nos principales connaissances de la fécondation *in vitro* sont acquises à la même époque par l'école belge, chez la lapine, la souris et la chatte (Van Beneden, 1875 ; Van Der stricht, 1923). La première FIV chez les mammifères est réalisée en 1953 à la station de la physiologie animale (INRA) de Jouy-en-Josas par Thibault et son équipe (Dauzier et Wintenberger), chez la lapine à partir de spermatozoïdes capacités dans l'utérus et d'ovocytes très récemment ovulés. Ensuite, la naissance des premiers lapereaux obtenus par FIV confirme la normalité biologique de ce type de technologie (Chang, 1959).

Ce n'est que près de 20 ans plus tard, dans l'espèce humaine, qu'Edwards (1978) obtient le premier « bébé-éprouvette » en Angleterre et Testar et Frydman (1981) la petite Amandine, en France.

On comptait 10 ans plus tard près de 10 000 couples déclarés inféconds bénéficiant de près de 30 000 tentatives de Fivete (FIV et TE) (Testar j., 1992). L'injection directe d'un spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI), a encore complété la FIV pour les oligospermies. FIV et ICSI atteignaient chacune, en 1996, plus de 30 % de succès de grossesse pour les centres les plus performants de procréation médicalement assistée. Paradoxalement, la naissance après fécondation *in vitro* des animaux de fermes n'est réussie que tardivement : le premier veau date de 1982, puis les premiers chevreaux de 1985, agneaux et porcelets de 1986, le premier poulain conçu *in vitro* de seulement 1990. La raison de ces retards réside dans les difficultés biologiques rencontrées pour la maturation ou capacitation des spermatozoïdes. Enfin, ce n'est qu'au début des années 1990, grâce à des améliorations techniques en bonne partie

empirique, que sont nés les premiers embryons cultivés *in vitro*, à partir de maturation *in vitro* d'ovocytes suivie de FIV (rats, souris, agneaux, chevreux, porcelet et veaux).

Tableau n° 2 : un bref historique de la fécondation *in vitro* chez les mammifères et de production *in vitro* d'embryons bovins. (D'après P. GUERIN et al., 1996)

La première fécondation <i>in vitro</i> chez les mammifères.	FIV avec maturation ovocytaire <i>in vivo</i> et capacitation <i>in vivo</i> (lapin).	1954
	La première naissance (lapin).	1959
	Capacitation <i>in vitro</i> (Hamster).	1959
	FIV avec maturation ovocytaire <i>in vitro</i> (lapin).	1963
Fécondation <i>in vitro</i> et production d'embryon <i>in vitro</i> Chez les bovins	FIV avec maturation ovocytaire <i>in vivo</i> .	1973
	La première naissance.	1980
	FIV avec maturation ovocytaire <i>in vitro</i> .	1982
	Première naissance après maturation <i>in vitro</i> et fécondation <i>in vitro</i> .	1985
	Fécondation <i>in vitro</i> avec utilisation de spermatozoïdes congelés.	1986
	Obtention d'un développement pre-implantatoire <i>in vitro</i> .	1988
	Utilisation de l'héparine.	1988
	Ovum Pick Up.	1988
	Première naissance après transfert d'un embryon congelé produit <i>in vitro</i> .	1990

2-3- Importance économique de la fécondation *in vitro* :

Actuellement, la fécondation *in vitro* ne joue qu'un rôle modeste dans l'élevage des animaux de fermes mais, comme nous l'avons vu, son application est très récente chez les animaux de rente. En réalité, la fécondation *in vitro* est déjà une technologie intégrée au transfert embryonnaire lors de la production industrielle des embryons bovins, qui va de maturation ovocytaire *in vitro*, la congélation du blastocyste à sa transplantation *in utero*.

Lorsque la maturation des ovocytes bovins sera maîtrisée, une nouvelle étape essentielle s'ensuivra car, grâce à la fécondation, elle permettra l'union des gamètes, conservés

de manière séparée dans des banques de sperme et d'ovocytes, indépendamment du temps et de l'espace, comme c'est déjà le cas de l'insémination artificielle.

Suivie par le développement embryonnaire *in vitro*, la fécondation *in vitro* ouvre encore la voie au diagnostic pre-implantatoire qui est déjà utilisé chez les embryons bovins sexés. Immédiatement après la fécondation *in vitro*, la formation des pronoyaux mâles et femelles est le moment de choix pour l'introduction par micro-injection d'un gène étranger intéressant : c'est la transgénèse germinale et ses multiples applications pour faire produire des molécules recombinantes d'intérêts ou pour introduire chez l'animal un gène de résistance aux maladies.

2-4- importance scientifique de la fécondation *in vitro*.

La fécondation *in vitro* est une technique précieuse pour mieux comprendre les mécanismes *in vivo* de la fécondation. Claude Bernard n'écrivait-il pas « Nous devons, autant que nous le pouvons, à l'aide des analyses expérimentales, transporter les actes physiologiques en dehors de l'organisme. Cet isolement nous permet de voir et de mieux saisir les conditions intimes du phénomène, afin de les poursuivre ensuite dans l'organisme pour interpréter leurs rôle vital ».

Avec la fécondation *in vitro*, c'est aussi étudier les problèmes qui y sont liés : maturation de l'ovocyte, capacitation du spermatozoïde, activation de l'œuf, contrôle du génome embryonnaire, mécanisme de division cellulaire, influence des génomes maternels et paternels, interaction entre le noyau et le cytoplasme, rôle des ARN messagers cytoplasmiques d'origine maternelle,... etc.

La fécondation *in vitro* offre encore la possibilité d'analyser par greffes nucléaires les mécanismes de différenciation de noyau, passage obligé pour la mise au point de la technologie du clonage embryonnaire. La visualisation des deux pro noyaux mâle et femelle permet encore les manipulations nucléaires utiles à l'étude de phénomènes biologiques fondamentaux la parthénogenèse, la gynogenèse, l'androgenèse,... etc.

2-5- Les étapes de la fécondation *in vitro* :

Le prélèvement des ovocytes à partir d'ovaires de bovins à savoir après abattage ou par ponction sous contrôle échographique (OPU) et leur maturation dans des milieux de culture bien étudiés permettent aujourd'hui de produire des embryons suite à une fécondation

in vitro, les embryons ainsi obtenus seront cultivés pendant une durée qui est égale à 7 jours et seront par la suite transférés dans une receveuse ou bien orientés à la congélation.

Des essais de transfert sur des vaches repeat breeding ont été réalisés par différentes équipes en France et en Angleterre, les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de cette technique dans le traitement des vaches stériles.

2-5-1 : les techniques de récolte d'ovocytes :

2-5-1-1- la récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir :

Plusieurs techniques de récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir ont été mises en pratique par plusieurs chercheurs tel que, Blodin et Marc-andré- sirard.

a- Méthode Citée par Christian Hansen :

La récolte des ovocytes est effectuée après récupération des ovaires à l'abattoir ; la collecte d'ovaires doit être réalisée dans les deux heures suivant l'abattage de l'animal concerné et seront par la suite conservés à une température qui est comprise entre 24 et 30°C . En ce qui concerne la ponction folliculaire ou d'autre terme la récolte d'ovocytes proprement dite, elle doit s'effectuer dans les quatre heures suivants la collecte des ovaires.

L'une des méthodes les plus ancienne utilisée pour la récolte d'ovocyte est celle qui se base sur le prélèvement d'ovocytes par aspiration du liquide folliculaire au moyen d'une aiguille (19G à biseau court) c'est une technique qui permet en moyenne de récupérer entre 9 et 16 ovocytes par ovaires soit 30 à 60% des follicules ponctionnés.

P. Guérin et al (1996) trouvent que cette technique permet de récolter une moyenne de 6 ovocytes par ovaire et une personne peut ponctionner une centaine d'ovaires en moins de 2 heures. La dissection préalable des ovaires permet l'obtention de 16 à 17 follicules par ovaires, c'est une méthode qui a pour avantage l'augmentation du pourcentage d'ovocytes morphologiquement normaux (60 à 63% versus 31 à 80 %) la conséquence est possible le fait que la dissection permet l'identification meilleur des follicules non atretiques, elle est cependant plus lente que la première.

La découpe de l'ovaire en tranche (slicing ovary) offre pour avantage l'augmentation du nombre d'ovocytes récupérés (20 à 55 par ovaire). Il est à noter que d'autres méthodes ont également été envisagées comme celle impliquant la digestion préalable de l'ovaire au moyen de la trypsine et qui permet l'obtention de 221 ovocytes par ovaire.

b- Méthode décrite par Blondin et M. A. Sirard :

Les ovaires bovins sont collectés à l'abattoir puis transportés au laboratoire dans une solution saline (Na Cl 0,9 %) dont la température est comprise entre 30 et 35 °C, cette solution est supplémentée de 100.000 UI Pénicilline, 100 mg de streptomycine et 250 mg amphotercin B per liter (sigma).

Le contenu des follicules de 1 à 5 mm est aspiré au moyen de seringue de 10 ml à 18 gauge needle. Le contenu des follicules sera versé dans des tubes de 50ml, après sédimentation, le COC sera prélevé par utilisation d'un stereomicroscope.

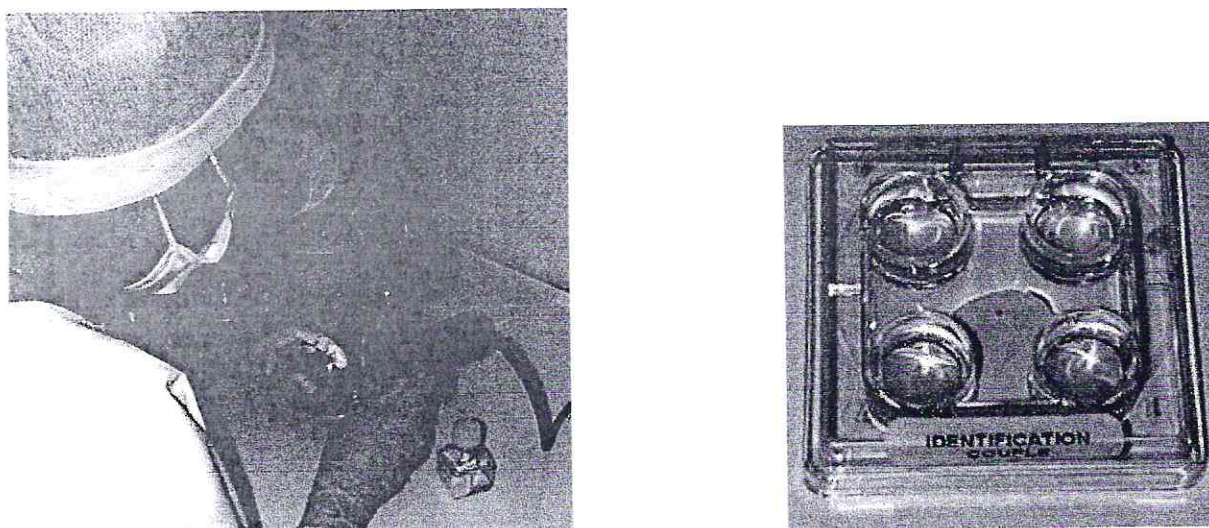


Figure n°5 : Recherche et mise en culture des ovocytes (Hamamah, et al., 1996)

2-5-1-2- la récolte d'ovocytes *in vivo* par la technique d'OPU :

Les premières estimations du coût d'un veau produit par ponction folliculaire écho guidée d'ovocytes (OPU) associée à la fécondation *in vitro* étaient deux fois celui d'un embryon produit *in vivo* (Nibart et al., 1995). En 1998, il a pu être diminué à près de 1,2 fois celui du veau issu de TE classique (Colleau et al., 1998). Le coût de la production d'embryons bovins *in vitro* va donc vers une diminution progressive grâce aux systèmes d'organisation de la production et aux améliorations technologiques.

La technique d'OPU (Pieterse et al., 1988), qui dérive directement de la méthode de prélèvement d'ovocytes pratiquée en routine dans l'espèce humaine lors de FIVETE, a permis de faire des progrès considérables dans la collecte des ovocytes bovins par comparaison à la méthode encore largement utilisée de lavage utérin. La collecte est réalisée à l'aide d'une aiguille introduite dans le cul de sac dorsal du vagin. La sonde échographique permet de

visualiser les follicules ovariens de stade III, de 2 à 6 mm, qui seront ponctionnés. Les sondes utilisées chez les bovins sont généralement des sondes vaginales prévues pour la collecte d'ovocyte chez la femme (sonde sectorielle de 5 à 7,5 Mhz) : la sonde est utilisée dans une gaine de prolongation et équipée d'aiguille très longues (30cm) ou d'un système de prolongation d'aiguille. L'animal reçoit un tranquillisant et souvent une anesthésie épidurale. La sonde est introduite par le vagin et l'ovaire et saisie par voie rectale, puis amené face à la tête de la sonde. Les follicules sont alors visibles sur l'écran de l'appareil échographique puis placés face à l'aiguille qui traverse alors la paroi vaginale puis celle des follicules. Un système d'aspiration dans du tampon phosphate (PBS) et de l'héparine permet de recueillir le liquide folliculaire et l'ovocyte entouré de son cumulus oophorus, constitué de cellules folliculaires.

La ponction transvaginale sous guidage échographique est une technique peu invasive. Elle ne nécessite pas de préparation hormonale de la donneuse. Elle permet la répétition des collectes à une fréquence élevée (jusqu'à deux par semaine pendant 5mois). Elle permet d'obtenir environ 5 ovocytes par collecte et environ 30% de blastocystes transférables *in vitro*. Le tableau suivant illustre les progrès obtenus en cumulant OPU, maturation ovocytaire *in vitro* (MIV), la fécondation *in vitro* (FIV), et développement embryonnaire *in vitro* (DIV) jusqu'au stade J8 blastocyste transférable dans leur membrane pellucide. L'OPU a valorisé considérablement la FIV. L'OPU peut être faite dans les trois premiers mois de gestation des génisses et des vaches. En pratique, elle est réalisée soit une fois par semaine avec des animaux super ovulés, soit deux fois par semaines sans super ovulation.

Elle permet aussi d'obtenir des blastocystes à partir de femelles considérées comme infertiles Ou n'ayant pas répondu à des traitements de super ovulation.

Tableau n° 3 : Estimation du nombre moyen de veaux produits par femelle donneuse et par au après OPUst/FIV comparée à la production d'embryons *in vivo* après superovulation

	Etat physiologique	Nombres de collectes		Nombres d'embryons transférables/an	% de femelles donnant plus de 3 embryons	Taux de gestation	Nombre de veaux abattus
		Fréquence	Total/an				
OPU/FIV + culture d'embryons bovins jusqu'au TE	Vaches en production	2/semaine pdt 4 mois	32	40	100	50 %	20
	Vaches génisses	2/semaine Pdt 2 mois	16	20			
Collecte <i>in vitro</i> + culture d'embryons jusqu'au TE	Vaches génisses	2 collectes (+super-ovulation)		11	70	56 %	4
				2			

Les ovocytes sont obtenus oit après superovulation et lavage utérin (collecte *in vivo*), soit après ponction folliculaire d'ovocytes (OPU). Les ovocytes sont maturés *in vitro* (MIV), fécondés *in vitro* (FIV), puis cultivés jusqu'au stade blastocyste J8 et transplantés dans de leur membrane pellucide (TE).

a. OPU : Ovum Pick UP : ponction folliculaire d'ovocytes guidée par échographie. L'opération peut être répétée deux fois par semaines pendant 5 mois sans affecter apparemment la fertilité ultérieure des animaux (Nibart et Marquant-le-Guienne, 1995).

2-5-1-2-1-Le matériel et technique :

A- Le matériel échographiques :

Il se caractérise toute à la fois par la configuration et la fréquence de la sonde utilisée habituellement sectorielle la sonde peut néanmoins être semi- courbe (finger^o type) ou linéaire. sa fréquence s'échelonne entre 3,5 et 7,5 MHZ.

Cependant parce qu'elle offre une meilleure résolution, une sonde de 7,5 MHZ s'avère optimale pour visualiser la population folliculaire ponctionnable, déterminée *in vitro* par échographie, celle-ci se compose de follicules de diamètre compris entre deux et quatre mm (92%), entre 5 et 10 mm (6%) et supérieur à 10 mm (2%).

Comparée à d'autres méthodes, l'échographie sous-évalue cependant le nombre de follicules ponctionnables réellement présents sur l'ovaire. Ainsi comparant la détermination ante mortem par échographie et post mortem par dissection du nombre de follicules présents sur les ovaires, Gong démontre que l'échographie n'identifie que 19 et 44% des follicules de taille respectivement inférieur à 5 mm et comprise entre 5 et 10 mm. (HANZEN 2004).

B- Les aiguilles de ponction :

Selon les équipes, quatre types d'aiguilles sont utilisés. Le premier est constitué d'une seule pièce d'une longueur de 50 à 60 cm et biseautée à son extrémité. Son utilisation répétée entraîne l'émoussement.

Quoique possible un nouvel aiguisage de ces aiguilles ne leur restitue cependant pas leur tranchant initial. Elles sont par ailleurs fort coûteuses. Une amélioration a été apportée par l'utilisation d'aiguilles d'injection jetables fixées par collage ou soudure à une tubulure métallique d'un diamètre équivalent. Une réduction de l'espace mort entraîné par ces deux premiers types d'aiguilles a été obtenue en raccordant l'aiguille jetable à une tubulure en silicone passant au travers du tube métallique. Le dernier type d'aiguille comporte un double conduit. Cette adaptation technique offre la possibilité d'injecter du liquide dans la cavité folliculaire.

Le tranchant et l'échogénicité sont deux caractéristiques essentielles des aiguilles de ponction. Une attention particulière sera également réservée à la nature du matériel (métal, inox), au biseau (25 ° à 45°), à la longueur totale (40 à 60 cm) ainsi qu'aux diamètres interne (0.6 à 1,2 mm) et externe (0.8 à 1.6 mm) des aiguilles de ponction. Le diamètre interne (0.6 à 1.2 mm) ne semble pas influencer le taux de récupération des ovocytes. Cette réduction offre l'avantage de pouvoir ponctionner les follicules de petit diamètre (2 mm). La réduction du diamètre évite par ailleurs la contamination éventuelle des tubes de récolte par du sang mais

augmente le risque de lésion du cumulus oophorus des ovocytes lors de l'aspiration et par conséquent leur potentiel de fécondation futur. A l'inverse l'augmentation du diamètre externe entraîne plus de lésions de la paroi vaginale, de l'ovaire et des follicules mais contribue à augmenter le pourcentage de récupération des ovocytes. (HANZEN 2004)

C- Le rinçage de la cavité folliculaire:

Il est réalisé au moyen du PBS (phosphate buffered saline), chez la vache, ce PBS ne semble d'aucune importance, or que chez la jument, son effet favorable a été reconnu. Il nécessite cependant l'augmentation du diamètre de l'aiguille et contribue par ailleurs à allonger le temps nécessaire à la ponction. Réalisée sous trop forte pression, le rinçage de la cavité folliculaire peut en entraîner la rupture et la perte de l'ovocyte.

Certains systèmes sont équipés d'une tubulure de rinçage permanent de l'aiguille d'aspiration, cette adaptation évite l'obturation du canal de l'aiguille par de petits caillots de sang, phénomène plus fréquemment observé si l'ovaire est porteur d'un corps jaune fonctionnel.

Le dépôt par trempage d'un film de BSA (bovin sérum albumine) sur la face interne des aiguilles ainsi que des tubulures de connexion ne semble pas améliorer le taux de récupération des ovocytes. (HANZEN 2004)

D- Les tubulures de connexion :

Elles doivent être conçues de manière à éviter autant que possible les turbulences susceptibles de léser les ovocytes ou de réduire le pourcentage de récupération. Leur diamètre est habituellement supérieur au diamètre interne de l'aiguille de ponction et leur rigidité assure une résistance au vide d'aspiration appliquée par la pompe aspirante, Elles sont au préalable rincées au moyen du liquide de récolte (PBS).

E- La pression d'aspiration :

Elle constitue l'un des principaux facteurs influençant le taux de récupération des ovocytes.

Habituellement exprimée en mm de Hg, la pression d'aspiration réellement observée à l'extrémité de l'aiguille et comprise selon les auteurs entre 40 et 50 mm de Hg. Elle est néanmoins dépendante de différents facteurs tels que le diamètre et la longueur de l'aiguille ou le système de ponction utilisés. Cette pression d'aspiration est parfois exprimée en terme de ml d'eau aspirée en une minute par la pompe d'aspiration. Ainsi, une pression d'aspiration

Synthèse bibliographique

de 110mm Hg permet d'aspirer respectivement 37 et 46 ml d'eau par minute au moyen d'aiguilles de 19 et 18G. La pression d'aspiration doit être à la fois constante et non excessive. Les turbulences induites au niveau des points de jonction entre l'aiguille et le système tubulaires par des variations de la pression d'aspiration ou l'augmentation de la pression d'aspiration qui accélère la progression des ovocytes qui peut contribuer à la perte de cellules de la granuleuse. A l'inverse, une pression d'aspiration trop faible réduira le taux de récupération des ovocytes.

Une étude plus spécifique réalisée *in vitro* a démontré que l'augmentation de la pression d'aspiration de 25 à 100 mm Hg contribue à accroître le taux de récupération des ovocytes. Cependant le pourcentage d'ovocytes utilisable pour la fécondation *in vitro* est optimale pour des pressions comprises entre 25 et 50 mm Hg. Semblable observation a été fournie par d'autres auteurs. Indépendamment du diamètre de l'aiguille utilisée, une augmentation de la pression d'aspiration de 20 à 56 ml par minute augmente le nombre d'ovocytes dénudés et diminue celui de l'ovocyte compact. (HANZEN 2004)

F-Le milieu de récolte :

C'est un milieu tamponné au phosphore (PBS) pouvant contenir ou non du sérum fœtal ou des antibiotiques. L'addition de l'héparine (2 à 5 UI/ ml) contribue à limiter la coagulation dans les tubulures et les tubes de collecte. Cependant le contact prolongé (plus de 60 minutes) des ovocytes avec ce milieu est de nature en réduction du potentiel de développement. Il convient donc les placer dès que possible dans un tube non hépariné. (HANZEN 2004).

2-5-1-2-2-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 (1mg/100kgs) ou xylazine. 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 Kgs d'hyoscine -N-butylbromide.

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 para cervical au moyen d'un guide

métallique. L'ovaire manipulé par voie transrectale et 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 noir anéchogènes. Le déplacement de l'ovaire ou/ et de la sonde permet d'ajuster la position du follicule à ponctionné sur le trajet de l'aiguille de ponction identifiée par une ligne sur l'écran de l'échographe. L'aiguille est poussée vers l'avant de manières à traverser successivement la paroi vaginale puis celle du follicule. Une fois la pointe de l'aiguille identifiée aux abords de la cavité folliculaire, l'aspiration est déclenchée : elle se traduit par la disparition progressive de la zone anéchogènes folliculaire. Certains auteurs ont recommandé de cureter la cavité folliculaire en imprimant des mouvements circulaires à l'aiguille de ponction. 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 2004).

2-5-2-Qualité des ovocytes :

2-5-2-1 : chez l'animal

A- Critères de classification :

Plusieurs chercheurs ont mis en pratique divers critères de classification des ovocytes, on a à titre d'exemple celle décrite par Christian Hansen, 2004, Blondin.P, M.A.Sirard, 1995, Deloos et al., 1989 et chez l'Homme par S. Hamamah, et al., 1996.

A-1-La classification citée par Christian Hansen :

La sélection des ovocytes repose essentiellement sur des critères morphologiques ou ultra structurelles. Les ovocytes bovins immatures peuvent être répartis en quatre catégories selon le degré de la compacité des cellules de cumulus et de transparence de l'ooplasm. Il semble évident que les différences éventuellement identifiées lors de l'examen peuvent être attribuer à divers stades 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 :

- CLASSE 01 : le COC a un aspect transparent. Le cumulus (cellules de la granuleuse) est compact et entoure complètement l'ovocyte, l'ooplasm ovocytaire a un aspect homogène.
- CLASSE 02 : le COC est le même que dans la classe 01, mais l'ooplasm a un aspect plus irrégulier, une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie.
- CLASSE 03 : l'ensemble du COC est sombre, le cumulus est moins compact, l'ooplasm est plus irrégulier et présente des amas plus sombre.

- CLASSE 04 : le cumulus est complètement expansé voire absent (ovocyte nu)
- La présence de cumulus pendant au moins deux heures est plus essentiel 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 des cellules de la granuleuse au milieu de maturation des ovocytes. A l'inverse, les ovocytes nus sont beaucoup moins fertiles.

A-2-Classification utilisé par Blondin, M.A. Sirard :

Les caractéristiques morphologiques du cumulus et du cytoplasme constituent les critères de classification.

- CLASSE 01 : le COC est abondant et compact, un cytoplasme homogène.
- CLASSE 02 : le COC est abondant et compact, un cytoplasme présente quelques régions noires.
- CLASSE 03 : Possède aussi un cumulus abondant mais les dernières couches sont légèrement expansées et le cytoplasme est un peu granulaire.
- CLASSE 04 : Possède un cumulus en expansion et un cytoplasme très granulaire.
- CLASSE 05 et 06 : ont ou pas uniquement qu'une couche de cellules et leurs cytoplasme est variable.

Seuls les COC qui ont les caractéristiques des classes 01,02 et 03 sont habituellement sélectionnées pour être utiliser dans le système de production *in vitro* (PIV).

A-3-Classification utilisée par DELOOS et al :

Selon le nombre et la capacité des cellules du cumulus oophorus et l'hémogénéité de l'ooplasme on distingue quatre classes :

- CLASSE 01 : le COC compact avec plusieurs couches cellulaires (supérieur à trois couches), et un ooplasme homogène
- CLASSE 02 : le COC compact avec une à deux couches cellulaires et un ooplasme homogène, a une grosse apparence et une sombre zone pellucide.
- CLASSE 03 : Le COC légèrement compact avec un ooplasme irrégulier contenant des amas sombres.
- CLASSE 04 : Ovocytes nus ou un COC expansé, un ooplasme irrégulier.

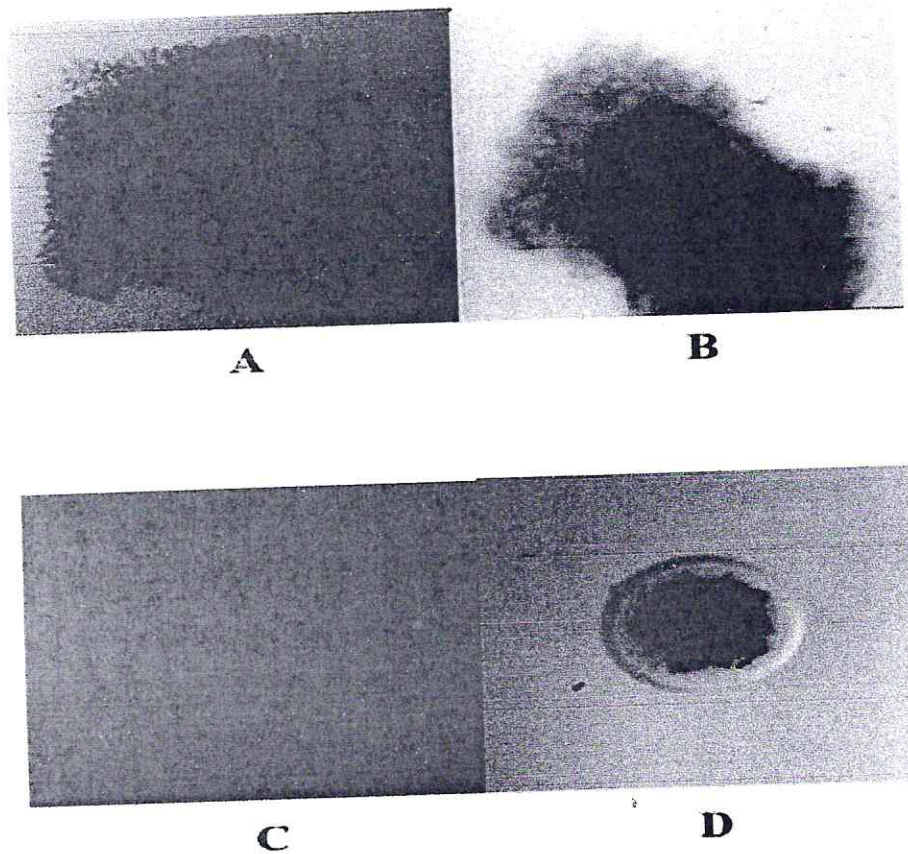


Figure n°6: Photos des quatre classes selon DeLoos., 1989.

Konishi (1996) a observé que plus de 60 % d'ovocytes collectés par une aspiration trans Vaginale des follicules sont classé en classe 01 à 04.

Smith et al (1996) ont observé significativement plus d'ovocytes classe 01 (63,7%, compact) celle de classe 03 (29,5 % particulièrement nus) et classe 04 (17,7 % nus).

Il été observé que 74, 3% d'ovocytes sont collectés à partir d'ovaires bovins d'abattoir dont 55.2% sont compacts, cellules de cumulus épaisses, 9,6% ont des couches de cumulus minces, et 7,5% sont nus (Shioya et al., 1988), ont observé que 50% d'ovocytes nus subirent une maturation et la moitié de celles-ci sont fécondées, bien que 20% d'ovocytes nus sont dégénérés après leurs examens microscopiques.

2-5-2-2- Chez l'homme :

A- Classification utilisée par S. Hamamah, et al :

La stimulation ovarienne permet d'augmenter le nombre de follicules recrutés et donc le nombre d'ovocytes récupérés, en revanche elle aboutit parfois à une cohorte ovocytaire très hétérogène. On peut observer :

- CLASSE 01 : un cumulus expansé, corona radiée, ovocyte régulier.
- CLASSE 02 : un cumulus expansé, corona compact, ovocyte irrégulier.
- CLASSE 03 : un cumulus danse, corona compact, ovocyte régulier.
- CLASSE 04 : un cumulus expansé, corona dispersée, ovocyte atypique.
- CLASSE 05 : un cumulus expansé, corona dispersée, zone pellucide fracturée.
- CLASSE 06 : un cumulus avec amas, corona compact, ovocyte régulier.

Ceci montre que l'appréciation des COC d'une manière précise est loin d'être parfaite.

La qualité ovocytaire se définit donc en théorie par son aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, à entraîner la formation du noyau paternel et maternel après fécondation et assurer un début de développement embryonnaire. En effet, la maturation de l'ovocyte repose essentiellement sur la maturation nucléaire, la maturation membranaire, et la maturation cytoplasmique.

2-5-3-L'intérêt de l'ovum pick up:

La technique de OPU- FIV présente trois intérêts principaux pour la sélection à raison de deux sessions d'OPU par semaine et d'environ 1,5 embryons transférables par session, le nombre de veaux peut être obtenus par unité de temps est pratiquement multiplié par 4 par rapport au nombre de veaux produits après super ovulation et la collecte classique.

Il devient donc possible d'augmenter encore la pression de sélection sur les mères à taureaux. Le deuxième intérêt est d'améliorer l'efficacité de la sélection même en raisonnant à niveau constant de prolificité. En effet, l'OPU-FIV permet de réaliser des accouplements *in vitro* et donc de mieux planifier le choix des reproducteurs mâles à la limite ovocyte par vache. On peut en particulier augmenter considérablement le nombre de mâles accouplés à une même femelle, nombre qui n'est pas très élevé en super ovulation classique. Ceci a pour effet d'améliorer la précision des indexes de sélection et surtout de diminuer la parenté moyenne entre les produits de génération suivantes. De ce fait, le taux consanguinité à long terme est diminué et avec lui le risque de voir apparaître une fixation fortuite de gènes à effets défavorables (Hanzen., 2004).

Wooliams (1989) montre déjà avec la super ovulation classique, qu'on a tout intérêt à changer de taureau à chaque collecte. Un troisième intérêt de l'OPU- FIV est la possibilité d'obtenir des descendants des femelles qui ne répondent pas à la super ovulation. On ne dispose toutefois pas encore de données suffisantes sur les performances de telles femelles pour la production d'embryons *in vitro*. L'accumulation de tous les effets positifs de l'OPU-FIV pour la sélection, Leitch et al 1995 trouvent que le rythme de progrès génétique annuel avec un schéma OPU – FIV est supérieur de 10 à 30% à celui d'un schéma avec super ovulation et fécondation *in vivo*, les donneuses ayant le même âge dans les deux cas.

L'OPU-FIV permet aussi de diminuer l'âge des donneuses par rapport à la production d'embryon *in vivo* car il est possible d'effectuer des ponctions répétées d'ovocyte dès l'âge de 9 mois. Ceci pourrait être considéré comme un programme de sélection. Mais même en admettant que de tels ovocytes aient des probabilités de fécondation non diminués, ce qui fait encore l'objet de données contradictoires, l'effet d'un tel raccourcissement de l'intervalle de génération serait nul sur le progrès génétique annuel. En effet les descendants naîtraient beaucoup trop tôt par rapport aux connaissances des performances de la donneuse, et celle-ci serait donc insuffisamment sélectionnée relativement à une faible précision d'évaluation.

L'OPU –FIV est incontestablement une technique dont peuvent bénéficier les schémas d'amélioration génétique des reproducteurs. Il est important maintenant de définir les conditions de mise en œuvre pour son développement, notamment en ce qui concerne les normes techniques et sanitaires à respecter lors des sessions de ponction. Il reste aussi de confirmer qu'une organisation efficace d'un atelier de production d'embryons *in vitro* permet bien de ramener le coût de veau à celui qu'on obtient aujourd'hui en transplantation embryonnaire classique. Mais pour cela il faudra bien améliorer les méthodes de congélation de ces embryons, dont les taux de survie après décongélation sont aujourd'hui encore largement inférieurs à ceux d'embryon produits *in vivo*. (Hanzen ., 2004).

2-5-4- Facteurs d'influences:

2-5-4-1-L'animal donneur:

Le développement des ovocytes semble dépendre du stade auquel ils ont été obtenus. Ainsi le pourcentage de blastocyste est significativement plus élevé après fécondation d'ovocytes obtenus entre les jours 14 et 16 du cycle ou d'autre terme 24% qu'entre les jours 13% ou 19 et 20 (7%). Leur développement est également plus rapide s'ils proviennent de follicules ponctionnés entre les jours 14 et 16.

Selon certains auteurs, la qualité des ovocytes prélevés chez des animaux gestants serait supérieure à celle des ovocytes obtenus sur des animaux non gestants, la raison pourrait en être trouvée dans la présence d'une population folliculaire différente (Hanzen 2004). Guérin avoue en 1996 le contraire, ce qui veut dire que la qualité d'ovocytes n'a aucune relation avec l'état de gestation.

La présence d'un corps jaune sur l'ovaire ponctionné pourrait avoir ou serait sans aucune influence sur la maturation des ovocytes obtenus, en ce qui concerne la période du cycle oestral Hanzen en 2004 et Guerin 1996 trouve que cette dernière n'a pas d'importance relative à la maturation de ces ovocytes. Ainsi le taux de développement des ovocytes diminuât-il selon qu'ils proviennent d'ovaires porteurs d'un corps jaune cyclique, d'ovaires provenant d'animaux cyclés mais non porteurs de corps jaune, de génisses pré pubères ou d'animaux gestant. Comparant des génisses et des vaches en lactation, tarées ou gestantes Hanzen en 2004 et Bungartz en 1995 n'observent aucune différence significative du pourcentage d'embryons obtenus (11,9 à 22,7%).

L'état corporel insuffisant, (inférieur à 3) réduit les chances de maturation des ovocytes, de même une augmentation du score corporel s'accompagne-t-elle de celle du nombre d'ovocytes normaux et celui de petits follicules.

L'effet de la race a été peut être étudié, les races européenne ont cependant de plus gros follicules que les zébus ou que les animaux issus de croisement. La race Holstein donne d'avantage de COC par ovaire que les zébus mais leur taux de clivage est inférieur.

L'effet potentiel de l'âge a également été envisagé, le nombre de follicule et la qualité des COC obtenus seraient similaires entre des vaches âgées de 3 à 8 ans ou de 9 à 17 ans. Par contre il est bien démontré que le nombre de blastocystes et le pourcentage de gestation après le transfert d'ovocytes prélevés sur des veaux est bien moindre que celui obtenu sur des animaux adultes.

L'absence de repense à des traitements de super ovulation ne laisse présumer en rien un échec éventuel lors de la ponction de l'animal, en effet, récemment il a été prouvé que le taux de blastocystes transférables obtenu après ponction de 200 donneuses d'embryons n'ayant plus répondues depuis au moins un an à des traitements de super ovulation, été comparable à celui obtenu chez des animaux normalement cyclés. Semblable conclusion a été apporté après application de la technique à des animaux infertiles (Hanzen, . 2004).

2-5-4-1-1-L'ovaire et le follicule :

La capacité de l'ovocyte à accomplir sa maturation nucléaire et cytoplasmique s'accomplit au cours du développement folliculaire. Il est donc essentiel de pouvoir juger la

qualité des follicules dont proviennent les ovocytes, cette qualité est le plus souvent évaluée sur la base des critères morphologiques, qu'ils soient de nature anatomique (diamètre, aspect macroscopique...) histologique ou sur la base de critères dépendant étroitement des conditions de prélèvement (*in vivo* ou *in vitro*) des ovocytes.

Physiologiquement trois types de follicules peuvent être distingués, les follicules non atrétiques qui se caractérisent par l'absence de signes de dégénérescence, une absence de figure mitotiques dans le cumulus oophorus, une membrane basale continue, et la présence d'un ovocyte normalement développé. Au microscope, ces follicules apparaissent uniformément brillants, transparents, bien vascularisés et possédant une couche de cellules granuleuses uniformes sans que des particules flottantes ne puissent être identifier dans le liquide folliculaire. Des signes de dégénérescence et une réduction du nombre de mitoses sont visibles dans les follicules dit légèrement atrétiques. En ce qui concerne les follicules atrétiques, le nombre de cellules dégénérées augmente, la membrane basale est désorganisée et des macrophages apparaissent dans la cavité folliculaire. (Hanzen, . 2004).

En moyenne on estime que 50 à 85% des follicules présents sur l'ovaire sont plus ou moins atrétiques. Ce pourcentage dépend de leur taille. L'atrésie concerne d'avantage les follicules de grands que de petit diamètre (Lussier .,1987).

Tableau n° 4 : Distribution du nombre de follicules et de leur pourcentage d'atrésie selon leur diamètre d'après Lussier., 1987).

Diamètre (mm)	Nombre d'ovaires	% D'atrétiques
3.68 -8.57	5	67.4
0.13 - 0.28	120	1.6
0.29 -0.67	60	6.6
0.68 -1.52	30	40.5
1.53-3.67	25	30.0

2-5-4-1-2-Aspects morphologiques :

Comparant la transparence des follicules de diamètre supérieur à 5 mm, Grim et Ireland, obtiennent d'avantage des ovocytes matures à partir de follicules transparents que de follicules présentant un certain degré d'opacité.

IL semble bien démontré que la qualité des ovocytes dépend essentiellement de la taille des follicules dont ils sont issus. Les ovocytes provenant de diamètre supérieur à 5 mm produisent d'avantage d'embryons que ceux provenant de follicules dont le diamètre est compris entre deux et six mm voire même le diamètre inférieur à 2 mm. L'étude de la qualité des ovocytes provenant des follicules de diamètre supérieur à 8 mm, Stubbing constate que les ovocytes matures proviennent le plus souvent de follicules dont le volume est d'au moins 0.3 ml (10 mm de diamètre moyen). La cause peut en être expliquée dans le fait qu'*in vivo*, la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte s'étale sur plusieurs jours, temps nécessaire à la croissance du follicule d'une taille comprise entre 2 et 6mm et une taille pré ovulatoire (10 à 20 mm). *In vitro* ces événements s'étalent sur moins de 24 heures. L'influence des divers facteurs hormonaux intra folliculaires (hormones stéroïdiennes, hormone de croissance...) s'en trouve donc modifiées.

Classiquement, les ovocytes de bonne qualité proviennent des follicules non-atrétiques ou de follicules en voies d'atrésie. L'explication en serait que la paroi des follicules non atrétiques sécréterait une substance inhibitrice de la maturation cytoplasmique. Cette inhibition étant en tout ou partiellement levée dans les follicules en voies d'atrésie, le cytoplasme de ces ovocytes apparaît plus granuleux et les cellules du cumulus présentent un début d'expansion.

Il est vraisemblable que la mise à point de milieux de maturation plus adaptés au stade du développement folliculaire sera à l'avenir de nature à augmenter le nombre d'ovocytes capables d'être matures *in vitro*. De même, il faudra poursuivre l'étude des facteurs et milieux adaptés au développement des follicules de manière à optimiser le potentiel ovocytaire ovarien.

En pratique, dans le cadre de l'OPU, la possibilité de déterminer par échographie le diamètre du follicule voire l'identification d'un aspect transparent ou au contraire semi opaque représente un atout majeur dans l'évaluation indirecte de la qualité de l'ovocyte.

2-5-4-1-3-Aspects hormonaux :

La croissance de l'ovocyte dominant a été associée à l'augmentation des concentrations en oestradiol 17 bêtas et en progestérone, ce rapport étant augmenté dans les follicules dominants et diminués dans les follicules dominés. Par ailleurs on sait que la concentration en oestradiol diminue dans tous les follicules en voie de dégénérescence quelque soit leur taille. Les follicules non atrétiques de taille inférieure à 8 mm sont sous influence androgénique tan dis que ceux de taille supérieure à 11mm sont sous l'influence

oestrogénique. Il est important de signaler que la dégénérescence s'accompagne d'une progressive diminution des concentrations folliculaires en oestradiol et en androgènes et en une augmentation en progestérone. Cette observation se trouve confirmée par le fait que d'avantage de blastocystes sont obtenus à partir d'ovocytes provenant de follicules dont le taux de progestérone était faible. En pratique, cette détermination des concentrations hormonales n'est que ponctuellement possible et ne peut être envisagée comme critère de sélections des follicules à ponctionnés. (Hanzen, . 2004).

2-6-La maturation de l'ovocyte de mammifères *in vitro* :

2-6-1-Introduction :

L'ovocyte est à bien une cellule très spéciale. Sa maturation constitue l'étape finale d'une longue évolution dont le but est 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 sa naissance jusqu'au jour incertain précédant son ovulation (ce qui peut représenter un délais de plusieurs dizaines d'années), le noyau de l'ovocyte reste bloqué au stade de vésicule germinale (en prophase méiotique), grâce à une inhibition intra folliculaire .il reprend sa méiose que si ayant accompli avec succès sa croissance au sein du follicule destinée 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*.

2-6-2-Techniques de mise en culture :

2-6-2-1-La culture *in vitro* :

Diverses techniques ont été proposées .Une première possibilité est de réaliser cette maturation ovocytaire en plaçant les follicules disséqués dans un milieu de culture, c'est une méthode réservée aux follicules de petit diamètre (1 à 2 mm). L'autre possibilité est celle qui se base sur le transfert d'ovocyte sur des follicules pré ovulatoires, c'est une technique totalement réussie dans l'espèce équine.

Habituellement, les ovocytes sont placés en maturation par groupe de 10 à 20 dans des micros puits renfermant de 50 à 100 micros litre de milieu, relativement à la température assurant une maturation ovocytaire comme celle d'une optimale pénétration des spermatozoïdes est de 39°C .

La maturation des ovocytes *in vitro* est soumise à l'influence de plusieurs facteurs dont la plupart font appel à une éventuelle précision. En effet, alors qu'en moyenne de 60 à 85% des ovocytes matures *in vitro* sont fécondés et entament leurs divisions et seulement 25 à 30% atteignent le stade blastocyste. L'un des facteurs le plus important ayant une influence directe sur la réussite de la culture ou la maturation ovocytaire est la technique de maturation proprement dite ou en particulier la composition du milieu de culture utilisé. En effet un décalage de 20,5 % a été décrit par Hanzen en 2004 existe entre nombre de d'ovocytes atteignant le stade de blastocyste après maturation *in vivo* et celui qui est précédé par une maturation *in vitro*.

2-6-2-1-1-Les milieux de culture :

2-6-1-1-1- : Historique des milieux de culture :

Les milieux de culture pour les embryons ont beaucoup évolués depuis l'époque où les liquides biologiques en constituaient la base : extraits d'embryons ou de poulets, plasma, blanc et jaune d'oeuf. Dès les années cinquante, des solutions de sels furent adoptées pour la culture des embryons (Biggers, 1987 ; 1993). La saline physiologique (Hammond Jr. 1949) ou le "Krebs- Ringer-bicarbonate" tamponné (Whitten, 1957) remplacèrent avantageusement les liquides biologiques. Des blastocystes de souris se développèrent *in vitro* grâce à ces milieux et donnèrent naissance après transfert à des rejetons viables (McLaren et Biggers, 1958).

La plupart des milieux de culture cellulaire sont aptes à assurer une éventuelle maturation ovocytaire et une réaction acroamatique des spermatozoïdes, il en est des milieux simple et des milieux complexes, les plus couramment employés sont :

a- Milieu de base :

Tous les milieux de culture classique (MEM, TCM 199, TALP, Waymouth, Ham-F12, SOF, B2 ...) ont été utilisé pour la maturation mais peut d'études les ont systématiquement comparés. Le milieu généralement le plus utilisé en maturation *in vitro* des ovocytes est le TCM 199, un milieu tamponné au bicarbonate, contenant des sels minéraux, des sources de carbone et d'énergie (glucose, glutamine) ainsi que des acides aminés et vitamines. La présence d'acides aminés parait indispensable à la qualité de la maturation, ceci étant particulièrement vrai pour les acides aminés soufrés (cystine, cystéine) interviennent dans le métabolisme de glutathion et la glutamique qui est l'une des principale source

Synthèse bibliographique

d'énergie de l'ovocyte (c'est grâce au pyruvate et le glucose qu'il peut capter et faire dans le métabolisme).

A ce milieu de base sont souvent ajoutées des molécules de haut poids moléculaire dont l'effet surfactant empêche l'adhésion des complexes cumulus ovocytes entre eux et au support de culture. L'albumine sérique bovine (BSA) est souvent utilisée à cet effet, ainsi que des liquides biologiques complexes (sérum bovin fœtal, sérum de femelle en oestrus, liquide folliculaire) cependant l'utilisation de ces aditifs d'origine animal pose des problèmes d'ordre sanitaire et nuit à la productibilité des expériences. De plus, la complexité de ces suppléments interdit l'analyse du besoin réel de l'ovocyte. De bons résultats ont pu être obtenus en substituant à ces protéines animales des hauts polymères synthétiques présentant les mêmes propriétés tensioactives, tels que le polyvinyle alcool. Les conditions physiques utilisées pour la maturation sont généralement celle de la température centrale de l'espèce (39°C, pour les mammifères domestiques ; 37°C pour les primates et les petits rongeurs), sous une atmosphère d'air contenant 5% de CO₂ saturée en humidité, pour une durée de 24 heures (ruminants et souris) à 44 heures (Humain et porc). (Pascal Mermillod, . 2001).

b- Les Hormones :

La plupart des hormones démontrent la nécessité d'une complémentation hormonale ; l'effet des hormones gonadotropes (FSH et LH) sur la qualité de la maturation *in vitro* reste controversé, malgré de nombreuses études (Bever MM, . 1997). Les divergences des résultats sont relatives sans doute à la présence ou non de sérum ou de fluide folliculaire pouvant masquer ou amplifier leur action. Toutefois, la FSH potentialise l'action de facteurs de croissance, comme l'IGF et le PDGF et stimule l'expression des récepteurs de la LH par les cellules du cumulus et de la LH à une action directe sur le métabolisme ovocytaire, augmentant ainsi la glycolyse et la phosphorylation oxydative, elle exerce leurs actions via les cellules de cumulus.

Le niveau élevé des oestrogènes dans le follicule pré ovulatoire permet l'augmentation dans l'ovocyte de l'ADN polymérase B, réparatrice (Murdoch Wj, Van Kirk EA, .2001). L'oestradiol augmente la capacité du développement des ovocytes humains après une maturation *in vitro*, sans affecter la maturation nucléaire, cet effet repose sur une action non génomique, en favorisant l'influx de calcium au niveau de la membrane ovocytaire et permettant l'initiation d'oscillation calcique cytoplasmique (Tesarik J, Mandoza C, . 1997). La GH accélère la maturation nucléaire, stimule l'expansion du cumulus et améliore le taux de développement au stade de blastocyste, ceci en absence de sérum et d'hormone

gonadotropes (Izadyar F., 1998), la GH aurait donc un effet sur la maturation nucléaire et également sur la maturation cytoplasmique (taux de développement), ce dernier effet résulterait d'une accélération de la migration des granules corticaux. Cette action de la GH est également transmise par le cumulus.

c- Les facteurs de croissances :

Un ensemble de faits indique un rôle de l'EGF (Epidermal Growth Factor) dans la régulation de la maturation ovocytaire :

- Présence d'EGF et de son récepteur dans les follicules de plusieurs espèces (vache, truie et femme)
- L'action de l'EGF sur la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte bovin a été clairement mise en évidence.
- Comme la FSH, l'EGF stimule l'expansion des cellules du cumulus. Cependant, la présence des cellules n'est pas indispensable à l'action de l'EGF puisqu'il est capable de stimuler la maturation nucléaire d'ovocytes decoronisés (Lonergan P et al., 1996).
- L'EGF exerce aussi une action sur le métabolisme ovocytaire et sur l'expression de certains récepteurs, comme le récepteur LH, par l'ovocyte.

L'activité A stimule la maturation cytoplasmique des ovocytes bovins, ce qui se traduit par une augmentation du taux de blastocystes obtenus après fécondation *in vitro* (Silva CC et al., 1998) les cellules du cumulus et l'ovocyte lui-même portent le récepteur de l'activine mais son action semble dirigée directement vers l'ovocyte car elle stimule la capacité de développement de l'ovocyte dénudé.

2-7-Méthode de la fécondation *in vitro* :

a- la sélection des spermatozoïdes :

La première étape consiste après une décongélation d'une pipette (1 minute à 35°C), à séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et du milieu de congélation en les lavant à 2 ou 3 reprises par centrifugation dans un tampon ou à l'aide d'un milieu de culture.

Etant donné la présence du glycérol, il est pratiquement impossible d'évaluer pratiquement la viabilité des spermatozoïdes au moyen d'une coloration vitale après leur décongélation, le lavage dans l'espèce bovine est remplacé par la sélection des spermatozoïdes mobiles par centrifugation sur un gradient de percoll (milieu PBS concentré 10 fois et percoll) ou souvent par swim-up (nage ascendante).

Dans le premier cas les spermatozoïdes sont déposés sur une double solution de concentrations différentes de percoll puis centrifugés pendant 15 minutes à 500 G ce qui permet au spermatozoïdes de se retrouver au fond du tube et les morts à l'interface des deux solutions. Dans le second cas, on dépose un milieu tampon (TALP calcium free tyrode/ albumen / sodium lactate/ sodium pyruvate) ou de culture sur un culot de spermatozoïdes et après incubation (1 heure à 39°C), on récupère la phase supérieure renfermant les spermatozoïdes, ceux mort demeurant dans le fond. Le culot des spermatozoïdes vivants est remis en suspension dans du milieu pour le débarrasser complètement de son milieu de congélation, en suite la récupération du culot de spermatozoïdes est réalisée par centrifugation dont la concentration est par la suite déterminée et ajustée de manière qu'elle avoisine les deux millions de spermatozoïdes par ml. Ainsi préparés et conservés à 25°C le sperme peut être utilisé au bout de 4 à 8 heures) ; une hotte à influx lumineux est strictement imposé lors toutes ces manipulations. (Hanzen.,2004).

b- induction de la capacitation :

Bien que diverses méthodes aient été employées pour induire artificiellement la capacitation, il semble bien que la méthode utilisant l'héparine soit la plus appropriée pour le sperme bovin (milieu tampon ou de culture renfermant 10 à 20 mcg/ ml d'héparine).Le sperme y est ajouté de manière à avoir ne concentration de deux millions de spermatozoides par ml.

Le recours à l'héparine ne semble pas pouvoir être appliqué dans les espèces ovines, caprines et porcines. Dans l'espèce équine, le recours à un agent ionomorphe (A23187) est pratiquement indispensable. (Hansen., 2004).

c- Induction et entretien de la mobilité :

Une première sélection des spermatozoïdes mobiles a déjà été opérée par le swim-up. Diverses substances sont connues pour leur utilité dans l'augmentation de la mobilité des spermatozoïdes. La caféine comme la théophylline agissent en inhibant la phosphodiesterase, ce qui contribue à l'augmentation de l'AMPc intra cellulaire. L'addition d'un mélange penicillamine, hypo taurine et epinephrine (PHE) et connue également pour augmenter la mobilité de sperme et la pénétration de l'ovocyte. (Hanzen., 2004).

d-la fécondation proprement dite :

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 cent mille spermatozoïdes (2 millions par ml) du milieu. L'augmentation de la durée d'incubation est peut-être considérée comme l'un des principaux facteurs responsables de polyspermie pour cela on nous recommande que l'incubation dure 18 heures à 39 °C dont l'atmosphère d'air doit renfermer 5% de CO₂ et saturée en humidité dans le but d'éviter l'évaporation du milieu.

Diverses méthodes de préparation d'ovocytes maturés *in vitro* ont été proposées pour augmenter les chances de leur pénétration par les spermatozoïdes. Les cellules restantes du cumulus peuvent être enlevées mécaniquement par vortexage ou chimiquement par l'addition d'enzymes telles que l'hyaluronidase ou d'agents chimiques comme le citrate de sodium (3% pendant 5 minutes). Il semble bien que les méthodes ne doivent être utilisées que dans les cas de manipulation plus spécialisée des gamètes (transfert de noyau, micro-injection de spermatozoïdes) (Hanzen 2004).

Diverses techniques de fécondation assistée ont été proposées dès la fin des années 80, il s'agit d'assister les spermatozoïdes à pénétrer la zone pellucide et donc de faciliter la fécondation.

Trois cibles ont été visées par la fécondation assistée.

- 1- au niveau de la zone pellucide (zona drilling ou ZD ou PZD) en faisant une ouverture avant d'incuber les ovocytes avec les spermatozoïdes.
- 2- Au niveau de l'espace périvitellin on injecte directement une dizaine de spermatozoïdes sous la zone pellucide (SUZI).
- 3- En injectant directement un seul spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte (ICSI ; intra cytoplasmique sperme injection). (S. Hamamah et al., 1999).

2-8-Les critères de fécondation :

-L'apparition de deux globules polaires ou des deux pronoyaux constituent les critères les plus souvent employés pour confirmer la fécondation. Cependant, dans l'espèce bovine est à la différence de l'espèce murine et humaine, ces pronucléus ne sont habituellement visibles que s'ils ont au préalable été traités par centrifugation ou par coloration (fuschine). La raison doit en être trouvée dans le fait que l'ovocyte renferme davantage des vésicules lipidiques.

-L'identification des spermatozoïdes accessoires fixés à la membrane pellucide constitue un autre paramètre d'évaluation. Leur nombre est directement proportionnel aux chances de fécondation et de développement embryonnaire.

-Le taux de clivage constitue une autre méthode d'évaluation, *in vivo*, le stade 4 cellules est habituellement atteint après 42h. *In vitro*, il exprime le nombre de blastomères identifiés à 48 ou 72h. Ce nombre est à son tour est proportionnel à la possibilité pour l'embryon d'atteindre le stade de blastocyste. Ainsi la présence de 4 blastomères 48h après la fécondation se produit par 13% de développement jusqu'au stade blastocyste, si ce nombre est supérieur à 4, le pourcentage est de 40%. Dans notre laboratoire nous évaluant le nombre de blastomères à 72h. Selon les auteurs et donc les protocoles au demeurant pléthorique, les taux de fécondation sont compris entre 30 et 85% tandis que les pourcentage de blastocystes obtenus sont compris entre 7 et 50%, 50% d'entre eux donnant lieu à une gestation. Il est intéressant de noter que comme après une fécondation *in vivo*, 60% des embryons obtenus sont des mâles (Hanzen, 2004).

2-9-La culture *in vitro* des embryons :

La culture des embryons est un outil privilégié pour étudier la physiologie et le métabolisme des embryons ainsi que leurs interactions avec les cellules de l'oviducte ou de l'utérus. Lors des TE les embryons sont souvent conservés un certain temps *in vitro* afin de déterminer leur sexe ou d'atteindre la synchronie avec la receveuse. Les embryons congelés sont souvent décongelés puis cultivés avant d'être transférés aux receveuses afin d'évaluer les dommages subis lors de la congélation et de la décongélation. Les nouvelles biotechnologies embryonnaires (transfert de gènes, clonage, division des embryons, MIV/FIV ...) impliquent toutes, une période plus ou moins longue de culture des embryons.

Les embryons cultivés ont un développement sub-optimal ou retardé, un métabolisme altéré et une viabilité après transfert plus faible que les embryons frais (Bavister, 1987; Renard et al., 1980). Cette situation proviendrait de l'incapacité des conditions et des milieux de culture de supporter un développement et un métabolisme embryonnaire normal *in vitro* (Bavister, 1987; Fukui et al., 1991; Biggers. 1993). Lors de la MIV/FIV, le nombre d'embryons bovins atteignant le stade de blastocyste en expansion ou en éclosion est faible (Hernandez-Ledezma et al., 1996). En effet, le taux de production d'embryons bovins par MIV/FIV n'est que de 35 à 40% dans majorité la des laboratoires (Gordon et Lu, 1990; Brackett et Zuelke, 1993). Les embryons produits par FIV sont plus petits, ont une moins grande résistance aux stress osmotiques, un taux d'implantation plus élevée et une mortalité foetale plus importante que les embryons produits par superovulation (Farin, 1995, Guocheng et al., 1997). Cette

Synthèse bibliographique

situation pourrait aussi provenir de l'inaptitude des milieux de culture (Bavister, 1987 ; Fukui et al., 1991 ; Biggers, 1993). L'amélioration des milieux et des conditions de culture, en permettant un métabolisme et une croissance embryonnaire optimal *in vitro*, pourrait accroître le taux de gestation des embryons cultivés après transfert.

Dans le chapitre qui suit, une description brève des conditions utilisées de la culture, ainsi que des éléments composant les milieux de culture pour les embryons est faite. Les principaux problèmes rencontrés lors de la culture des embryons sont discutés par la suite. Différentes stratégies pour améliorer les milieux de culture sont ensuite discutées: supplémentation avec des sécrétions utérines bovines, coculture

2-9-1-Les conditions de culture des embryons :**2-9-1-1-L'atmosphère gazeuse :**

Deux mélanges gazeux sont habituellement utilisés pour la culture des embryons *in vitro*. L'un est riche en O₂ : 5% de dioxyde de carbone (CO₂) dans 95% d'air (ceci représente une concentration réelle d'environ 20% d'O₂ ; l'autre est faible en O₂ : 5% CO₂, 5% O₂ et 90% azote (N₂). Une atmosphère riche en O₂ est défavorable au développement embryonnaire (Auerbach et Brinster, 1968 ; Tervit et al., 1972 ; Kaye, 1986) parce qu'elle favoriserait la production de radicaux libres par les embryons (Rieger, 1992). Au contraire, une faible pression partielle d'O₂ favorise le développement des embryons (Auerbach et Brinster, 1968, Tervit et al., 1972) et se rapprocherait plus des conditions physiologiques rencontrées dans l'oviducte ou l'utérus (Tervit et 1972). Par contre, Wright et al., (1976) en utilisant la culture sous huile ont été incapables de confirmer l'effet bénéfique pour les embryons bovins d'une atmosphère plus faible en O₂.

De nombreuses études ont impliqué les radicaux libres dans le "*bloc in vitro*" observé chez les embryons murins (Iannaccone, 1986 ; Loutradis et al., 1987 ; Nars-Esfahani et al., 1990). Les radicaux libres sont formés lors des processus oxydatifs impliquant l'oxygène (métabolisme aérobie). Ces fragments de molécules ou d'atomes, instables et réactifs, causeraient des dommages cellulaires importants aux embryons par peroxydation des lipides membranaires, inactivation des enzymes ou par des lésions créées à l'ADN embryonnaire (Sohal et Allen, 1990). Les radicaux libres pourraient aussi être impliqués dans le "*bloc in vitro*" observé chez les embryons bovins (Rieger, 1992).

situation pourrait aussi provenir de l'inaptitude des milieux de culture (Bavister, 1987 ; Fukui et al., 1991 ; Biggers, 1993). L'amélioration des milieux et des conditions de culture, en permettant un métabolisme et une croissance embryonnaire optimal *in vitro*, pourrait accroître le taux de gestation des embryons cultivés après transfert.

Dans le chapitre qui suit, une description brève des conditions utilisées de la culture, ainsi que des éléments composant les milieux de culture pour les embryons est faite. Les principaux problèmes rencontrés lors de la culture des embryons sont discutés par la suite. Différentes stratégies pour améliorer les milieux de culture sont ensuite discutées: supplémentation avec des sécrétions utérines bovines, coculture ...

2-9-1-Les conditions de culture des embryons :

2-9-1-1-L'atmosphère gazeuse :

Deux mélanges gazeux sont habituellement utilisés pour la culture des embryons *in vitro*. L'un est riche en O₂ : 5% de dioxyde de carbone (CO₂) dans 95% d'air (ceci représente une concentration réelle d'environ 20% d'O₂ ; l'autre est faible en O₂ : 5% CO₂, 5% O₂ et 90% azote (N₂). Une atmosphère riche en O₂ est défavorable au développement embryonnaire (Auerbach et Brinster, 1968 ; Tervit et al., 1972 ; Kaye, 1986) parce qu'elle favoriserait la production de radicaux libres par les embryons (Rieger, 1992). Au contraire, une faible pression partielle d'O₂ favorise le développement des embryons (Auerbach et Brinster, 1968, Tervit et al., 1972) et se rapprocherait plus des conditions physiologiques rencontrées dans l'oviducte ou l'utérus (Tervit et 1972). Par contre, Wright et al., (1976) en utilisant la culture sous huile ont été incapables de confirmer l'effet bénéfique pour les embryons bovins d'une atmosphère plus faible en O₂.

De nombreuses études ont impliqué les radicaux libres dans le "*bloc in vitro*" observé chez les embryons murins (Iannaccone, 1986 ; Loutradis et al., 1987 ; Nars-Esfahani et al., 1990). Les radicaux libres sont formés lors des processus oxydatifs impliquant l'oxygène (métabolisme aérobie). Ces fragments de molécules ou d'atomes, instables et réactifs, causeraient des dommages cellulaires importants aux embryons par peroxydation des lipides membranaires, inactivation des enzymes ou par des lésions créées à l'ADN embryonnaire (Sohal et Allen, 1990). Les radicaux libres pourraient aussi être impliqués dans le "*bloc in vitro*" observé chez les embryons bovins (Rieger, 1992).

Synthèse bibliographique

La formation de radicaux libres par les embryons peut être prévenue en cultivant les embryons en présence d'une atmosphère pauvre en O₂ (5 %) dans un milieu supplémenté avec de la SOD et ayant une faible teneur en glucose (Rieger, 1992). C'est pourquoi dans les travaux récents utilisant le milieu SOF pour la culture des embryons bovins, les chercheurs préfèrent utiliser une atmosphère pauvre de 5% d'O₂ (Eckert et Nieman, 1995 ; Fujitani et al., 1996).

2-9-1-2-La culture sous huile :

En 1963, la micro-goutte fut adaptée pour la culture des embryons de souris (Brinster, 1953). Dans cette technique, les embryons sont cultivés dans une goutte de milieu de culture placée sous une mince couche d'huile minérale. Cette technique présente de nombreux avantages. Elle atténue les variations de température, de pression osmotique et de pH en retardant les échanges gazeux et l'évaporation. Elle protège les micro-gouttes de la contamination bactérienne. De plus, elle facilite les manipulations puisqu'elle permet de voir et de manipuler aisément les embryons ou d'échantillonner les milieux de culture pour analyse (Gwatkin, 1963). L'huile de paraffine et de silicone sont les huiles les plus souvent utilisées. La qualité des huiles doit être irréprochable puisque certains produits toxiques peuvent les contaminer et les rendre embryotoxiques. Les huiles doivent toujours être stérilisées avant utilisation. Récemment, on a démontré que les huiles peuvent altérer la composition du milieu de culture en absorbant ou en y transférant certains composés. Ceci pourrait être bénéfique si des composés potentiellement toxiques sont retirés du milieu mais pourrait être nuisible si des éléments nécessaires à la croissance des embryons sont ainsi perdus (Miller et Pursel, 1987).

2-9-1-3-L'humidité et température :

Les embryons de bovins se développent mieux *in vitro* à une température 39°C et sous une atmosphère riche en humidité (Bousquet et al., 1992 ; Eckert et Niemann, 1995 ; Keskinetepe et al., 1995). Un haut taux d'humidité préviendrait l'évaporation des milieux de culture et les stress osmotiques en résultant.

PARTIE
EXPERIMENTALE

1-Introduction :

La production d'embryons bovins *in vitro* se résume en quatre principales étapes à savoir ; la récolte d'ovocytes à partir d'ovaires de vaches abattues ou bien d'ovaires de vaches vivantes à l'aide d'une ponction trans-vaginale , leurs maturation , la capacitation des spermatozoïdes, et en fin la fameuse fécondation *in vitro* .

Au cours de notre travail nous avons essayé de perfectionner la technique de récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir et de réaliser ainsi leurs classification, en suite nous avons tenté d'étudier et de comprendre l'influence de certains paramètres tels que l'âge des animaux, leurs races et leurs état d'embonpoint sur la qualité d'ovocytes récoltés suite à une ponction folliculaire.

2- Matériel et organes utilisés :

2-1- Le matériel :

Un matériel modeste est largement suffisant pour la réalisation de ce travail

- Ciseaux ; utilisées pour la récupération des ovaires à partir de leurs matrices.
- Sachets de congélation ;
- Boite isotherme contenant de l'eau tiède ; utile pour le maintien de la stabilité de la température dans la boite qui doit être comprise entre 25°C et 30°C (Boldin et M.A.Sirard) et aussi pour le transport des ovaires collectés au laboratoire de l'université.
- Un thermomètre électronique qui nous renseigne sur la température à l'intérieur de la boite.
- Aiguilles (G : 18) ; utilisés pour la ponction des follicules.
- Seringue ; utiles pour l'aspiration du liquide folliculaire.
- Solution physiologique de (Na Cl 0,9) qui favorise l'observation sous microscope.
- Micropipette ;
- Boîtes de pétries quadrillées ; utilisées pour la récupération du liquide folliculaire.
- Microscope inversé.
- Appareil photo numérique.
- règle.

legende

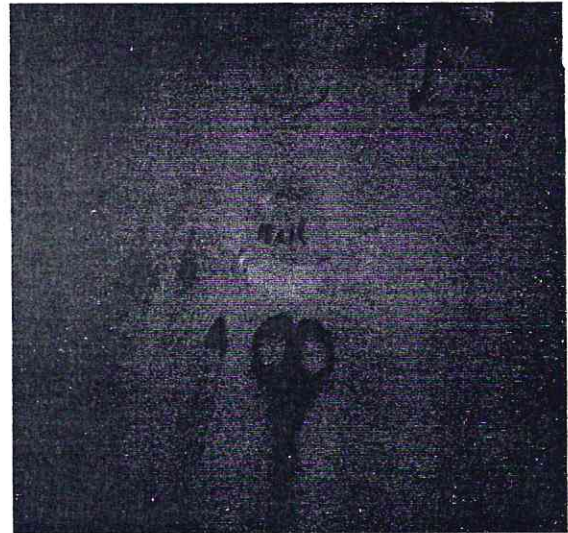
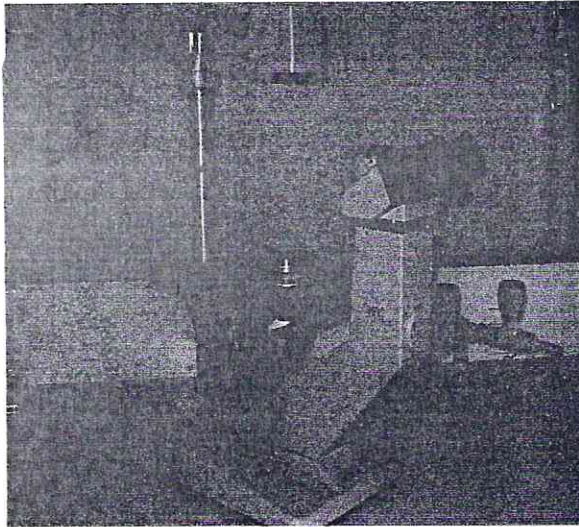


Photo n°1: Le matériel utilisé pour la récolte et la classification des ovocytes

2-2- les organes :

Les organes utilisés dans notre travail sont bien évidemment les ovaires prélevés au niveau des abattoirs à savoir l'abattoir de Blida, El-Harrach ~~ou~~ Ruisseau, et sont transportés au laboratoire de l'université.



legende

Photo n°2 : Ovaires récoltés au niveau de l'abattoir de Blida

2-3- méthode de travail :

Notre travail est pratiquement réparti en deux temps : la collecte des ovaires au niveau des abattoirs ainsi que l'identification de l'âge, de la race ainsi que l'état corporel des animaux concernés, la récolte des ovocytes et leurs classification au niveau du laboratoire.

A- la collecte des ovaires :

La collecte des ovaires se précède par la préparation de la glacière et le matériel nécessaire, la glacière doit contenir de l'eau tiède que l'on mis dans les sachets de congélation et cela dans le but de préserver la température comprise entre 25°C et 30°C la vérification de la température à l'intérieur de la boîte isotherme ou de la glacière doit être régulière.

Avant l'abattage on réalise un examen ante - mortem des vaches dont les ovaires seront collectés et cela se résume à l'identification de l'âge de l'animal, son état d'embonpoint, sa race et son état physiologique à l'aide de l'exploration rectale. Après l'abattage on accède à la récupération des matrices et c'est à ce moment que l'état physiologique de la vache se confirme et aussi l'éclaircissement sur la question de la présence ou pas de corps jaune comme cela nous renseigne de manière claire et précise sur l'état des ovaires.

Il est à souligner que le prélèvement des ovaires se fait le plus rapidement possible (dans les deux heures suivants l'abattage des vaches) ce prélèvement se fait à l'aide de ciseaux et sont en suite met séparément dans les sachets de congélations en fonctions de la vache propriétaire et aussi de la situation de l'ovaire (ovaire gauche ou droit). Le tous est arrangé dans la boîte isotherme et ensuite transféré vers le laboratoire.

B- la récolte et la classification des ovocytes :

La récolte ovocytaire par ponction folliculaire se fait obligatoirement dans les quatre (4) heures suivants la récupération des ovaires.

Il est préférable que la ponction et l'aspiration s'intéressent d'abord aux follicules de grandes tailles puis ceux de petites tailles ; cela nous permet d'éviter un éventuel endommagement des follicules de grandes tailles et qui nous fournissent le plus de chances et le plus de facilités relatives à la récoltes d'ovocytes, ces ponctions se font à l'aide de seringues qui doivent être rincer à base d'une solution de Na Cl après chaque ponction

ovarienne. Il est à signalé que la récupération complète du liquide folliculaire est conditionnée par une application d'une pression d'aspiration. En fin le liquide récupéré est met dans des boites de pétries et orienté à l'observation microscopique dont l'objectif est le contage et la classification ovocytaires.

Comme c'est déjà cité, la prochaine et dernière étape s'intéresse au contage et à la classification d'ovocytes. C'est à la classification établie par C. Hanzen qu'on a eu recoure au cour de notre travail pour la classification de nos fameux ovocytes.

Les meilleurs ovocytes sont isolés dans des boites de pétris contenant chacune une goutte de Na Cl permettant le lavage et l'élimination des débris cellulaires pour qu'ils soient clairement pris en photos.



Photo n° 3 : La ponction folliculaire

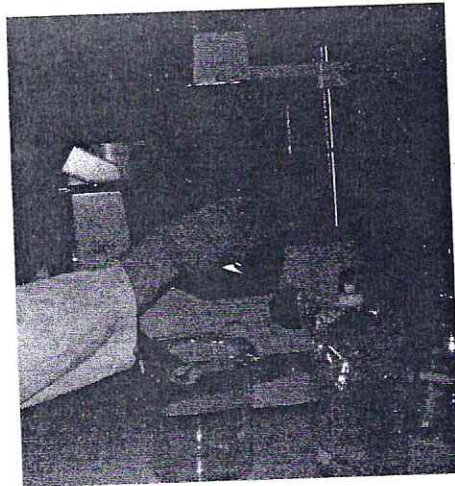


Photo n°4 : Le comptage et la classification des ovocytes

comptage

On note que ce travail a été réalisé par des étudiants de l'année précédente en prenant en considération l'influence de l'état physiologique et la présence ou pas de corps jaune, sur la qualité d'ovocytes récoltés à partir d'ovaires d'abattoir; leur travail apporte des différences significatives entre les taux d'ovocytes de bonne qualité issus de vaches gestantes et non gestantes, de même pour les ovocytes dont le corps jaune est présent ou pas sur l'ovaire dont ils sont récoltés.

3- Résultats :

Les résultats obtenus au cours de notre travail son illustrés dans les tableaux suivants :

Tableau N° 5 : illustration des résultats obtenus au cours de notre travail

Récolte	Nombre D'ovaires	Nombre et taux de follicules		Nombre D'ovocytes récoltés	Taux D'ovocytes récoltés
		< 6 mm n (%)	> 6mm n (%)		
1	12	105 (90,50)	11 (9,48)	87	75
2	10	98 (90,74)	10 (9,25)	74	68,51
3	4	42 (89,36)	05 (10,63)	36	76,59
4	4	43 (86)	07 (14)	33	66
5	6	78 (95,12)	04 (4,87)	45	54,87
6	8	78 (95,12)	04 (4,87)	69	84,14
7	8	88 (94,62)	05 (5,37)	79	84,94
8	10	74 (92,50)	06 (7,50)	64	80
9	4	58 (95,08)	03 (4,91)	26	42,62
Total	66	664 (92,35)	55 (7,64)	513	71,34
		719			

T. Agnès

Partie expérimentale

Le tableau ci-dessus illustre les résultats obtenus au cours des neuf récoltes réalisées, dans les 66 ovaires prélevés, 513 ovocytes ont été récupérés suite à une ponction de 719 follicules, ce qui constitue un taux de récupération de 71,34, avec une moyenne de récupération de 7,77 ovocytes par ovaire.

Le taux de follicules ponctionnés supérieurs à 6 mm sont largement inférieurs à ceux de taille inférieur à 6mm et sont représentés respectivement par les taux suivants : 7,64 et 92,35.

Tableau N°7 : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de la race des animaux abattus :

Nombre de vaches	Classe Race	Nombre et taux d'ovocytes récupérés Selon les classes				Total
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	
06	Montbéliarde	12 (16,43)	22 (30,13)	23 (31,50)	16 (21,91)	73
		(46,56)		(53,41)		
15	Holstein	43 (14,42)	53 (17,78)	112 (37,58)	90 (30,20)	298
		(32,2)		(67,78)		
08	Locale	15 (14,56)	33 (32,03)	18 (17,47)	37 (35,92)	103
		(46,59)		(53,39)		
04	Autres	4 (10,25)	12 (30,76)	17 (43,58)	6 (15,38)	39
		(41,01)		(58,96)		

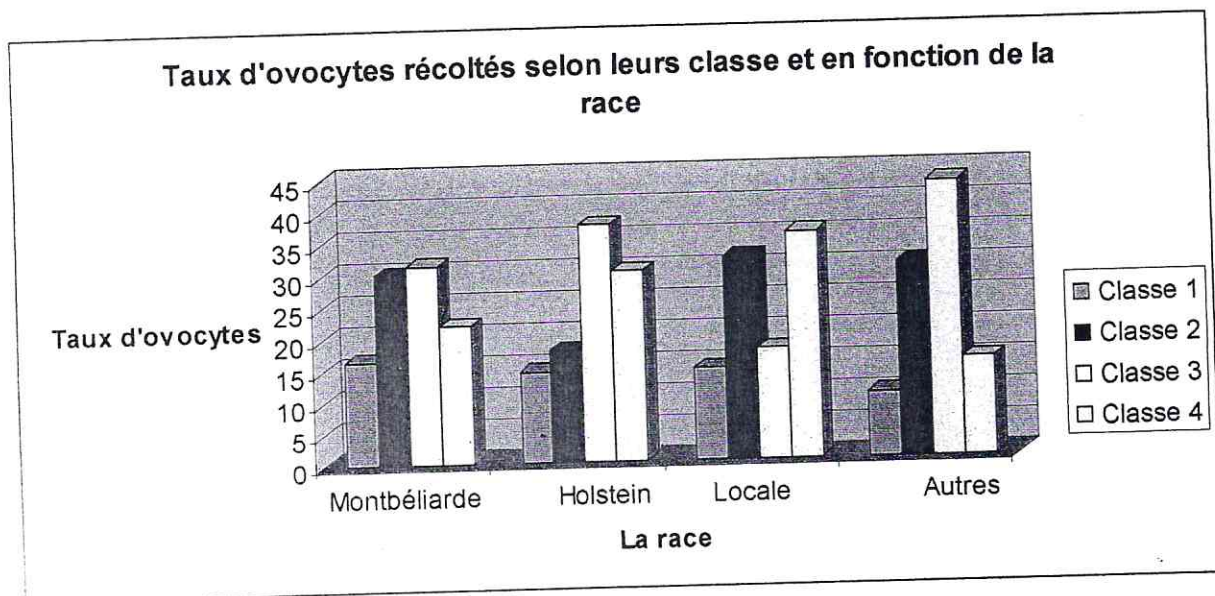


Figure n°7 : Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de la race des animaux abattus :

Chez la race montbéliarde on a récupéré un taux d'ovocytes de bonne qualité qui est égal à 46,56 contre 53,41 de ceux de mauvaise qualité. En ce qui concerne la race Holstein le taux de récupération est de 32,2 relativement au ovocytes classés en bonne qualité et de 67,78 pour les ovocytes de mauvaise qualité.

A propos de la race locale et les autres races croisées les taux de récupération sont de 46,59 et de 41,01 respectivement pour les ovocytes classés en bonne catégorie, en ce qui est relatif aux ovocytes de mauvaise qualité les taux de récupération sont de 58,96 et de 58,96 respectivement.

Il est à noter que la différence est significative si on compare les taux des différentes classes d'ovocytes récupérés chez les différentes races.

Tableau n°8 : 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	
8	12 à 18 mois	12 (9,23)	39 (30)	46 (35,38)	33 (25,38)	130
		(39,23)		(60,76)		
9	36 mois	23 (16,54)	28 (20,14)	66 (47,48)	22 (15,82)	139
		(36,68)		(63,30)		
11	54 mois	52 (32,91)	72 (45,56)	22 (13,92)	12 (7,59)	158
		(78,47)		(21,51)		
2	72 mois	03 (6,38)	20 (42,55)	13 (27,65)	11 (23,40)	47
		(48,93)		(51,05)		
3	96 mois	12 (30,76)	07 (17,94)	12 (30,76)	08 (20,51)	39
		(48,7)		(51,27)		

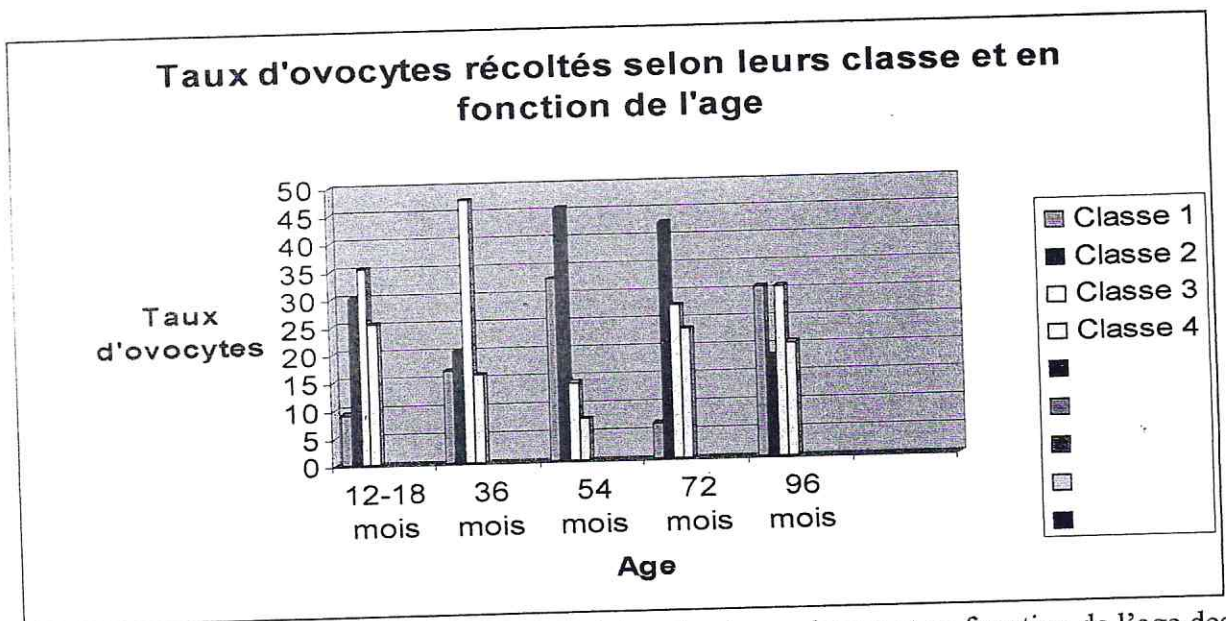


Figure n° 8: Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'âge des animaux abattus.

Par rapport à l'âge des animaux, on remarque que le taux des ovocytes classés en qualité bonne est représenté par les animaux âgés de 54 mois avec un taux de récupération de 78,47 et donc le taux le plus bas pour les ovocytes de mauvaise qualité et qui est représenté par un taux de 21,51, juste après viennent les vaches âgées de 72 et 96 mois avec un taux de récupération de bons ovocytes qui est de 48,93 et 48,70 respectivement contre 51,05 et 51,27 pour les mauvais ovocytes.

En ce qui est en rapport avec les vaches âgées de 12 à 18 mois et celle dont l'âge est de 36 mois le taux d'ovocytes de bonne qualité est représenté par un taux de 39,23 relativement aux vaches âgées de 12 à 18 mois, et de 36,68 pour les vaches de 36 mois d'âge, les ovocytes de mauvaises qualités sont représentés par un taux de 60,76 et de 63,30. Il est à signaler que la différence est significative si on compare les taux de différentes classes d'ovocytes récoltés de vaches à différentes catégories d'âge.

Tableau n°9 : Le nombre d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'état d'embonpoint des animaux abattus

Nombre de vaches	Classe Etat corporel	Nombre et taux d'ovocytes récupérés Selon les classes				Total
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	
06	1	00 (00)	04 (4,34)	35 (38,04)	53 (57,60)	92
		4,34		95,64		
09	2	38 (22,35)	34 (20)	56 (32,94)	42 (24,70)	170
		42,35		57,64		
14	3,5	44 (22,79)	69 (35,75)	57 (29,53)	23 (11,91)	193
		58,54		41,44		
4	4	14 (24,13)	23 (39,65)	08 (13,79)	13 (22,41)	58
		63,78		36,20		

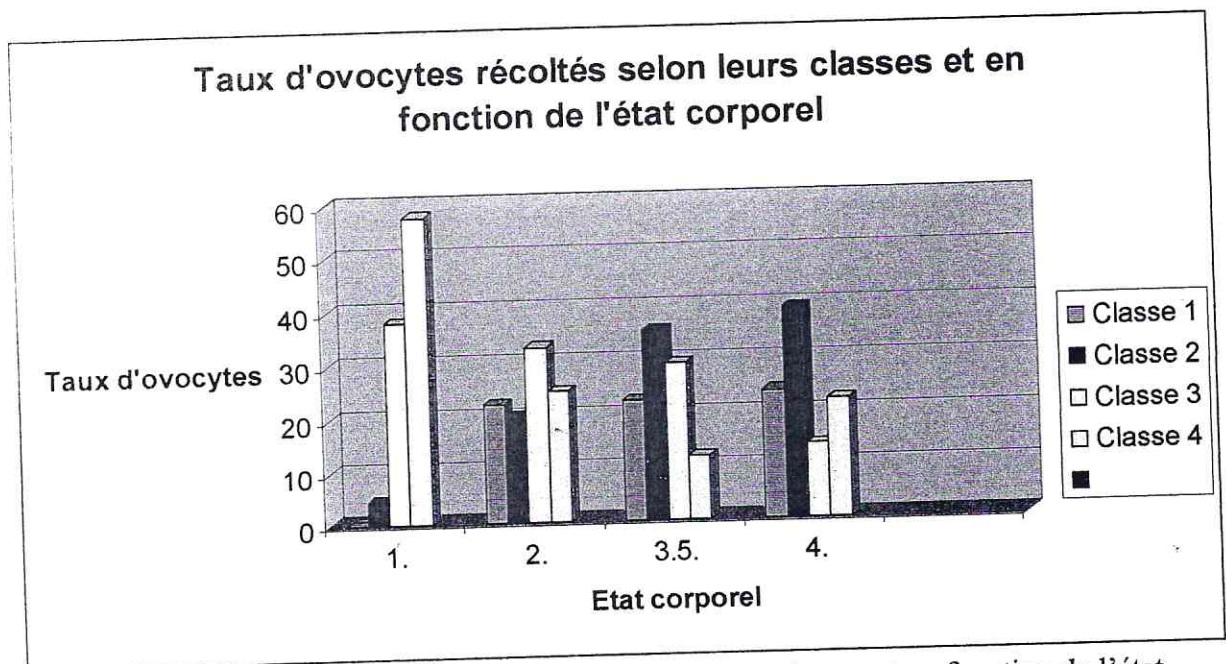


Figure n° 9: Le taux d'ovocytes récoltés selon leurs classes et en fonction de l'état d'embonpoint des animaux abattus

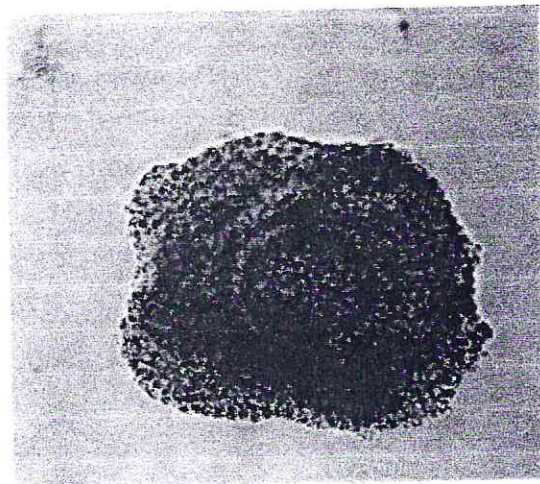
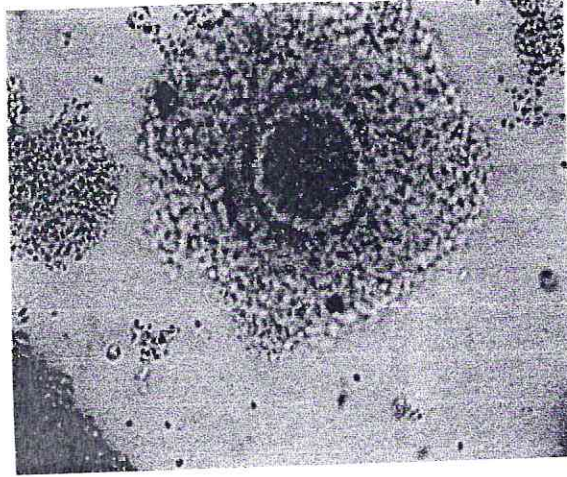
Il est signalé que l'état corporel noté de 4 et de 3,5 est le meilleur fournisseur d'ovocytes de bonne qualité avec un taux de 63,78 et 58,54 respectivement. Après viennent les vaches dont l'état corporel est de 2 pour assister à un taux de récupération de 42,35. en fin on note que l'état corporel de 1 est le mauvais fournisseur d'ovocytes de bonne qualité avec un taux de 4,34.

En ce qui concerne les ovocytes de mauvaises qualité le taux le plus bas est représenté par les vaches dont l'état corporel est de 1 avec 95,64 contrairement aux taux rencontrés chez les vaches qui présentes un état d'embonpoint de 2, 3,5 et 4 avec des taux de récupération de 57,64 41,44 et 36, 20 respectivement.

On note que la différence est significative si on compare les taux de différentes classes d'ovocytes récoltés chez des vaches dont l'état d'embonpoint est variable.

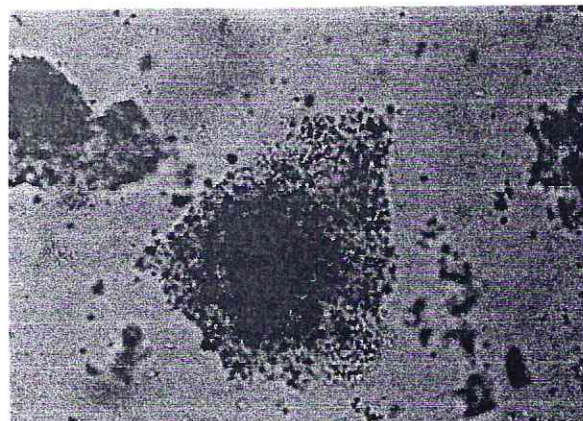
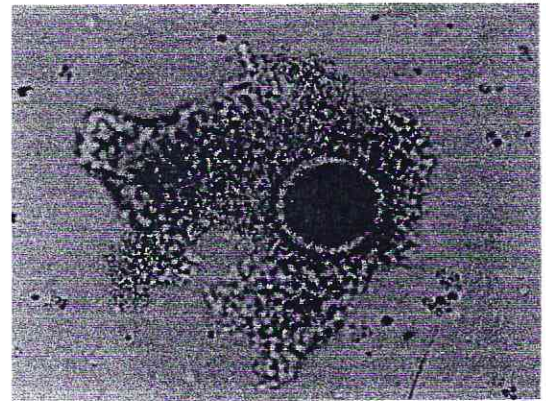
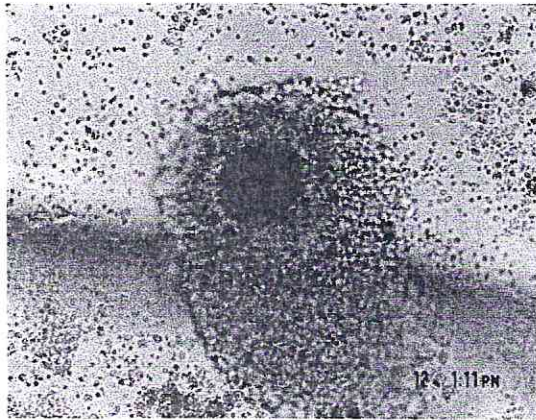
4-Classification des ovocytes :

Photo n°05 : Les ovocytes de classe 1 :



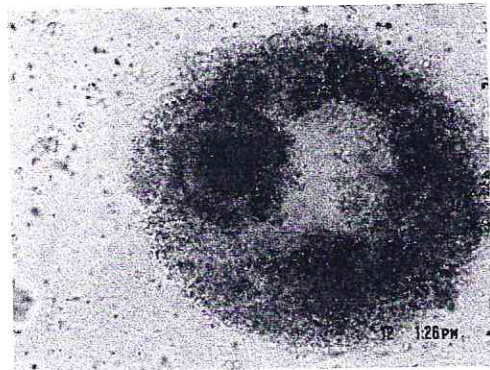
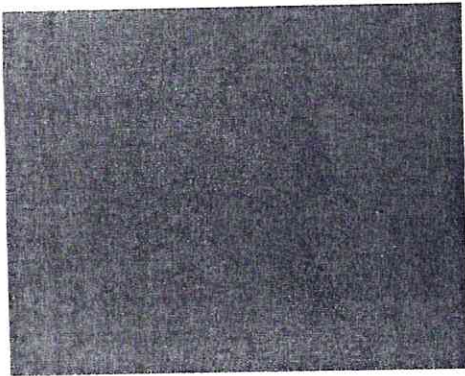
Le cumulus oophorus est compact, transparent et entoure complètement l'ovocyte l'aspect de l'ooplasm est homogène.

Photo n° 06 : Les ovocytes de classes 2 :



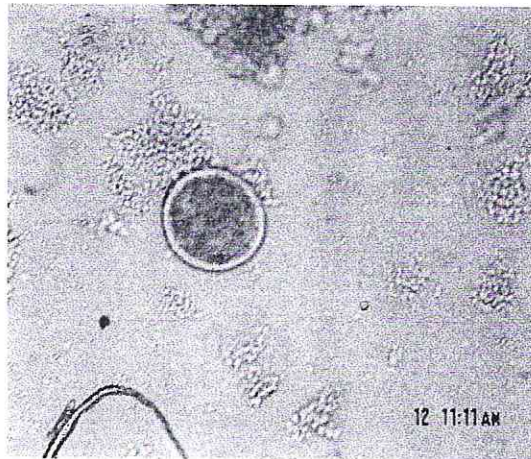
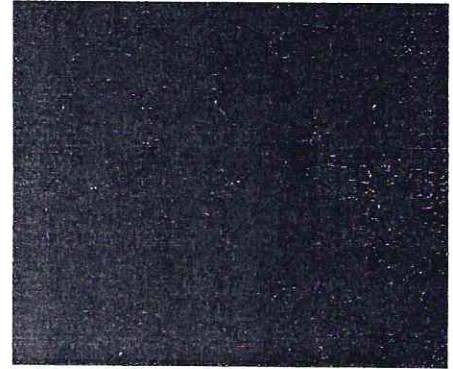
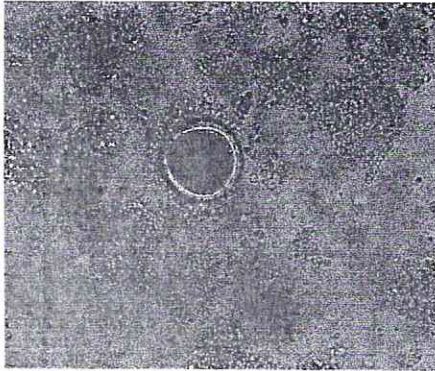
Le cumulus oophorus est transparent compact et entoure complètement l'ovocyte, l'aspect de l'ooplasm est irrégulier avec une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie

Photo n°07 : Les ovocytes de classe 3 :



Le cumulus oophorus sombre et moins compact plus irrégulier et présente des amas plus sombres.

Photo n°08 : Les ovocytes de classe 4 :



Le Cumulus est complètement expansé voir absent (oocyte nu)

6-CONCLUSION :

Le travail réalisé avait pratiquement trois objectifs, le premier est bien la maîtrise de la technique de la collecte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir, effectivement il nous a permis de récolter un nombre encourageant d'ovocytes car pour la deuxième fois cette technique fondamentale de la fécondation in vitro est initiée en Algérie utilisant des moyens modestes pour la récolte un taux de récupération estimé 71,34, avec une moyenne de récolte de 7,77 ovocytes par ovaire.

Le deuxième est le point le plus important de notre travail qui est l'étude de l'influence d'état de vache sur la qualité d'ovocytes récoltés à partir d'ovaires d'abattoir et cela en étudiant les paramètres suivants : d'âge, race, état corporel et ainsi comparer les taux d'ovocytes de bonne qualité et ceux de mauvaise qualité en fonction des paramètres déjà cités.

La difficulté de notre travail réside dans la non disponibilité d'un nombre suffisant de vaches destinées à l'abattage au niveau de l'abattoir de Blida, et aussi la non disponibilité du laboratoire la nuit pour pouvoir récupérer des matrices de l'abattoir d'El Harache, où l'abattage se fait l'après-midi.

En fin, nous dirons que ce modeste travail doit être une clé pour initier des travaux sur la fécondation in vitro en Algérie et cela en s'adressant aux bonnes sources d'ovocyte et aussi maîtriser leur technique de récolte et aussi celle de leur classification.

7- Recommandations :

La non disponibilité d'un matériel plus pratique comme la pompe aspirante permettant d'aspirer un volume plus au moins important de liquide folliculaire est l'une des causes qui nous ont fait perdre un taux d'ovocytes plus important, qui va nous permettre de mieux étudier et de mieux comprendre la relation entre les paramètres déjà dits et la bonne qualité des ovocytes collectés relativement à ça nous recommandons un matériel plus au moins adéquat.

L'étude répétée dans le temps et dans l'espace de ces paramètres et pour quoi pas d'autres finira par des conclusions bien claires en ce qui concerne les paramètres jouant un rôle dans la détermination de la qualité des ovocytes dont les bons seront utiles à la fécondation *in vitro*.

Il est aussi recommandé d'utiliser d'autres techniques de récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir telles que la dissection des ovaires, la découpe de l'ovaire en tranches, et la digestion de l'ovaire au moyen de la trypsine qui permettent d'obtenir un nombre plus important d'ovocytes par ovaires

En fin, puisque le but de la récolte des ovocytes et la fécondation *in vitro*, il serait très intéressant de penser à la maîtrise des différentes étapes de la fécondation *in vitro* comme la mise en culture des ovocytes.

- 1- Adams, G. P. Control of ovarian follicular waves dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* (1994) 41: 19-24.
- 2- Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C., Ginther, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *JReprod Fertil* (1992) 94: 177-188.
- 3- Adams, G. P., Kot, K., Smith, C. A., Ginther, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Sciences* (1993) 73: 267-275.
- 4- Aucrbach. S., Brinster, R.L., Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos, *Nature* (1968) 217, 465-466.
- 5- Ashworth, C.J., Bazer, F.W., Changes in ovine concepts and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone, *biol Reprod.*, (1989) 40. 425-433.
- 6- Ashworth, CL, Synchrony embryo-uterus, In: Symposium 8, Relation ship beetwen uterin environment and embryonic development: pratical consequences, *An. Reprod. Sci.* (1992) 28.259-267.
- 7- Albihn, A., Gustafsson, H., Rodnguez-Martinez, H., Maternal influence on early development of asynchronously transferred bovine embryos, *Anim. Reprod. SCL.* (1991)24, 25-35.
- 8- Byskov, A. Gonadal sex and germ cell differentiation. In: Austin, C., Edwards, R. (eds.), *Mechanisms of sex differentiation in animals and man.* New York: Academic Press; 1981: 145-164.
- 9- Bachvarova, R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. In: Browder, W. (ed.) *Developmental biology a comprehensive synthesis.* New York: Plenum Press; 1985: 453-525.
- 10- Billing, H., Markström, E., Svensson, E., Shao, R., Friberg, A. Follicular development and apoptosis. In: Eppig, J., Hegele-Hartung, C., Lessl, M. (eds.), *The future of the oocyte.* Berlin: Springer; 2002: 23-41.
- 11- Babiuk L. A., philips J.P., 1989. *Animal biotechnology, comprehensive biotechnology.* 1st supplement pergamon press, oxford, 260 p.
- 12- Bavister. B.D., Preface. In: *The mammalian preimplantation embryo: regulation and difièrentiation in vitro.* Bavister, B.D., ed., Plenum Press, of growth p. 1987. New York.
- 13- Biggers, J.D., introductory remarks on the milieux of the egg and the early emhryo, *J. Reprod.Fertil.*(1988)82,809-811.

- 14- Biggers, I.D., The culture of the mammalian preimplantation embryo, In *Implantation in Mammals*. Serono Symposia Publications, Vol.91. Gianaroli, L., Campana, A., Trounson, A.O. (eds.), Raven Press, New York, 123- 136, 1993.
- 15- Biggers, K.G., Geisen, R.D., Wetteman, R.P., Buchanan, D.S., Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow, *J. Anim. Sci.*, (1987) 63. 5 12-1518.
- 16- Brinster, R.L., A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst, *Exp. Cell. Res.* (1963) 32. 205-205.
- 17- Bungartz, L, Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. (1995) collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonotrapim pre-treatment and in different reproductive states *theriogenology* 43, 667 - 675.
- 18- Bevers M.M, Dielman, S.j, Van Den Hurk. R. et al.. (regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine.) *Theriogenology*. 1997. 47. 13 -22.
- 19- Bousquet. D., Rémillard. R., Sauvé. R., Gra.sso, F., Plante. L.. Gestations après transferts de blastocystes bovins issus d'embryons au stade de 8, B 16 blastomères placés en culture et congelés. *Méd Vét, Québec*, (1992) 21 155-157.
- 20- Blondin.P. M.A.Sirard. oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol reprod Dev*, 1995. 41(1): p- 54-62.
- 21- Bitteridge, K.J., Flckhon, JF., the anatomy and physiology of preattachment bovine embryos. *Theriogenology*. (1988) 29. 155-1 87.
- 22- Benos, D.J., Biggers, J.D.. Blastocyst fluid formation, In: *Fertilization and embryonic development in vitro*, Mastroianni, L., Biggers, J., eds.. Plenum Press. New York. pp. 283-297. 1981.
- 23- Betteridge, K.J., Eaglesome. M.D., Randall, G.C.B., Mitchell.D., Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus, *J. Reprod. Fert.* (1980) 59: 205-216.
- 24- Betteridge, K.J., embryo transfer in farm animals. A review of techniques and applications. Monograph 16. Agriculture Canada. Ottawa (1 977).
- 25- Brackett, B., Zuelke, k., analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos, *Theriogenology*, (1990) 33 77-87.
- 26- Chicoine, A. The identification, origin and migration of primordial germ cells in mouse embryo. *Anat. Rec.* (1954) 135-146.
- 27- Camargo, L. S., Viana, J. H., Sa, W. F., Ferreira, A. M., Vale Filho, V. R. Developmental competence of oocytes from prepubertal bos indicus crossbred cattle. *Anim Reprod Sci* (2005) 85: 53-59.

- 28-Crozet N, Ahmed-Ali M and Dubos MP (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod Fert.* Vol 103. pp 293-298.
- 29-Chang ., 1959 in *biotechnologie*. 5^{em} édition de René Scriban coordinateur.
- 30- Colleau J.J., Heyman Y., Renard J.P., 1998. les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *Prod. Anim. INRA.*
- 31-Dong, J., Albertini, D., Nishimori, K., Kumar, T., Lu, N., Matzuk, M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* (1996) 383: 531-535.
- 32-Dieleman, S. J., Bevers, M. M. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. *Mol Reprod Dev* (1993) 36: 271-273.
- 33-Déziel, C. Anatomie et physiologie du système reproducteur. *Gurde bovins laitiers CPAQ.*
- 34-Driancourt, M. A., Gougeon, A., Monniaux, D., Royère, D., Thibault, C. Folliculogénèse et ovulation. In: Thibault, C., Levasseur, M-C. (eds.). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: INRA editions; 2001 :65-84.
- 35-Dauzier et Wintenberger in Thibault C., Levasseur M.C., Hunter R.H.F., 1993. *Reproduction in mammals and man*. Ellipses, Paris, 800 p.
- 36-Deloos et al.. 1989. oocyte recovery, 57-89.
- 37-Eddy, 1984; Origin of the germ line. In: Van Blerkom, J., Motta, P. (eds.), *Ultrastructure of reproduction: Gametogenesis, fertilization and embryogenesis*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers; 1984: 1-11.
- 38-Erickson, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* (1966) 25: 800-805.
- 39-Earl, C. R., Fry, R. C., Maclellan, L. J., Kelly, L. M., Armstrong, D. T. In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes. In *Gametes: Development and function (congres)* (1998) 115-117.
- 40-Evans, A. C., Adams, G. P., Rawlings, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fert* (1994) 100: 187-194.
- 41- Edwards, R. G. (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208, 349-351.

- 42-Eckert J., Niemann, H.. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media, *Theriogenology*. (1995) 43: 1211-1225.
- 43-Fair, T., Hyttel, P., and Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42, 437-442.
- 44-Feuillet AQ073 (1996) 1-7.
- 45-Fujitani, Y., Kasai, K., Ohtani, S., Nishimura, K., Marsunaga, H., Yanada, M., Utsumi, K.. Effects of oxygen tension, free-radicals and hypotaurine on development of in vitro-derived bovine embryos, *Theriogenolog*. (1996) 45, 2 10 (abstract).
- 46-Fortune, J. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Anim Reprod Sci* (1993) 33: 111-125.
- 47-Farine, P.W., Farine, G.E., transfer of bovine embryos produced in vivo and in vitro: Survival and foetal development, *boil reprod.*, (1995) 52, 676-682.
- 48-Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A., Tervit H.R., Factors affecting the in vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro, *J. Reprod fertil*, (1991) 92, 125-131.
- 49- Ginsburg, M., Snow, M. H., McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* (1990) 110: 521-528.
- 50-Gosden, R. G. Germline stem cells in the postnatal ovary: Is the ovary more like a testis? *Hum Reprod Update* (2004) 10: 193-195.
- 51-Greenfeld, C., Flaws, J. A. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bioessays* (2004) 26: 829-832.
- 52- Ginther, O., Knopf, L., Kastelic, J. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* (1989) 87: 223-230.
- 53- Gong, J. G., Bramley, T. A., Gutierrez, C. G., Peters, A. R., Webb, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of fsh and lh, and ovarian function in heifers. *J Reprod Fertil* (1995) 105: 263-270.
- 54- Gong, J. G., Campbell, B. K., Bramley, T. A., Gutierrez, C. G., Peters, A. R., Webb, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* (1996) 55: 68-74.

- 55- Ginther, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* (2000) 60-61: 61-79.
- 56- Gougeon, A. Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Human Reproduction* (1986) 1: 81-87.
- 57- Guérin, P., Guyader-Joly, C., Meemillod, B., et Leguienne, B. (1996). *Point vétérinaire*. vol. 28 numéro spécial « Reproduction des ruminants » p 14-17.
- 58- Gwatkin, R.B.L.. Effect of virusts on early mammalian development, 1. Action of Mengo encephalitis virus on mouse ova cultivated in vitro. *Proc. Nati. Acad. Sci .USA.* (1963) 50. 576-581.
- 59- Gordon, I., Lu, K., Production of embryos in vitro and it's impact on livestock production ,*Theriogenologie*,(1990) 33,77-87.
- 60- Guocheng, J., Yanxiang, S., Zhonghua, Y., Tochanis, C., Kitiyanant, Y., The differences of osmotic behaviors of bovine embryos pavasutbipaisit, from in vitro and in vivo and their quality evaluation, *theriogenology*, (1997) 47,(abstract).
- 61- Hernandez-Ledezma , J.J., Villanueva, C., Sikes J.D., Kubish, H.M., Increasing the rate of blastocyste foration from in vitro produced bovine zygotes ,*Triogenology*,(1990) 33, 77-87.
- 62- Hirshfield, A. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* (1991)124: 43-101.
- 63- Hsueh, A. J., Billig, H., Tsafiri, A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* (1994) 15: 707-724.
- 64- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* (1997) 47: 33-42.
- 65 - Hamamah, S., et Meneso, (1996). *Ovocyte et embryon de la physiologie à la pathologie*. Edition marketing S. A. 32 rue Bague, Paris.
- 66- Hammond, J. Jr., Recovery and culture of tubal mouse ova, *Nature (London)*, (1949)163. 28-29.
- 67- Hanzen, C., 2004. Thèse : la production d'embryons in vitro. 2eme doctoorat.
- 68- Heap. R.B., Davis, Al., Fieet, I.R., Goode, I.A., Hamon, M., Novak, RA., Steward. H.J., Whyte. A., Flint A.P.F., Maternal recogniton of pregnancy, *Proceedings of the 11 International Congress on Animal Reproduction and A.I.* Dublin, Vol. 5. pp. 55-60. 1988.
- 69- Huater. R.H.F., *Physiology and technology of reproduction in female domestic animals*. Academic Press. London. pp.23-25 and pp.201-203, 1980.
- 70- Iannaccoone, P.M., microsomal mediated embryo toxicity due to superoxid radicals, *teratogen. Carcinogene. Mutagen.*, (1986) 6,237-243.

- 71- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* (2004) 428: 145-150.
- 72- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* (2005) 122: 303-315.
- 73- Jaiswal, R. S., Singh, J., Adams, G. P. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod* (2004) 71: 1244-1251.
- 74 - J.S., Murray, R.W., Foley, R.C.. Observations on the morphogenesis Gernstein. and histochemistry of the bovine pre-attachment placenta between 16 and 33 days of gestation *Anat. Rec.* (1958) 132. 321 -341.
- 75-Kinder, J. E., Bergfeld, E. G., Wehrman, M. E., Peters, K. E., Kojima, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J Reprod Fertil Suppl* (1995) 49: 393-407.
- 76- Kaipia, A., Hsueh, A. Regulation of ovarian follicle atresia. *Ann Rev Physiol* (1997) 59: 349-363.
- 77- Kruij, T. A., Dieleman, S. J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction, Nutrition and Development* (1982) 22: 465-473.
- 78-Keskintepe, L.. Burnley, C.A.. Brackett.B.G., Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol. Reprod.*, (1995) 52. 1410- 141 7.
- 79 - Kaye, P.L., Metabolic aspects of the physiology of the preimplantation embryo, In: *Experimental approaches to Mammalian Embryonic Development*, Rossant, J., Pederson, R.A., eds Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 267-292, 1986.
- 80- King, G Atkinson, B.A., Robertson, K.A Implantation and early placentation in domestic ungulates. *J. Reprod. Fert.* (1982) Suppl. 31. 17-30.
- 81 - Loutradis, D., John, D.. Kiessling. A.A.. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Biol. Reprod.*, (1987) 37. 311-316.
- 82-Lussier, J. G., Matton, P., Dufour, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* (1987) 81: 301-307.
- 83- Lussier et al; 1987 Lussier, J. G., Matton, P., Dufour, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* (1987) 81: 301-307.
- 84-Lussier, J., Matton, P., Dufour, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow, *J. reprod. Fert.* (1987) 301 -307.

- 85-Lonergan P., Carolan C., Van Langendonck A Etal. (rol of epidermal growth fator in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo developpement in vitro.) Biol Reprnd. 1996, 54. 1420 -9.
- 86 -Lindner. G.M., Wright. R.W. Jr. Bovine embryo morphology and evaluation Theriogenology (1983)29. 407-41 6.
- 87- Magre, S., Vigier, B. Développement et différenciation sexuelle de l'appareil génital. In:Thibault, C., Levasseur, M.-C. (eds.), Le reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: INRA editions; 2001: 235-255.
- 88-Majerus, V., De Roover, R., Etienne, D., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. Theriogenology (1999) 52: 1169-1179.
- 89- Markström, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B., Billig, H. Survival factorsregulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. Reproduction (2002) 123: 23-30.
- 90- Morita, Y., Tilly, J. Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass. DevelopBiol(1999) 213: 1-17.
- 91- McGee, E. A., Chun, S. Y., Lai, S., He, Y., Hsueh, A. J. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. Fertil Steril (1999) 71: 732-738.
- 92- McGee, E., Spears, N., Minami, S., Hsu, S. Y., Chun, S. Y., Billig, H., Hsueh, A. J. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: Suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology (1997) 138: 2417-2424.
- 92- Murray, A. A., Molinek, M. D., Baker, S. J., Kojima, F. N., Smith, M. F., Hillier, S. G., Spears, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. Reproduction (2001) 121: 89-96.
- 93-Murduch Wj, Van Kirk E.A .,(estrogenic upregulation of DNA polymerase bin oocytes of preovulatorv ovine follicles). Mol Reprod Dev. (2001). 58.417-423.
- 94- Miller. KF.. Pursel, V.G.. Absorption of compounds in medium by the oil covering microdrop cultures. Gamete Res.. (1987) 17,57-61.
- 95-Mclaren, A., Biggers. J.D.. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embrvos. Nature (london). (1958) 182. 877-878.
- 96-Maurer. R.R.. Echterkamp. SE.. Hormonal asynchrony and embryonic development Theriogenology. (1982) 17. 11-22.

97-Menino, A.R. Jr, Williams, J.S Activation of plasminogen by the early bovine embryo, Biol.Reprod.,(1987)36,1289-1295.

98 - Nasr-Esfahani, M.H., Aitken, J.R., Johnson, M.H., Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro and in vivo. Development, (1990) 109, 50 1-507.a

99-Nibart et al 1995 in biotechnologie. 5ème édition de René Scriban coordinateur.

100-Presicce, G. A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C. R., Godke, R. A., Yang, X.Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. Biol Reprod (1997) 56: 386-392.

101-Postel-Vinay O., Millet A., 1997. « Comment ça va Dolly ». La r2- Pavlok A, Lucas-Hahn A and Niemann H (1992). Fertilisation and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol.Reprod. Dev.: Vol 31. pp 63-97.

102- Peters et al., 1988 in biotechnologie. 5ème édition de René Scriban coordinateur.

103-Pope, W.P., Uterine asynchrony:A cause of embryonic los, Biol. Reprod.. (1988) 39, 999-1003.

104-. Rüsse 1 (1983). Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat 24,77-92.42- Reynaud, K., Driancourt, M. Oocyte attrition. Mol Cell Endocrinol (2000) 163: 101-108.

105-Russe, I. Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat (1983) 24: 77-92.

106- Roberts, R.M., Schalue-Francis, T., Francis, H., Keisler, D., Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. Theriogenology. (1990) 33. 175- 183.

107- Roberts. R.M., Bazer. F.W., The functions of uterine secretions. J. Reprod. Fert., (1988) 82, 875-892.

108 - Ritger, D., Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos, Theriogenology, (1992) 37, 75-93.

109-Salamone, D. F., Damiani, P., Fissore, R. A., Robl, J. M., Duby, R. T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. Biol Reprod (2001) 64: 1761-1768.

- 110- Svanberg, B., Billig, H. Isolation of differentially expressed mRNA in ovaries after estrogen withdrawal in hypophysectomized diethylstilbestrol-treated rat: Increased expression during apoptosis. *J Endocrinol* (1999) 163: 309-316.
- 111- Salamone, D. F., Adams, G. P., Mapletoft, R. J. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* (1999) 52: 549-561.
- 112- Stock, A. E., Fortune, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* (1993) 132: 1108-1114.
- 113 - Sohal, R.S., Allen, R.G., Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a uniQing hypothesis, *Exp. Gerontol.*,(1990) 25, 499-522.
- 114- Smith, L. C., M. Olivera-Angel, N. P. Groome, B. Bhatia, C.A. Price. (1996). Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle. *J. Reprod. Fertil* 106:193-199.
- 115 - Shioya, Y. M, Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwassaki, and A. Hanada. (1988). In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriongenologie*. 30 (3) 488 - 499.
- 116 - 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, 558-565.
- 117 -Savio, J. D., Thatcher, W. W., Badinga, L, de la Sota, R. L., Wolfenson, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod fertil* (1993) 97: 197-203.
- 118-Testar J., 1992. *Le désir du gène*, Bourin F., Ed, paris. 286 p.
- 119-Tesarik J, Mandoza C., (direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. (Review) (20 refs) *Hum Reprod up Date*, (1997). 3, 95 -100.

- 120-Thatcher. W.W., Hansen, P.J. Gross.T. S., Helmer S.D., Plante, C., Bazer, F.W., Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J. Reprod. fert.* (1989) 37 (Suppl), 91-99.
- 121-Trounson, A.O. Moore. N.W., The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona peilucida. *J. Reprod. Fert.* (1974) 41. 97-105.
- 122- Tervit, H.R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E.A., Successful culture in vitro of sheep and cattle ova, *J. Reprod. Fert.*, (1972) 30, 493-498.
- 123-Thibault, C., La culture in vitro de l'oeuf de vache. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* (1966) 6, 159-164.
- 124-Thatcher. W.W, Wolfenson. D., Curl, J. S., Rico, L.E., Knickerbocker, J.J., Bazar, F.W., Drost. M., Prostaglandin dynamics associated with development of the bovine conceptus. *Anim. Reprod. Sci.* (1984) 7. 149-176.
- 125-Thatcher. W.W., MacMillan. K.L., Hansen, P.J., Drost. M., Concepts for regulation of the corpus luteum and ovarian follicles to improve fertility, *Theriogenology*. (1989b) 31:149-161.
- 126- Van Soom, A., Boerjan, M. L., Bols, E. J., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., de Kruif, A. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* (1997a) 57:
- 127- Van Beneden, 1875 Van Der stricht 1923 in Belaisch J., Menezo Y., Plachot M., Thihault C.. 1992. Eds 31 reunion de la SFEF, contraception- fertilité- sexualité. paris.
- 128 -Wooliams, J.A., and Wilmot. (1989), embryo manipulation in cattle breeding and production
48. 3 - 30.
- 129-Whitten, W.K., Culture of tubal ova, *Nature (London)* (1957) 179. 1081-1082.
- 130-Wilmot, L. Sales. D.I. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J. Reprod. Fert.* (1981) 61. 179-184.
- 131 - Wright, R.W. Jr., Anderson, G.B., Cupps, P.T., Drost, M., Successful culture in vitro of bovine embryos to the blastocyst stage, *Biol. Reprod.*, (1976) 14, 157- 162.
- 132- Wolf D.P., The mammalian egg's block polyspermy. In: *Fertilization and embryonic development in vitro*, Mastroianni. L., Biggers, B.G., Plenum Press, New York. 183-197. 1981.

133-Wooding, F.B.P.. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. J. Reprod. Fertil.. (1982) 31 (suppl). 31-39.

134- Zamboni, L., Merchant, H. The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. Am J Anat (1973) 137: 299-335.

135-Zuckerman, S. The number of oocyte in the mature ovary. Recent Prog Horm Res (1951)6: 63-108.

136- Monniaux et al., A.O..Moore. N.W., The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona peilucida. J. Reprod. Fert.. (1999) 41. 97-105.

137- Roche, Mandoza C., (direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. (Review) (20 refs) Hum Reprod up Date, (2003). 3, 95 -100.