

République Algérienne Démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université (SAAD DAHLEB-BLIDA)  
Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques  
Département des sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme : Docteur Vétérinaire

Thème :

*La maturation ovocytaire in vitro chez la vache*



BOUCHAMA NAWAL

Réalisé par :

BOURADA AFAF

Présenté devant:

Pr Kaidi. R  
Dr Menoueri. N  
Dr Gherbi. S  
Dr Adel. D

PROFESSEUR (USDB)  
MAT (USDB)  
MAT (USDB)  
MAT (USDB)

Président de jury  
Examineur  
Examineur  
Promoteur

Promotion: 2006-2007



## Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des annexes.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Résumé.....	VI
Introduction.....	01

### ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

#### **CHAPITRE I : rappels physiologiques**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>02</b>
<b>2. Ovogenèse.....</b>	<b>02</b>
<b>3. Aspects morphologiques de la croissance folliculaire.....</b>	<b>03</b>
<b>4. Régulation hormonale de la croissance folliculaire.....</b>	<b>05</b>
4-1/ phase non gonado-dépendante.....	05
4-2/ phase gonado-dépendante.....	05
➤ Phase de recrutement (FSH-dépendante).....	05
➤ Phase de sélection.....	05
➤ Phase de dominance (LH-dépendante).....	06
<b>5. la croissance ovocytaire.....</b>	<b>06</b>
<b>6. La maturation ovocytaire in vivo.....</b>	<b>07</b>
6-1/ La compétence méiotique.....	07
6-2/ La compétence au développement.....	08
6-3/ Atrésie folliculaire.....	09
6-4/ La Méiose ovocytaire.....	09
<b>7. La maturation ovocytaire.....</b>	<b>10</b>
7-1/ la maturation nucléaire.....	11
➤ Rôle de l'MPF dans la reprise de la méiose.....	12
7-2/ La maturation cytoplasmique.....	13
7-3/ expansion de cumulus.....	14
<b>8. Effet de facteurs de croissance.....</b>	<b>15</b>



## CHAPITRE II : fécondation in vitro

1. Introduction.....	17
2. les techniques de récolte d'ovocytes.....	18
2-1/ In vivo par la technique OPU .....	18
2-2/ In vitro à partir d'ovaires d'abattoir .....	19
3. Jugement et sélection des ovocytes.....	20
4. maturation ovocytaire in vitro (MIV).....	22
4-1/ Principes généraux.....	22
a- La stérilité.....	22
b- Température.....	23
c- Le pH.....	25
d- L'osmolarité.....	25
e- La lumière.....	26
f- L'environnement gazeux.....	26
4.2/ Milieu de culture.....	27
a- Protéines.....	28
b- Hormones.....	29
c- Facteurs de croissance.....	30
4-3/ Méthodes de culture.....	30
➤ Méthodes de culture stationnaire.....	30
➤ Méthodes de culture en suspension.....	30
❖ La culture en puits.....	30
❖ La culture en microgouttes.....	31
4-4/ Evaluation de la maturation ovocytaire.....	31
5. Fécondation in vitro.....	33
5-1/ Capacitation des spermatozoïdes et fécondation in vitro.....	33
5-2/ Fécondation proprement dite.....	34
6. La culture des embryons.....	35
➤ La culture de l'embryon in vivo.....	35
➤ La culture de l'embryon in vitro.....	35
❖ Les techniques de Co-culture.....	35
❖ La culture dans un milieu chimiquement défini.....	35

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

Introduction.....	37
I- Matériels et méthodes.....	37
I-1/ Matériels.....	37
a) Les ovaires.....	37
b) Matériels.....	37



<b>II- Méthodes</b> .....	40
<b>II-1/ milieux utilisés</b> .....	40
<b>II-2/ La préparation du milieu</b> .....	40
<b>II-3/ Collecte des ovaires</b> .....	41
a) <b>Ponction ovarienne</b> .....	41
b) <b>Sélection des ovocytes</b> .....	42
c) <b>Les différents milieux de maturation utilisés</b> .....	43
d) <b>Mise en maturation des COCs</b> .....	43
e) <b>Evaluation morphologique de la maturation ovocytaire</b> .....	43
<b>III- Résultats et commentaires</b> .....	45
A- <b>Résultats</b> .....	45
B- <b>Discussions</b> .....	52
<b>Conclusion</b> .....	53
<b>Recommandations</b> .....	54
<b>Annexes</b> .....	55
<b>Références bibliographiques</b> .....	56

## Remerciements

Nous remercions avant tout, le bon dieu, qui nous a accordé sa bénédiction, son aide et surtout la patience pour accomplir ce travail.

Nous remercions notre promoteur, Dr Adel Djallel, pour sa patience, ses encouragements, et tout le temps précieux qu'il nous a consacré ainsi pour ses qualités humaines,

Nous remercions également,

Le professeur Kaidi, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury,

Messieurs : le Dr Gherbi et le Dr Menoueri, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail,

Monsieur le docteur Achache pour avoir minutieusement examiné nos photographies, pour ses précieux conseils et tout ce qu'il nous a apporté,

Madame le professeur Kessri de l'institut pasteur d'Alger, pour son accueil, sa générosité, ses encouragements et son éternel sourire ainsi qu'à son assistante Nora, pour sa disponibilité,

Madame Ait Said Lamia, de l'institut pasteur d'Alger, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible,

Madame Taleb Farida, de l'institut pasteur d'Alger pour tous ses encouragements et sa bonne humeur à toute épreuve,

Madame Boukachabia de l'institut pasteur d'Alger pour son aide

Tout le personnel de l'institut pasteur d'Alger.

Monsieur le professeur Guetarni pour son soutien.

Dr Nadjemi Hamza et Dr Bensefia Sidahmed pour leur soutien et leur disponibilité.

Dr Rahmouni pour nous avoir orienté dans nos démarches ainsi que pour son soutien.

## Dédicaces

### Je dédie ce modeste travail :

- A la mémoire de ma défunte grand-mère, qui était mon petit soleil.
- A mes parents, pour leur confiance et leur amour, pour leur soutien dans mes démarches, pour m'avoir mise au monde et menée jusqu'ici.
- A Chafik, l' élu de mon cœur,
- A mon frère,
- A ma sœur,
- A ma binôme, Mlle Bourada Afaf, en qui j'ai trouvé une amie sincère et une confidente tout au long de ces cinq années d'études, ainsi qu'à toute sa famille,
- A monsieur et madame Achache qui nous manquent beaucoup,
- A toute la clique : Athmane, Hamza, Sidahmed, Imane, Amine, Moh, pour tous ces moments inoubliables, je les remercie,
- A mes deux petits anges : Kahina et Naziha ainsi qu'à Mahmoud,
- A Poukina, Mounina, Nechou, Myrou, Chouchoutte, Neilouche et toute la bande,
- A Mimiche, celle qui m'a tout appris, et m'a surtout transmis la passion du métier, à Kami, Lamia, et à toute la famille Hafiz,
- A Linda, mon entraîneur, celle qui a su me coacher sur tous les aspects,
- A Metallman, Psycho, Yoda, Yass, Diablange, Polaris, Kimox, Apokalypse et à tous les zens,
- A tous mes camarades de promotion, à qui je souhaite beaucoup de succès, avec une pensée à la mémoire de Mlle Tchakmandji Sarah « rabi yerhamha »

**NAWEL**



## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

- Mes très chers parents : la source de ma vie
- A celui qui est cher à mon cœur.
- A Mes soeurs : Naima, Amel et Manoula
- Ma chère Nadira, à Hadji et à Rayen et Razane
- Mes frères
- Ma grande mère, mon oncle Ahmed, mes tantes et ses familles
- A abdelhakim et toute la famille Fenniche
- Ma binôme Nawel et toute sa famille
- A mes amis(e) : Lamia, Asma, Imen, Anissa et Lila, Naziha,  
Sidahmed, Athmane, Mohamed et Amine
- A monsieur et madame achache
- A Dr Ouchen Youcef et Dr Alilat Sidali.
- A Ihssen la bibliothécaire de BLIDA
- A l'hommage de notre sœur Sarah rabi yarhamha
- A toute la promotion vétérinaire 2006 - 2007 de BLIDA

**AFAF**

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Coupe d'ovaire montrant les différents stades folliculaires. (Guénard et al, 1996).....	4
<b>Figure 02</b> : Représentation schématique des événements chromosomiques de la méiose (Jacqueline Laurent, 1999).....	10
<b>Figure 03</b> : Les différents stades de maturation nucléaire des ovocytes Bovins observés après culture in vitro (Sirard et al, 1989).....	11
<b>Figure 04</b> : Schéma de la ponction folliculaire transvaginale sous échographie. (MARTORIATI. A, 2002).....	18
<b>Figure 05</b> : Différents types d'ovocytes récoltés par ponction folliculaire transvaginale (De Loos et al, 1989).....	22
<b>Figure 06</b> : Schéma représentant le Principe général du fonctionnement d'une hotte à flux laminaire. (Schuster, 2001).....	23
<b>Figure 07</b> : Histogramme montrant l'influence de la température de culture sur le taux de fécondation in vitro chez quatre espèces. (Crozet, 1993)...	24
<b>Figure 08</b> : Principe du fonctionnement d'un incubateur à CO <sub>2</sub> (Schuster, 2001).....	26
<b>Figure 09</b> : Complexe cumulus ovocyte bovin avec couches compactes de cumulus avant maturation (selon sirard et al, 1989).....	32
<b>Figure 10</b> : Complexe cumulus ovocyte bovin avec cumulus expansé après 24h de maturation. (Sirard et al, 1989).....	32
<b>Figure 11</b> : Schéma et photo d'ovocyte après maturation (Crozet, 1993).....	33
<b>Figure 12</b> :Image de la salle de culture cellulaire.....	39
<b>Figure 13</b> : Photo de l'étuve a CO <sub>2</sub> .....	39
<b>Figure 14</b> : Préparation des plaques de culture.....	41
<b>Figure15</b> : Image de la ponction ovarienne.....	42
<b>Figure 16</b> : Photos d'ovocytes matures ou expansés après MIV.....	48
<b>Figure 17</b> :Photos d'ovocytes matures ou expansés après MIV.....	49
<b>Figure 18</b> : Photos d'un ovocyte après coloration au « Giemsa ».....	50
<b>Figure 19</b> : Photos d'ovocytes considérés comme immatures ou non expansés après MIV.....	51

## Liste des tableaux :

### Partie bibliographique

- **Tableau n°1** : Les temps de maturation nucléaire des ovocytes bovins (sirard et al 1989)..... 12
- **Tableau 02** : Classification des complexes ovocytes cumulus en MIV selon (Stojkovic et al 2001).....21
- **Tableau 03** : Classification des complexes ovocytes cumulus en MIV selon (Hanzen 2004).....21

### Partie expérimentale

- **Tableau I** : Résultat globale de la maturation.....45
- **Tableau II** : Maturation en fonction du milieu de base.....46
- **Tableau III** : Maturation en fonction de la présence du hCG.....47



## Listes des annexes

<b>Annexe 1</b> : Photos d'ovocytes qui ont subi des altérations.....	55
<b>Annexe 2</b> : Composition milieu M199 (Sigma), Quantités exprimées en mg/L.....	56

## Liste des abréviations

% :	pourcentage
°C :	degré celsius
¾ :	trois quart
ADN :	acide désoxyribonucléique
AI:	anaphase I
AMPc :	adénosine 3', S1-monophosphate cyclique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ARNr:	ARN ribosomique
ARNt:	ARN du transport
ATP :	Adenosine tri-phosphate.
bFGF:	basic fibroblast growth factor
BSA :	bovine serum albumin (albumine sérique bovine)
CEEF:	cumulus expansion enabling factor.
cf :	confer.
Co2 :	dioxyde de carbone
COC :	cumulus-oocyte complex (complexe cumulus-ovocyte)
CR1:	Milieu de Rosenkrans
CSF :	cytostatique factor
E2 :	estradiol- 17β
ECS:	estrus cow serum
EGF:	epidermal growth factor
FIV :	fécondation in vitro
FSH:	folliculo-stimulating hormone (hormone folliculo-stimulante)
GV :	germinal vesicle (vésicule germinale)
GVBD :	germinal vesicle breakdown (rupture de la vésicule germinale)
H :	heure(s)
HCG :	human chorionic gonadotropin
IG F:	insulin-like growth factor
IGF-I et -II:	insulin-like growth factor (I et II)
LF:	liquide folliculaire
LH :	luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
LH-RH:	luteinizing hormone-releasing hormone
MEM :	minimum essential medium
mg, ug, ng, g :	milli-, micro-, nano-, gramme
MI, MII. :	métaphase-I métaphase-II
Min:	minute
MIS:	meiosis inhibiting substance
MIV :	maturation in vitro
MIV/FIV/DIV:	maturation in vitro/ fécondation in vitro/ development in vitro
ml, ul, l :	milli-, micro-, litre
mm,um,nm,m :	milli-, micro-, nano-, mètre
MPF:	meiotic promoting factors

## RESUME

La maturation ovocytaire in vitro est une étape déterminante de la production in vitro d'embryons, c'est une biotechnologie de deuxième génération, qui, bien que répandue à l'étranger reste relativement peu connue en Algérie.

Ce travail a pour objet d'introduire cette technique en Algérie et servira de tremplin à d'autres travaux afin d'aboutir à la maîtrise de la fécondation in vitro chez l'espèce animale dans notre pays.

Après une étude bibliographique détaillée sur les différents facteurs influençant la MIV, à savoir, les conditions générales, les milieux de culture et les techniques de maturation proprement dite, nous avons sélectionné un protocole expérimental où nous nous sommes intéressés au déclenchement de la maturation dans un premier temps, puis à l'effet de l'ajout de hCG dans le milieu sur le taux d'expansion du cumulus.

Le taux global de maturation a été de 57,02%, optimisé par l'enrichissement du milieu au hCG pour atteindre 63,64% d'ovocytes maturés.

Les résultats démontrent clairement l'importance de l'enrichissement du milieu de culture dans la réussite de la maturation ovocytaire in vitro.

**Mots clés :** maturation, ovocyte, in vitro, milieux de culture, hCG, fécondation in vitro, production in vitro, embryons.



## INTRODUCTION GENERALE

La reproduction est par définition, la fonction qui assure la pérennité des espèces animales par le renouvellement des générations.

Les améliorations génétiques susceptibles d'être apportées, par manipulation de la voie mâle ou femelle, expliquent l'enjeu économique majeur que représente la maîtrise de la reproduction.

La production d'embryons in vitro (PIV) constitue l'un des aspects de la maîtrise de la reproduction ; cette technique qui permet une production d'embryons en dehors du tractus génital dépend de 4 étapes successives :

- Collecte des ovocytes
- Maturation in vitro (MIV)
- Fécondation in vitro (FIV)
- Culture des embryons.

Notre travail s'intéresse à l'une de ces étapes, à savoir, la maturation ovocytaire in vitro (MIV), un processus impliquant la culture in vitro de l'ovocyte, lui permettant d'atteindre une complète maturation nucléaire et cytoplasmique essentielle à la fécondation et à la production d'embryons viables.

Il se scinde en deux parties :

- Une première partie, (bibliographique) qui constitue une synthèse des connaissances sur les aspects in vivo et in vitro de la maturation ovocytaire.
- Une seconde partie (expérimentale) aborde le protocole expérimental que nous avons employé et la discussion des résultats obtenus.

# ***CHAPITRE I***

## ***Rappels physiologiques***

## 1. Introduction :

Dans l'ovaire, les follicules forment un micro-environnement de l'ovocyte. Ce sont des chambres sphériques formées de cellules épithéliales, les cellules de granulosa, et de cellules mésenchymateuses, les cellules de la thèque, qui entourent l'ovocyte. Au cours de la différenciation du follicule, il y a formation d'un antrum et apparition du liquide folliculaire dans lequel baigne l'ovocyte. Le follicule nourrit donc l'ovocyte tout au long de sa croissance.

Les ovocytes sont des cellules germinales qui subissent, pour atteindre un nombre haploïde de chromosomes, des divisions nucléaires appelées méiose. Celle-ci commence durant la vie fœtale, mais est arrêtée une première fois en prophase de la première méiose, pour ensuite recommencer à la maturité sexuelle de l'animal. À ce moment, c'est la décharge gonadotrope de LH qui provoque la reprise de la méiose, mais un deuxième arrêt, en métaphase de la deuxième méiose bloque l'ovocyte. Cette seconde inhibition de la méiose dure jusqu'à ce que l'ovocyte soit pénétré par un spermatozoïde. Il est indéniable que l'ovocyte passe la majeure partie de son existence en arrêt méiotique.

## 2. Ovogenèse :

La fonction fondamentale de l'ovaire est la production de manière cyclique de cellules germinales matures apte à être fécondés.

Chez les mammifères, l'ovogenèse débute pendant la vie fœtale, les cellules germinales primordiales (PGC) colonisent les gonades en formation au cours des premières semaines de vie de l'embryon et prennent alors le nom « **d'ovogonies** » qui prolifèrent par mitoses successives.

Chez le bovin, les PGC ou gonias arrivent au niveau de la crête génitale qu'au 30<sup>e</sup> jour de la gestation. Au 57<sup>e</sup> 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 82<sup>e</sup> jour de gestation, lorsque la production d'ovogonies est complétée, les premières méioses sont observées et elles deviennent ainsi des ovocytes dites primaire qui entrent en méiose et s'arrêtent au stade diplotène de la prophase de la première division méiotique. (Russe, 1983).

Chez le bovin, la méiose fœtale arrête vers le 90<sup>e</sup> jour de gestation. 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. À partir de ce moment, le noyau de l'ovocyte est appelé la vésicule germinale (GV).



### 3. Aspects morphologiques de la croissance folliculaire: (cf. figure 01)

L'ovocyte primaire s'entoure de quelques cellules somatiques aplaties du stroma ovarien (de granulosa) reposant sur une membrane basale, et forme ainsi le follicule primordial

Ces follicules se retrouvent au niveau du cortex de l'ovaire. Aux environs du 140<sup>e</sup> jour de la gestation. Le pool de ces follicules formés avant la naissance constitue le capital germinal qui participera à la fonction de la reproduction de la femelle durant sa vie adulte.

C'est à partir de ce stock que se réalisera la folliculogénèse qui peut être définie comme l'ensemble de processus par lesquelles un follicule primordial du stock se développe pour atteindre l'ovulation ou régresse par atrophie (Hamamah 1999).

Ces follicules primordiaux (30 µm de diamètre) débutent leur croissance par multiplication des cellules folliculaires et développement de l'ovocyte qui contiennent (Fieni et AL 1995, Mialot et AL 2001).

Dans le **follicule primaire** (100 µm de diamètre) l'ovocyte s'entoure d'une monocouche de cellules somatiques devenues cuboïdes et la zone pellucide (zp) s'ébauche à partir glycoprotéines sécrétées par celui-ci (Driancourt et al 2001).

Une membrane basale entoure les cellules de la granulosa et isole ces dernières du stroma environnant. Alors que plusieurs couches de cellules apparaissent par mitose et que le diamètre ovocytaire grossit le follicule est dit **secondaire**, est c'est à ce moment que la thèque interne s'ébauche à partir des cellules stromales présentes toute autour du follicule.

Après un certain nombre de divisions, les cellules de granulosa commencent à sécréter dans l'espace extracellulaire un liquide dont la composition rappelle celle du plasma sanguin (le liquide folliculaire : LF), à mesure que ce liquide s'accumule il crée une cavité et s'y concentre le follicule est dit **tertiaire** ou **antral**.

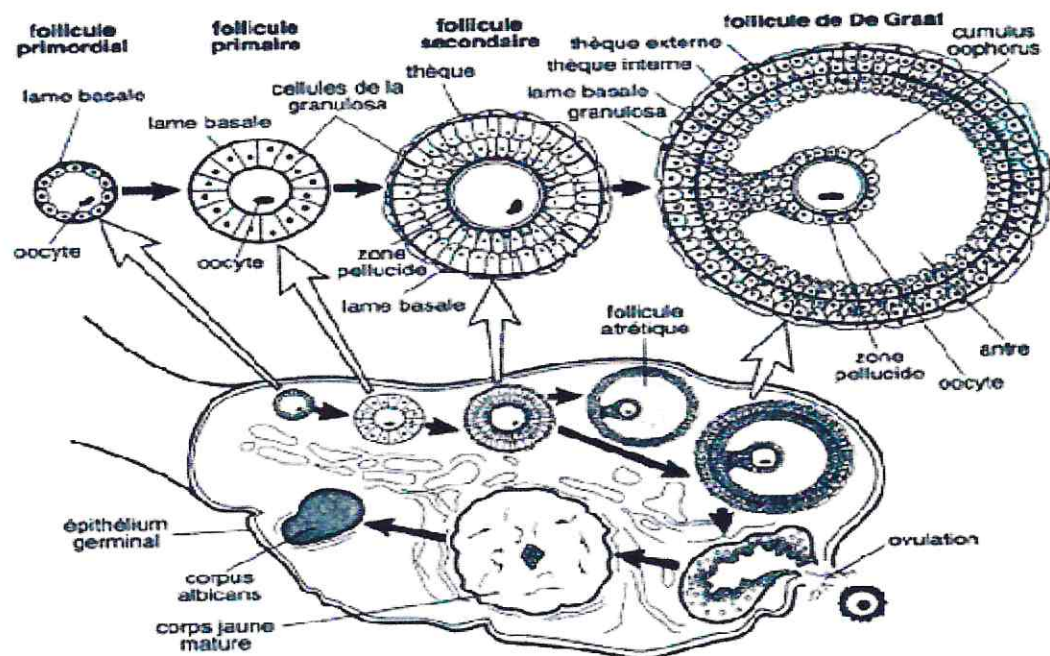
Dans ce dernier on distingue deux types de granulosa différenciées : les granulosa murales qui sont en contact avec la lame basale et les granulosa antrales, dont les cellules de cumulus qui elles entourent l'ovocyte (Buccione et AL 1990) les granulosa forment une population cellulaire hétérogène quant à leurs sécrétions et fonctions. Par exemple les cellules les plus près de la lame basale possèdent plus des récepteurs à LH (Luteinizing hormone) que celles qui sont plus près de la cavité antrale.

Les cellules de cumulus forment avec l'ovocyte un complexe qui baigne dans le liquide folliculaire. Toute au long du développement folliculaire les cellules de la granulosa communiquent entre elles et avec l'ovocyte grâce à des jonctions ouvertes.

Au cours de cette croissance les follicules acquièrent également des récepteurs les rendant potentiellement capable de répondre à une stimulation gonadotrope; récepteurs à LH pour les cellules de la thèque interne et à FSH (Follicle stimulating hormone) pour les cellules de la granulosa (Ennuyer 2000, Fieni et AL 1995 ;)

La croissance qui s'ensuit et qui ne concerne que quelques centaines de follicules pour toute la période de la vie génitale de la vache, est communément décrite par les concepts de recrutement, sélection et dominance qui sont sous l'influence des gonadotrophines (FSH et LH).

- **Le recrutement** : est l'entrée en croissance terminale d'un groupe de follicules gonadodépendants.
- **La sélection** : est l'émergence parmi ces follicules du follicule ovulatoire. La taille folliculaire au moment de la sélection correspond globalement à la taille où apparaissent des récepteurs à LH sur la granulosa (massif de cellules folliculaires)
- **La dominance** : correspond à la maturation du follicule ovulatoire, la régression par atresie des follicules subordonnés et le blocage du recrutement de nouveaux follicules (Ennuyer2000 ; Fieni et al 1995)



**Figure01** : Coupe d'ovaire montrant les différents stades folliculaires. (Guénard et al 1996)



## 4. Régulation hormonale de la croissance folliculaire:

### 4-1/ phase non gonado-dépendante:

Le développement d'un follicule primordial (30µm de diamètre) à un follicule tertiaire recruté (5mm) pour être intégré à une vague folliculaire dure plus de 6 mois (Ennuyer2000) les gonadotrophines ne sont pas indispensables dans l'initiation de cette phase selon (Mcnatty et al1999) bien que les ARNm des récepteurs à FSH et LH semblent apparaître précocement (Bao et al1998)

La régulation de cette phase semble être largement assurée par les facteurs locaux à l'origine d'interaction entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte.

Cette phase de développement est qualifiée de folliculogénèse basale

### 4-2/ phase gonado-dépendante:

Un follicule est recruté quand il est capable de répondre à la stimulation par les gonadotrophines: c'est la phase terminale de la croissance folliculaire.

#### ➤ Phase de recrutement (FSH-dépendante):

Chez les ruminants le recrutement se fait en continu générant les vagues folliculaires qui consiste à l'émergence tous les 7 à 9 jours environ d'une cohorte de follicules sous l'action de la FSH.

La FSH se fixe sur les récepteurs des cellules de la granulosa et stimule l'aromatisation des androgènes produits par les cellules thécales en œstrogène et induit la formation de récepteurs à LH.

L'augmentation des taux d'oestradiol (E2) à un effet positif sur la production de la GnRH associée à la FSH, l'augmentation de la fréquence des décharges de LH stimule la production d'oestradiol et d'inhibine synthétisées par la granulosa. Dont l'inhibine supprime la libération des gonadotrophines hypophysaires (la FSH principalement) (Ennuyer, 2000).

#### ➤ Phase de sélection:

Le follicule destiné à ovuler continue sa croissance tandis que les autres follicules de la cohorte dégèrent par atrophie, les mécanismes contrôlant cette sélection ne sont pas connus à l'heure actuelle.

L'hypothèse la plus probable est basée sur la combinaison d'un mécanisme endocrinien et local, la production d'E2 par le follicule dominant (Ginther et al, 2000) ainsi que celle d'inhibine conduit à une diminution de la sécrétion de FSH.

La diminution des taux circulants de FSH bloque la croissance et maturation des follicules les plus sensibles (faible concentration intra folliculaire en IGF-1 bio disponible et en E2) (Moniaux et al1996)

➤ **Phase de dominance (LH-dépendante):**

Malgré les taux réduits de FSH circulante, le follicule dominant continue sa croissance. Chez la vache le follicule dominant qui possède des récepteurs à LH dans les cellules de la granulosa est sensible aux stimulations pulsatiles de LH, des régulateurs intra ovariens amplifient la réponse folliculaire à FSH et LH.

Suite à une forte concentration des gonadotrophines si le follicule dominant se développe en synchronie avec la phase folliculaire du cycle oestral il s'ouvrira et libérera l'ovocyte, c'est l'ovulation. Sinon il rétrogradera par atrophie

## 5. la croissance ovocytaire :

Après la naissance, le développement de l'ovocyte est intimement lié à celui du follicule engagé dans les différentes étapes de la folliculogénèse.

La croissance de l'ovocyte se produit alors qu'il est bloqué au stade diplotène de la prophase méiotique, cette période de croissance est caractérisée par des modifications morphologiques témoins d'une intense activité métabolique au sein de l'ovocyte (selon Hamamah 1999 et Bruyère, G 2002).

L'ovocyte en début de croissance dans son follicule primordiale est une cellule de 20 à 50 µm de diamètre contenant un noyau de grande taille, la vésicule germinale (GV). L'entrée en croissance de l'ovocyte est caractérisée par une accumulation de molécules (granules de glycogène, gouttelettes lipidiques, protéides, peptides...) et d'organelles nécessaires à la maturation, à la fécondation et au développement préimplantatoire. On observe ainsi une multiplication des mitochondries, des ribosomes, une extension du réticulum endoplasmique et des appareils de Golgi...

Une zone pellucide se forme autour du gamète du follicule secondaire; il s'agit d'un réseau extracellulaire tridimensionnel de glycoprotéines (5-10% des synthèses de l'ovocyte en croissance) traversé par des prolongements des cellules péri ovocytaires (corona radiata) qui établissent des jonctions perméables (gap junction) avec la membrane plasmique de l'ovocyte.

Les granules corticaux (petites vésicules de 200-600nm de diamètre) qui jouent un rôle important lors de la fécondation (lutte contre la polyspermie) se forment dans le complexe Golgien près du noyau.

Au sein du follicule tertiaire l'ovocyte augmente de 100 à 120 µm environ et on note la formation d'un espace périvitellin, la migration des granules corticaux dans le cortex de l'ovocyte et un déplacement de la GV vers la périphérie.

Les complexes de Golgi et les réserves lipidiques sont plus nombreux tandis que le réticulum endoplasmique (RE) devient moins abondant.

Cet ensemble d'organites est soutenu par un important réseau de cytosquelette dont certaines structures sont propres à l'ovocyte.

La phase de croissance de l'ovocyte est caractérisée par une activité transcriptionnelle intense avec accumulation des macromolécules; les principales



classes des ARN ( $ARN_m$ ,  $ARN_t$ ,  $ARN_r$ ) sont synthétisés et stockés ( $ARN_m$  principalement) soit 200 fois la teneur moyenne en  $ARN_m$  ultérieurement traduits en protéines constitutives telles l'actine, la tubuline, la calmoduline ou les glycoprotéines de la zone pellucide.

Ces  $ARN_m$  sont caractérisés par une durée de vie longue, ils sont utilisés jusqu'au début de développement embryonnaire.

L'équilibre entre cette stabilité et la transcriptionnalité de transcrits est un critère de réussite important en MIV chez l'homme et la vache (Hamamah et al 1996)

Donc en fin de croissance, l'ovocyte est une très grande cellule riche en réserves de toutes sortes et en organites, dont l'anabolisme ralentit considérablement après l'intense activité développée pendant toute la phase de cette croissance.

Son noyau (GV) est bloqué en prophase méiotique soit en phase G2 du cycle cellulaire et reste à ce stade jusqu'au signal gonadotrope précédant l'ovulation.

## 6. La maturation ovocytaire in vivo :

Lorsque l'antrum se forme, l'ovocyte a atteint environ 80% de sa taille définitive, sa croissance continue de manière ralentie tandis que le volume du follicule croît régulièrement jusqu'à la décharge gonadotrope ovulante. L'ovocyte reste bloqué en fin de prophase méiotique pendant toute la croissance folliculaire, il acquiert d'abord la compétence à reprendre sa méiose puis la compétence à assurer la fécondation et le développement (Thibault 2001)

### 6-1/ La compétence méiotique:

La compétence à reprendre et à compléter la méiose est acquise par l'ovocyte tout au long de sa croissance folliculaire (First et al 1988; Sato et al 1990). Cette maturation nucléaire, tout comme la maturation cytoplasmique, est nécessaire pour que l'ovule soit en mesure d'être fécondé et de se développer (Eppig, 1996).

Les ovocytes de follicules préantraux et antraux sont bloqués en prophase I de la méiose. Mais alors que les derniers sont capables de reprendre la méiose de façon spontanée quand ils sont isolés de leur follicule in vitro les ovocytes provenant de follicules préantraux n'ont pas cette capacité. Les ovocytes isolés de petits follicules antraux sont généralement aptes à reprendre la méiose, mais ils arrêtent en MI au lieu de progresser en MII (Wickramasinghe et al, 1991). On dit qu'ils sont partiellement compétents.

L'acquisition de la compétence méiotique semble corrélée non seulement aux diamètres ovocytaire et folliculaire, mais aussi à la morphologie et l'activité transcriptionnelle du noyau et du nucléole (Motlik et al 1984; Crozet et al 1986; Fair 1995).

In vivo, suite à la décharge gonadotrope qui affecte le follicule antral, il y a rupture des jonctions perméables entre les cellules de granulosa et le cumulus (Larsen et al, 1987). La transmission d'un facteur stimulateur ou d'un facteur

inhibiteur par les cellules folliculaires se trouve donc bloquée et la reprise de la méiose survient (Eppig 1996)

La compétence meiotique se traduit donc par le maintien de l'ovocyte au stade GV par l'environnement folliculaire jusqu'à la décharge hormonal pré ovulatoire, ou la mise en culture in vitro des ovocytes et cela par la levée d'inhibition provoquée par certaines substances inhibitrices probablement transiter par le fluide folliculaire dites OMI, des bases puriques (absentes du LF des bovins) et l'AMPc. Qui permet à l'ovocyte de reprendre sa méiose normalement.

### **6-2/ La compétence au développement :**

La compétence au développement est définie comme étant la capacité de l'ovocyte à assurer le développement de l'embryon obtenu après fécondation au cours de ces premiers clivages, elle se mesure par le taux de blastocystes. Plusieurs études ont investigués les facteurs qui sont susceptibles d'influencer la compétence ovocytaire telles la taille et la qualité du follicule d'origine, l'atrésie folliculaire et l'âge des animaux.

Les ovocytes contenus dans des follicules de petite taille (< 3 mm chez les bovin) même s'ils reprennent normalement leur méiose sont inaptes au développement après MIV/FIV/DIV. notons qu'à cette taille le follicule devient dépendant des gonadotrophines et qu'il acquiert une aromatasé fonctionnelle. Cependant cet effet taille résulte sans doute de l'état de différenciation des cellules somatiques.

La mise au point d'un système de MIV/FIV /DIV pour des follicules individuels a permis l'étude du lien existant entre l'atrésie du follicule et l'aptitude au développement de l'ovocyte.

Les ovocytes issus des follicules atrétique (pas d'aromatasé fonctionnelle dans la paroi folliculaire) présentent une aptitude au développement de l'ovocyte 3 fois plus faible que ceux issus des follicules sains. En revanche, l'induction expérimentale de l'atrésie de follicule pré ovulatoire par administration d'un antagoniste LH-RH n'affecte pas la compétence des ovocytes au développement donc le développement de l'ovocyte est bloqué par l'entré en atrésie du follicule mais une fois celui-ci est réalisé l'entré en atrésie du follicule n'exerce plus d'effet délétère. D'autres facteurs tels l'alimentation de la mère avant la conception (Ashworth et al 1999) les stress environnementaux des animaux (températures, saison...)

L'âge et le génotype de l'animale peuvent aussi influencer la qualité des ovocytes, le développement d'embryon et donc la fertilité (Hunter, 2000)



**6-3/ Atrésie folliculaire :**

Le développement d'un follicule jusqu'à l'ovulation est un fait exceptionnel, en effet près de 99.9% des follicules en croissance dégénèrent par le processus d'atrésie qui se caractérise par l'apparition de cellules pycnotiques, la fragmentation de la membrane basale qui sépare la granulosa de la thèque et la réduction de la vascularisation thécale.

Tout débute par une perte de l'activité aromatasase des cellules de la granulosa (et donc de la production d'E2) liée à la perte de la capacité d'expression des récepteurs à FSH des cellules de la granulosa et à la diminution de celle des récepteurs à LH, suivie de l'apparition de grains de pycnose au sein de ces même cellules (Komar et al 2001) on parle de follicule dominant œstrogène-inactif (Komar et al 2001)

L'index mitotique au sein de la granulosa chute et on observe un découplage des récepteurs avec les mécanismes intra cellulaires (diminution des jonctions perméables)

Les signes de pycnoses augmentent (atteinte des cellules de cumulus) et les récepteurs hormonaux disparaissent suivi d'un arrêt de la stéroïdogénese

Finalement l'atrésie atteint l'ovocyte et on assiste au comblement de l'antrum.

**6-4/ La Méiose ovocytaire : (cf. figure 02)**

L'ovocyte doit, pour être fécondable réduire son nombre de chromosomes de moitié. C'est la méiose qui permet cette réduction à 1N chromosomes.

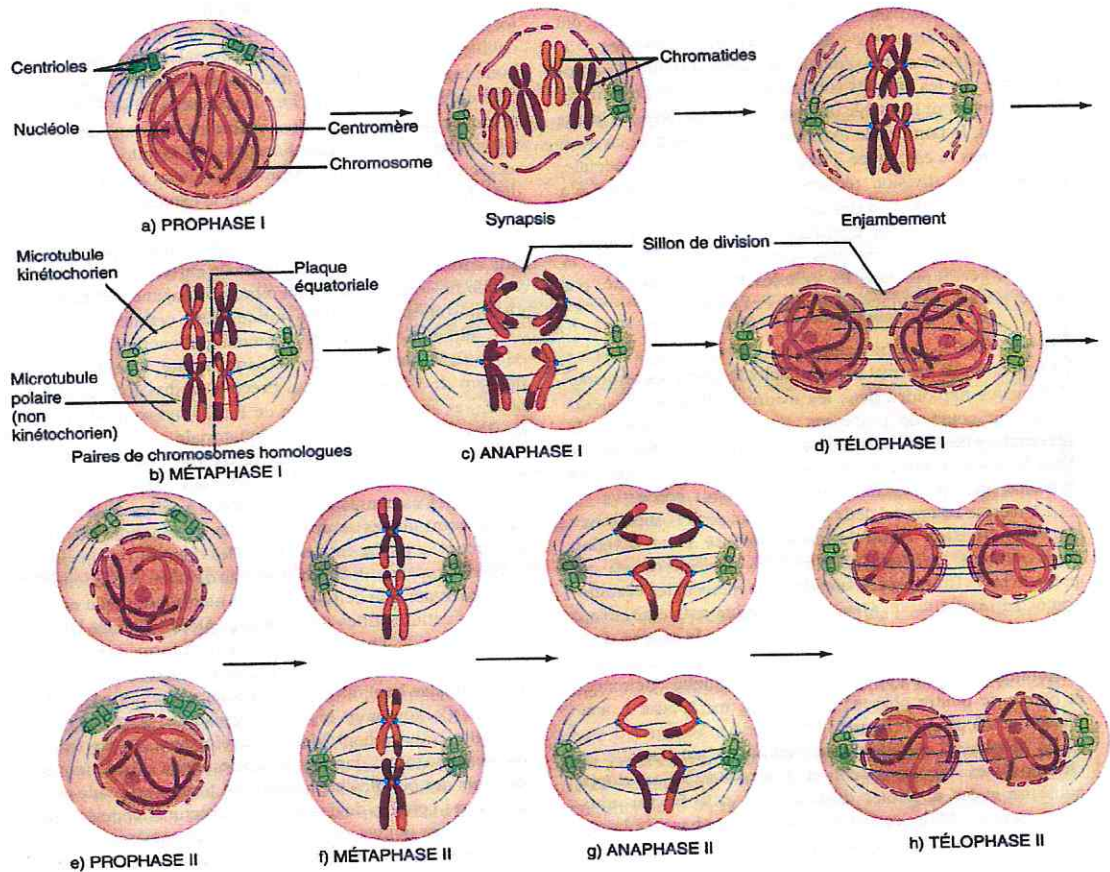
La méiose est constituée de deux divisions nucléaires successives sans réplication des chromosomes entre les divisions. Le résultat est qu'au lieu de deux cellules filles. On en obtient quatre possédant la moitié du bagage génétique maternel. Comme dans la mitose, les chromosomes se répliquent avant la méiose, il existe toutefois une différence au cours de la première prophase méiotique. Elle est plus longue, et un grand nombre de remaniements chromosomiques se produisent.

En effet, une fois répliqués. Les chromosomes s'accolent à leurs chromosomes homologues pour former des tétrades

La première division est dite réductionnelle. C'est la séparation des homologues : le matériel génétique se divise de  $4n$  à  $2n$ .

L'échange de matériel génétique entre gènes homologues ("crossing-over") peut être observé. La division du cytoplasme est toutefois inégale entre les deux cellules filles. Tout le cytoplasme se retrouve dans une des deux cellules fille, le futur ovule, et l'ADN additionnel est expulsé dans un premier globule polaire.

La seconde division est dite équationnelle. C'est la séparation des chromatides sœurs ce qui apporte un nombre haploïde des chromosomes ( $1n$ ) selon (Lodish et al, 2001).



**Figure02** : Représentation schématique des événements chromosomiques de la méiose (Jacqueline Laurent 1999)

## 7. La maturation ovocytaire :

La maturation de l'ovocyte est le point culminant d'un long processus de différenciation qui permet à cette cellule très particulière d'exprimer pleinement son potentiel reproducteur.

Cette maturation comporte une évolution nucléaire, amenant le noyau de l'ovocyte bloqué en prophase méiotique depuis la vie fœtale, à reprendre sa méiose et à la poursuivre jusqu'en métaphase de la seconde division méiotique compatible avec la fécondation.

La maturation implique également des remaniements cytoplasmiques dont certains aspects morphologiques sont connus mais dont les aspects biochimiques restent encore à élucidés. Bien qu'on soupçonne qu'ils jouent un rôle déterminant dans la capacité de l'ovocyte à assurer avec succès la fécondation et le développement du jeune embryon. (Mermillod et al, 2000).

Physiologiquement, ces phénomènes de maturation ont lieu dans le follicule pré ovulatoire, suite à la décharge gonadotrope ovulante, l'ovocyte baigne donc pendant cette période dans un environnement à la fois complexe et changeant.



**7-1/ la maturation nucléaire : (cf. figure 03)**

La maturation nucléaire correspond à la progression du noyau de l'ovocyte du stade GV jusqu'à la métaphase II, un passage qui dure 24h dans l'espèce bovine (Sirard et al 1989) (Wehrend et al 2001)

Le premier signe visible de la reprise de la méiose est le plissement de l'enveloppe de la GV qui pourrait être en rapport avec le début de condensation des chromosomes. Les pores de cette enveloppe disparaissent puis l'enveloppe se fragmente avant de disparaître rapidement on parle alors de germinal vésicale break-down (GVBD) selon (Thibault 2001)

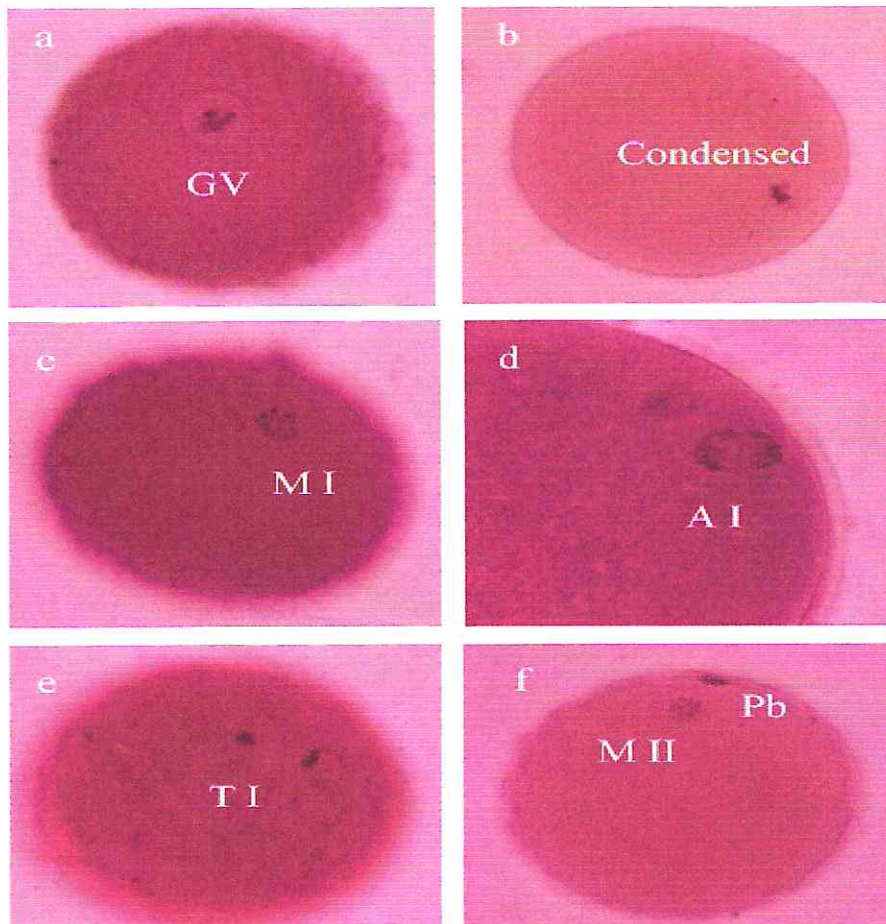
Il y a ensuite condensation des chromosomes, c'est la métaphase I

Les remaniements du cytosquelette permettent enfin la séparation de ces derniers (anaphase I) suivie par la télophase I.

La mise en place de la métaphase prend beaucoup de temps que l'anaphase et la télophase ; il y a élongation des tubules depuis les centrioles puis émission de microtubules des centrioles au kinétochores (assemblage protéique complexe sur le centromère lieu d'ancrage des microtubules aux chromosomes) et en fin la migration de ce cytosquelette (Marchal et al 2001)

La séparation des chromosomes donne lieu à l'expulsion du premier globule polaire contenant la moitié du complément chromosomique.

L'ovocyte se trouve alors de nouveau bloqué mais cette fois en métaphase II jusqu'à l'arrivée du spermatozoïde lors de la fécondation.



**Figure 03 :** Les différents stades de maturation nucléaire des ovocytes Bovin observés après culture in vitro (Sirard et al 1989)

Le temps qui prend le noyau de l'ovocyte entre ces différents stades de développement est représenté selon sirard et al 1989 sur le tableau (01). Le temps zéro représente le début de maturation in vitro :

**Tableau n°1** : les temps de maturation nucléaire des ovocytes bovin (sirard et al 1989)

photo	Stade nucléaire	Temps (h)
a	-germinal vesicle(GV)	0-6.6
	-Germinal vesicle breakdown(GVBD)	6.6-8.0
b	condensed	8.0-10.3
c	Metaphase I (MI)	10.3-15.4
d	Anaphase I (AI)	15.4-16.6
e	Telophase I (TI)	16.6-18.0
f	Metaphase II (MII) et globule polaire	18.0-24

#### ➤ Rôle de l'MPF dans la reprise de la méiose :

La reprise de la méiose est réglée par l'activation du MPF « méiotic promoting factor » responsable d'une série de réactions permettant la condensation de la chromatine et la formation des microtubules (Masui 2001)

Le MPF est une molécule constituée de deux sous unités une catalytique la  $p^{34cdc2}$  et une régulatrice la cycline B elle-même composée de cycline B1 et la cycline B2

La cycline B1 est la seule qui soit essentielle à la reprise de la méiose chez les bovins (Brandies et al 1998).

La régulation de l'activation de l'MPF varie selon les espèces, chez le bovins les ARNm de la  $p^{34cdc2}$  et de la cycline B1 sont présentes en grande quantité dans l'ovocyte en GV (Robert et al 2002) toute fois bien que la  $p^{34CDC2}$  soit présente il ya très peu de cycline B1 dans l'ovocyte en GV d'où l'importance de la traduction lors la maturation

L'injection intra cytoplasmique de la cycline B1 induirait a elle seule la reprise de la méiose (Traverso et al 2005)

En effet il a été montré dans plusieurs espèces que le manque de la compétence meiotique des ovocytes pourrait être du à l'absence ou a la présence limitante de cycline B (selon Hamamah 1999)

Les niveaux de MPF varient au cours de la maturation nucléaires des ovocytes.

Ils sont à bas niveau à l'arrêt meiotique et doivent augmenter pour permettre la reprise de la méiose pour atteindre un premier sommet en MI, redescendre (suite a la dégradation de la cycline) pour permettre la reprise de l'anaphase et remonter vers un second sommet après néosynthèse de cycline et les chromosomes



s'arrangent ensuite en plaque métaphasique MII.

Cette seconde pause en MII requiert la participation de CSF « cytostatique factor » qui favoriserait l'arrêt meiotique et stabilise directement ou indirectement l'activité du MPF (Murray et al 2001) jusqu'à ce que reprenne la méiose suite à la rencontre d'un spermatozoïde

### **7-2/ La maturation cytoplasmique :**

La maturation cytoplasmique regroupe l'ensemble des remaniements ovocytaires qui accompagnent la reprise de la méiose ces remaniements sont aussi bien moléculaire que morphologique et ne sont pour la plus part, bien connus que par leur conséquence sur la capacité de l'ovocyte à être fécondé et à se développer. La migration des granules corticaux est le trait le plus marquant de cette maturation, ces derniers qui avaient une localisation sous corticale diffuse dans le cytoplasme de l'ovocyte immature migrent vers la zone corticale en fin de maturation de celui-ci. La libération de leur contenu enzymatique dans l'espace perivitellin lors de la fécondation provoquera des modifications de structure de la zone pellucide, empêchant ainsi la pénétration de spermatozoïde surnuméraire.

Les appareils de Golgi développés dans l'ovocyte immature diminuent en nombre au cours de la maturation et migrent en région péri nucléaire tandis que le réticulum endoplasmique lisse se regroupe dans la cellule (dissocié des mitochondries et des granules) ces modifications dont la répartition des organites témoignent la chute du métabolisme ovocytaire : l'ovocyte mature est une forme cellulaire moins active. (Hyttel et al 2000)

Quant aux mitochondries ; elles se regroupent autour du noyau avant de se disperser de manière régulière en anaphase I et télophase I (dispersion dépendante des microtubules) (Marchal et al 2001) une activité métabolique continue de ces mitochondries est nécessaire à la maturation cytoplasmique et à la reprise de la méiose (et donc au développement embryonnaire) cette activité peut être évaluée par le dosage cellulaire de l'ATP

Des remaniements du cytosquelette et de la membrane plasmique ont également été décrits : les microvillosités de la surface ovocytaire disparaissent dans la région surplombante le matériel nucléaire et la couche sous corticale uniforme de filament d'actine s'épaissit à cet endroit et s'enrichit de fodrine, une protéine réticulante qui pourrait aider à la stabilisation de ce réseau de filament et donc blocage de l'ovocyte en MII, et l'apparition d'une zone imperméable aux spermatozoïdes ; zone au niveau de laquelle aura lieu l'expulsion du second globule polaire.

facteurs diffusibles vers l'ovocyte en cours de maturation. De plus ce cumulus expansé faciliterait la capture de l'ovocyte par le pavillon et influencerait la fécondation (Hamamah 1999) (passage du spermatozoïde et accès à la zone pellucide) (Marchal.R.2001 et Mermillod et al 1999)

La synthèse de l'acide hyaluronique par les cellules de cumulus est sous la dépendance de la FSH (Salustri et al 1985) la LH agit en levant l'effet des inhibiteurs de FSH déjà présente dans le liquide folliculaire (LF) au moment du pic ovulatoire. Cependant certains facteurs de croissance tels l'EGF et l'IGF-I améliorent cette expansion d'où la nécessité de leurs présences in vitro. Chez la souris cette expansion est favorisée par le CEEF (cumulus expansion enabling factor) non indispensable chez les bovins et les porcins. (Marchal. R, 2001).

### 8. Effet de facteurs de croissance :

D'importantes interactions entre les cellules folliculaires et différents facteurs de croissance, hormones et stéroïdes sont nécessaires pour transmettre à l'ovocyte des éléments qui agissent sur sa maturation. Les facteurs de croissance sont des familles de polypeptides qui jouent un rôle dans les processus de prolifération, différenciation et morphogénèse cellulaires (Heyner et al 1993).

Afin d'entrer et de progresser dans la phase pré-répllicative du cycle cellulaire, toutes les cellules ont besoin de l'action des facteurs de croissance. D'ailleurs, beaucoup de facteurs de croissance sont présents sous formes de transcrits et exprimés dans l'embryon préimplantatoire (Heyner et al, 1993).

Les TGF $\alpha$  et - $\beta$ , IGF-I et -II, et EGF exercent tous un rôle important dans la folliculogénèse.

La famille des IGF (insuline-like growth factor) comprend 02 protéines de structure IGF I et IGF II, 06 protéines de liaison IGFBPS et 02 récepteurs spécifiques aux IGF I et IGF II.

Les deux formes d'IGF, IGF-I et IGF-II ont été mises en évidence dans l'ovaire. IGF-I serait principalement exprimé par les cellules de granulosa, alors que l'IGF-II est exprimé par les cellules de la thèque (Adashi, 1993). Les IGF amplifient l'action des gonadotrophines.

L'insuline est un facteur de croissance important dont il stimule l'aromatase des cellules de la granulosa et potentialise l'effet de la FSH (Hamamah 1999)

In vitro elle augmente comme IGF I la production d'androgène par les cellules de la thèque interne et donc stimule la production d'oestradiol par la granulosa

TGF $\beta$  fait partie d'une superfamille de peptides multifonctionnels incluant l'inhibine, l'activine et la substance Müllérienne inhibitrice (MIS).

Le TGF $\beta$  dont le site de synthèse est les cellules de la thèque (trouée et la ratte les granulosa en produisant) contrôle la prolifération et la différenciation dans plusieurs types cellulaires. Trois formes de TGF $\beta$  existent dans l'ovaire, soient TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3 (Mulheron et Schomberg. 1993).



Le TGF $\alpha$  fait partie de la même famille que l'EGF. Ils possèdent tous deux six cystéines, leurs acides aminés sont analogues à 30%, et ils se lient au même récepteur (Derynck, 1990). Ils sont caractérisés par une grande activité mitogénique leurs actions respectives ont beaucoup été étudiés in vitro.

L'EGF stimule la prolifération de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules de la granulosa (Skinner et al, 1987b). EGF est capable de promouvoir la maturation des ovocytes chez plusieurs espèces (bovin notamment d'après: Sanbuissho et al, 1990) Par son interaction avec les cellules du cumulus. Chez le bovin, EGF et TGF $\alpha$  augmenteraient de façon significative l'expansion du cumulus et les taux de clivage des jeunes embryons, alors que TGF $\beta$  et bFGF n'auraient pas d'effets sur l'expansion, mais diminueraient les taux de clivage.

Il semble donc que ces deux facteurs mitogénique (EGF /TGF $\alpha$ ) soient parmi les premiers à intervenir dans la croissance des follicules. Dont l'EGF favorise la fixation de FSH sur les récepteurs des cellules de la granulosa.

Le bFGF (fibroblast growth factor basique) est un autre facteur de croissance, et il est produit par les granulosa (Neufeld et al.1987) mais son rôle reste a précisé.

# ***CHAPITRE II***

## ***FECONDATION IN VITRO***

## 1. Introduction :

La fécondation in vitro est une technique très importante dans le domaine des biotechnologies de la reproduction puisqu'elle permet une production d'embryon en dehors du tractus génitale à partir d'ovocytes prélevés par ponction écho-guidée (OPU) ou encore, dans la plus part du temps à partir d'ovaires de vaches après abattage.

Ces ovocytes sont ensuite soumis à la maturation puis fécondés in vitro ; les embryons ainsi obtenus sont cultivés pendant 7 jours jusqu'à leur transfert à des vaches receveuses ou leur congélation.

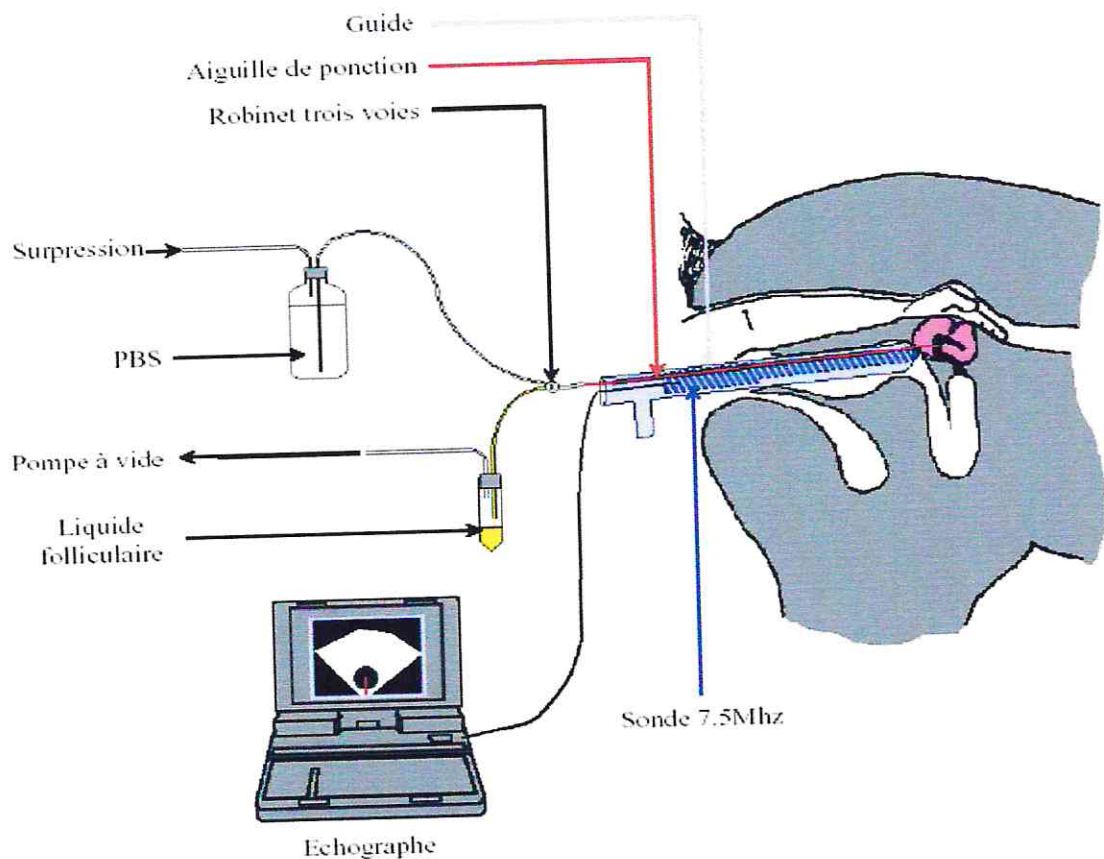
L'étude des techniques de récolte d'ovocytes, de la maturation et de l'induction de la capacitation des spermatozoïdes in vitro dans le but d'une fécondation sont des étapes essentielles qui mènent au développement des biotechnologies de la reproduction permettant ainsi l'installation d'un programme de MIV/FIV/PIV en Algérie.

## 2. les techniques de récolte d'ovocytes :

### 2.1/ In vivo par la technique OPU : (cf. figure 04)

Pour la réalisation de la plupart des études, le contenu des follicules (liquide, cellules de la granulosa, complexe ovocyte cumulus) est collecté in vivo par ponction folliculaire transvaginale sous contrôle échographique. Cette technique, adaptée de celle utilisée en médecine humaine, a été mise en place en 1993 à l'INRA de Nouzilly ; son utilisation est facilitée chez la vache par la présence d'une tunique albuginée épaisse autour de l'ovaire et par la grande taille des follicules ovariens. Cette méthodologie permet :

- 1- d'individualiser, et donc de caractériser chaque follicule,
- 2- d'associer les caractéristiques d'un follicule à celles de l'ovocyte qu'il contient, voire même
- 3- d'étudier l'effet in vivo d'un facteur donné par injection intra folliculaire.



**Figure 04** : Schéma de la ponction folliculaire transvaginale sous échographie. (Martoriati, A. 2002)



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/100kg) (domosedan RD)

Ou la xylasine (rompun RD)

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 4mg/100kg d'hyoscine-N-butylbromide (buscopan RD).

Les matières fécales sont évacuées de 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 cervicale au moyen d'un guide métallique. L'ovaire manipulé par voie transrectale et amener sur l'extrémité de la sonde échographique. Les follicules présents sur l'ovaire apparaissent sur l'écran de l'échographe sous la forme de zone noir anéchogène. Le déplacement de l'ovaire et/ou de la sonde permet d'ajuster la position du follicule à ponctionner sur le trajet de l'aiguille de ponction identifiée par une ligne sur l'écran de l'échographe. L'aiguille est poussée vers l'avant de manière à traverser successivement la paroi vaginale puis celle du follicule

Une fois le follicule est ponctionné le liquide folliculaire est aspiré et la zone anéchogène disparaît suite à la vidange du follicule.

Après la ponction, le contenu de chaque tube de récolte est maintenu à une température de 35 à 38°C. Il est filtré et examiné pour isoler et mettre en maturation les ovocytes récupérés (Hanzen 2004).

## **2.2/ In vitro à partir d'ovaires d'abattoir :**

La collecte d'ovocytes à partir d'ovaires isolés d'abattoir est la méthode la moins onéreuse. Cette technique a ainsi permis la mise au point des techniques MIV/FIV/DIV.

Selon les équipes ; Les ovaires de vaches dans leurs différents stades de cycle de reproduction sont collectés à l'abattoir puis transporté au laboratoire dans une solution saline à une température comprise entre 30 et 35°C. La solution saline représentée par le NaCl 0.9% supplémentée de 100.000UI de pénicilline, 100mg de streptomycine et 250ug d'amphotericine B 250ug/l.

Le contenu des follicules de 1 à 5 mm est aspiré au moyen de seringue de 10ml à 18-gauge needle. Le contenu sera versé dans des tubes de 50ml. Après sédimentation, le COCS sera prélevé par utilisation d'un stereomicroscope (Blodin et sirard 1995).

Le professeur Christian Hanzen en 2004 décrit une méthode simple et pratique de récolte d'ovocyte à partir d'ovaires de vaches au niveau des abattoirs.



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

Au laboratoire les COCs sont ponctionnés sur les follicules antraux visibles à l'œil nu à l'aide d'une aiguille 18G reliée à une seringue de 5-10ml ou à une pompe à vide

Le prélèvement des ovocytes par aspiration du liquide folliculaire au moyen de l'aiguille est une des méthodes les plus anciennes. P.Guerin et al en 1996 trouvent que cette technique permet de récolter en moyenne 6 ovocytes par ovaire est une personne peut ponctionner une centaine d'ovaires en moins de 2 heures.

La dissection préalable des ovaires à l'aide d'une lame de scalpel dans un milieu de culture et après lavage des fragments obtenus permet l'obtention de 16 à 17 ovocytes par ovaire. Cette seconde méthode offre l'avantage d'augmenter le pourcentage d'ovocytes morphologiquement normaux (60 à 63% vers 31 à 80%) conséquence possible du fait que la dissection permet de mieux identifier les follicules non atrétiques. Elle est cependant plus lente que la première.

La découpe de l'ovaire en tranche (slicing ovary) offre pour avantage d'augmenter le nombre d'ovocytes récupérés (20 à 55 par ovaire).

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

### **3. Jugement et sélection des ovocytes :**

La ponction des follicules a permis de récolter des ovocytes entourés de cellules péri ovocytaires (cumulus oophorus) dans un tampon type PBS ou un milieu de culture comme le milieu TCM199 avec des agents protecteurs (antibiotiques voire antimycosiques).

La sélection des ovocytes repose essentiellement sur des critères morphologiques (microscope inversé) ou ultra structurels (microscope électronique) des complexes COCs. Les ovocytes bovins immatures peuvent être repartis en quatre catégories ou classe selon le degré de compacité des cellules de cumulus et de la transparence de l'ooplasme. Il semble évident que les différences éventuellement identifiées lors de l'examen peuvent être attribués à des stades divers de maturation, celle-ci s'accompagne d'importantes modifications de surface et donc de contacte entre l'ovocyte et les cellules de cumulus. (cf. tableau 02 et 03)

Les COCs utilisés en PIV sont les COCs de qualité 1 ou 2, c'est-à-dire entourés d'un cumulus compacte (composé de plusieurs couches de cellules couvrant au moins les  $\frac{3}{4}$  de la zone pellucide) et ayant un cytoplasme dense. (cf. figure 05)

Plusieurs études ont montré que la compétence au développement (relation non valable pour la compétence meiotique) est proportionnelle à la qualité des COCs avec des taux de développement significative entre les COCs de classe 1 et 2,

acceptables, et ceux de classe 3, et 4 non acceptables (Cetica et al, 1999 ; Mayes MA et al 2001 ; De Witt AA et al 2001)

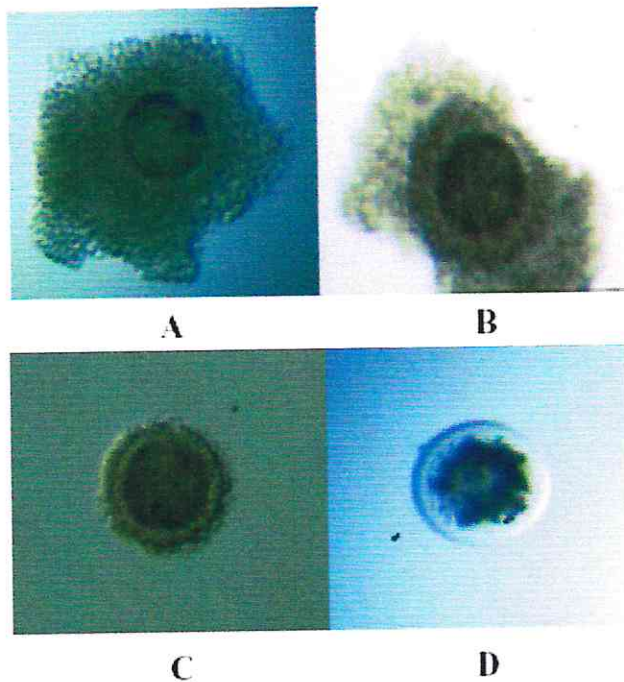
**Tableau 02** : classification des complexes ovocytes cumulus en MIV selon (Stojkovic et al 2001)

Classe ou catégorie	Aspect de cumulus oophorus	Aspect du cytoplasme
<b>A ou classe 1</b>	Cumulus compacte et formé de multicouche	Cytoplasme homogène Brillant et poli
<b>B ou classe 2</b>	Cumulus compact et avec au moins 5 couches cellulaires	Le cytoplasme ovocytaire comprenant des zones non homogènes
<b>C ou classe 3</b>	Cumulus avec 3 a 5 couches cellulaires laissant des petites zones de zone pellucide dénudée	Cytoplasme hétérogène, vacuolisé
<b>D ou classe 4</b>	Ovocyte quasiment dénudé	Cytoplasme ovocytaire dénudé

**Tableau 03** : classification des complexes ovocytes cumulus en MIV selon (Hanzen 2004)

Classe ou catégorie	Aspect de cumulus oophorus	Aspect de l'ooplasme
<b>classe 1</b>	Transparent Compacte et entoure complètement l'ovocyte	Homogène
<b>classe 2</b>	Transparent Compacte et entoure complètement l'ovocyte	Irrégulier Une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie
<b>classe 3</b>	Sombre et compacte	Plus irrégulier et présence des amas plus sombre
<b>classe 4</b>	Cumulus est complètement expansé voir absent (ovocyte nu ou naked oocyte)	





**Figure 05 :** différent types d'ovocytes récoltés par ponction folliculaire transvaginale (De Loos et al, 1989).

Une fois la sélection des COCs est effectuée ces derniers sont mis à la maturation in vitro dans des milieux spéciaux et sous conditions environnante proche de celle du tractus génitale de la vache.

#### 4. maturation ovocytaire in vitro (MIV) :

La maturation ovocytaire in vitro (MIV) est un processus impliquant la culture in vitro de l'ovocyte, lui permettant d'atteindre une complète maturation nucléaire et cytoplasmique essentielle à la fécondation et à la production d'embryons viables. (Badinand et al, 2000).

La réussite de la MIV dépend de plusieurs facteurs, dont un des plus importants est la technique de maturation, et en particulier la composition du milieu de culture utilisé.

##### 4.1/ Principes généraux

Les conditions dans lesquelles sont pratiquées les différentes étapes du processus de maturation et donc de production sont des facteurs essentiels qui, s'ils ne sont pas respectés, peuvent apporter une grande variabilité dans les résultats :

##### a- La stérilité :

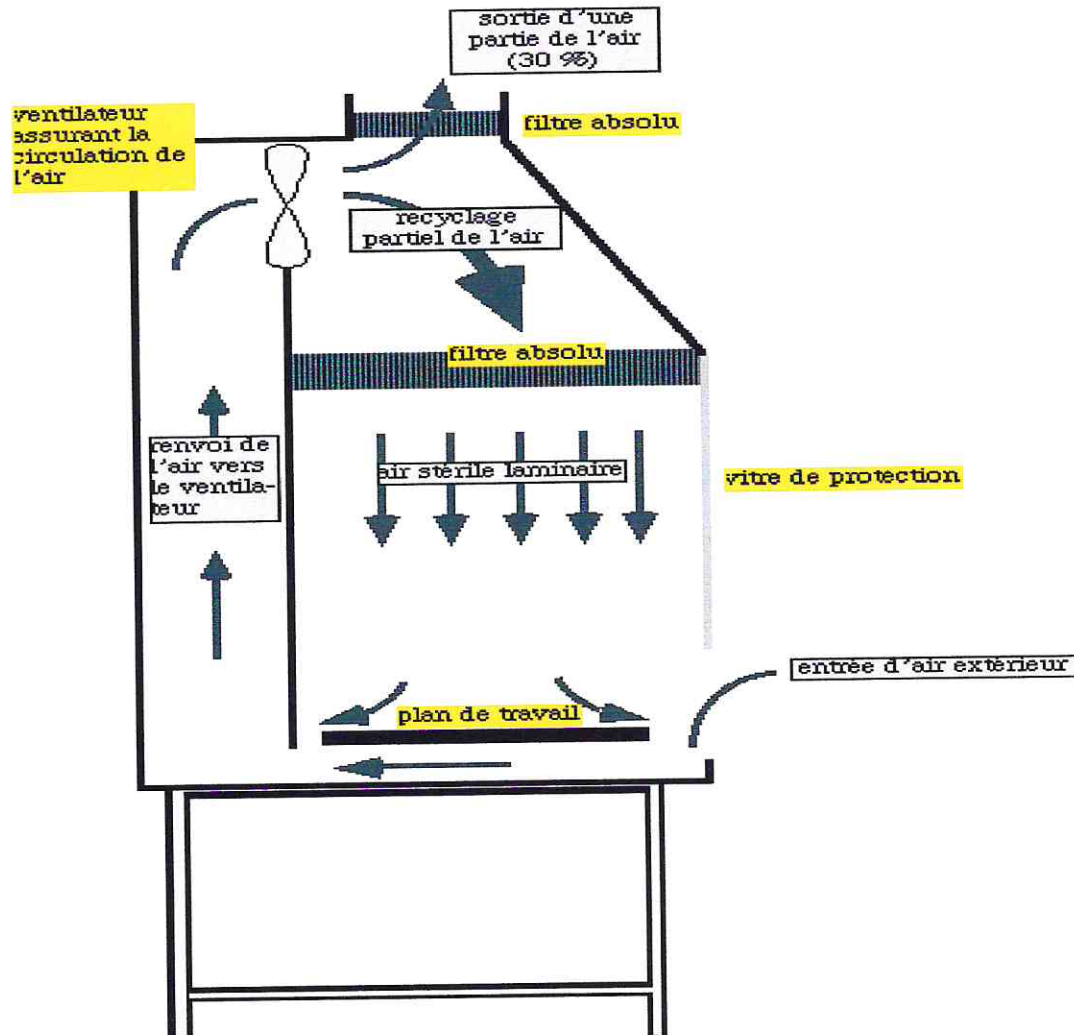
Elle est assurée par l'espace, se trouvant sous la hotte à flux laminaire (cf. figure06). L'air y est constamment filtré par des filtres absolus, assurant l'arrêt de toute particule de plus de 0,3  $\mu\text{m}$  de taille. L'air filtré est donc débarrassé de toute particule ou poussière, y compris bactérienne, son mouvement est assuré par un



puissant ventilateur, qui permet d'établir un flux laminaire d'air stérile sur le plan de travail.

Elle vise trois objectifs :

- Protéger les produits à préparer de toute contamination bactérienne ;
- Protéger le manipulateur ;
- Protéger l'environnement. (Aspar et al. 2003)



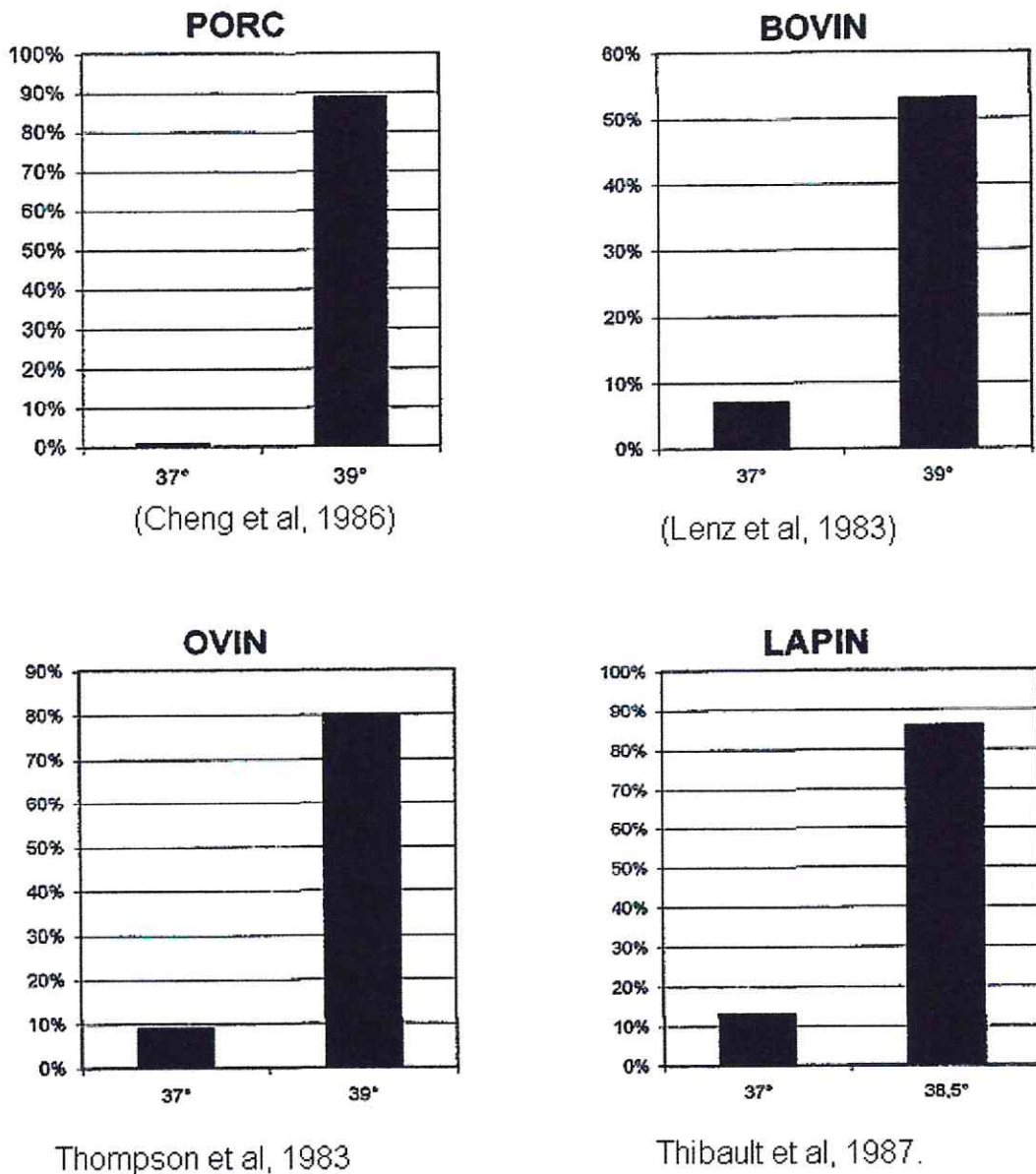
**Figure 06** : Schéma représentant le Principe général de fonctionnement d'une hotte à flux laminaire. (Schuster, 2001)

### b- Température

Qu'il s'agisse de maturation ovocytaire in vitro, de fécondation in vitro ou de culture embryonnaire, il est impératif de calquer la température centrale de l'espèce étudiée, et non pas systématiquement à 37°C, comme on l'a longtemps pensé; celle-ci sera donc de 37° C chez la femme et la souris, tandis qu'elle sera comprise entre

38,5° C et 39° C chez la vache. Toute fluctuation thermique sera donc néfaste. (Porret 2004, Bruyère 2002).

Pour étudier l'impact des températures utilisées en production in vitro. Des expérimentations ont été réalisées chez différentes espèces, et les conclusions ont été que la maturation dans des conditions variant de 35 à 39°C n'était pas affectée, mais que la fécondation était une étape plus sensible, et qu'elle était optimale à 39°C. (cf. figure 07)



**Figure 07 :** Histogramme montrant l'influence de la température de culture sur le taux de fécondation in vitro chez quatre espèces. (Crozet 1993)

Pour éviter les chutes brutales de température, il est utile d'avoir recours à une plaque chauffante à chaque étape de la manipulation, la température d'incubation étant régulée par une étuve à CO<sub>2</sub>.

### c- Le pH :

Le pH du milieu doit être à 7,2. Il est régulé grâce au bicarbonate en équilibre avec le CO<sub>2</sub> dissous dans le milieu, lui-même en équilibre avec le CO<sub>2</sub> de l'atmosphère.

Le rouge phénol est un bon indicateur de pH pour le milieu : son absence de toxicité est établie depuis 30 ans (il est aussi utilisé pour détecter une éventuelle contamination bactérienne).

Sa couleur est :

- **Rouge** : entre 6,8 et 8,4.
- **Jaune** : sous le pH de 6,8.
- **Violet** : au dessus de 8,4.

Si le milieu est laissé à l'air libre trop longtemps (l'air contient moins de 1% de CO<sub>2</sub>), le milieu se décharge en CO<sub>2</sub> et s'alcalinise par décomposition des bicarbonates : le milieu devient alors violet.

Quand le milieu prend une couleur jaune, c'est au contraire qu'il s'acidifie : ce phénomène peut être dû à une contamination microbienne.

Le rouge de phénol est ainsi un précieux indicateur du pH, d'autant plus qu'il a l'énorme avantage d'arrêter partiellement les rayons UV.

Généralement, on introduit 2mg/L de rouge de phénol dans le milieu de culture.

L'ion bicarbonate est un tampon relativement peu puissant, (parfois appelé « pseudo-tampon »), il est cependant utilisé dans les milieux de culture pour sa sensibilité aux variations, ce qui permet de mieux suivre les conditions de culture et de s'apercevoir plus précocement d'une anomalie (contamination...) (Porret, 2004)

### d- L'osmolarité :

Il est primordial de veiller à ce que l'osmolarité soit comprise entre 275 et 285 mosmoles par kg d'eau. (Bruyère 2002)

Elle dépend de deux facteurs essentiels :

#### A l'extérieur de l'étuve :

Elle dépend du type de culture :

- Soit avec un volume de milieu de culture suffisant pour minimiser les effets de l'évaporation ;
- Soit sous huile, ce qui permet d'utiliser des petits volumes de milieux de culture.

#### A l'intérieur de l'étuve :

Elle dépend de son degré d'hygrométrie, assuré par une réserve d'eau stérile.



#### 4.2/ Milieu de culture :

La plupart des milieux de culture cellulaires sont aptes à assurer la maturation ovocytaire in vitro.

Le choix de milieu de base diffère selon les espèces : on emploie fréquemment le MEM chez la chienne, tandis qu'on aura le plus souvent recours au TCM199 chez la vache, (Bruyère 2002)

Ils peuvent être divisés en deux catégories principales, soient les milieux simples et les milieux complexes. Dans le premier cas, ce sont des milieux tamponnés au bicarbonate qui contiennent un salin physiologique, du pyruvate, du glucose et du lactate. Les principales différences entre les milieux simples se situent au niveau de leur concentration en ions et en source d'énergie. Du sérum ou de l'albumine sont ajoutés ainsi que de faibles concentrations d'antibiotiques selon les besoins.

Les milieux complexes contiennent en plus des composantes de base des milieux simples, des vitamines, des acides aminés, des purines, et d'autres molécules selon les besoins cellulaires. (Selon Gordon, 1994).

Pour le processus de maturation, fécondation et développement in vitro, des milieux de culture différents sont utilisés. Des expériences ont déjà été menées pour vérifier la possibilité d'utiliser un seul milieu tout au long du processus. Soit le F-10 (Waterman et al 1991).

Le milieu de culture le plus utilisé est le TCM-199, un milieu de culture complexe, parce qu'on ne connaît pas les concentrations exactes de ses composantes. Il est dans la plupart du temps utilisé en association avec le sérum de veau foétale (SVF) pour les étapes de maturation et de développement (Sirard et al. 1988).

Qu'un milieu soit simple ou complexe, il est essentiel de travailler dans un milieu où les constituants sont définis selon les besoins des cellules cultivées (Gordon, 1994).

Il faut être conscient de l'effet potentiel de chacun des constituants des milieux qui peuvent contrecarrer les effets de facteurs ajoutés à ces mêmes milieux.

Par exemple, le TCM-199 et le Ham's F-10 contiennent de l'hypoxanthine, laquelle est responsable de l'arrêt méiotique des ovocytes de souris (Eppig et al 1985). Un de ces milieux peut donc être employé pour éventuellement inhiber ou retarder la reprise de la méiose dans cette espèce. La plupart des laboratoires se servent de sérum bovin dans leurs protocoles de développement. Les composantes du sérum ne pouvant pas être définies avec justesse, elles apportent une certaine imprécision quant à leur nature et à leur concentration (Bavister, 1995). En raison de cet inconvénient, des milieux chimiquement définis sont de plus en plus développés (Bavister et al 1992; Rose et Bavister, 1992; Lonergan et al 1994b; Shamsuddin et al 1994; Eckert et Niemann, 1995).

Récemment, (Sirard et Coenen, 1993b) ont préparé un milieu basé sur des constituants du liquide folliculaire. Ce fluide folliculaire synthétique a servi à évaluer l'effet de différents produits sur la reprise de la méiose. Le fluide d'oviducte synthétique (SOF) est aussi capable de supporter la maturation des ovocytes de



bovin, mais les taux de blastocystes observés sont inférieurs à ce qui est obtenu avec les milieux contenant du sérum (Lonergan et al. 1994b).

Le HECM, un milieu utilisé à l'origine pour le développement embryonnaire chez le hamster (McKieman et al, 1991; Pinyopummintr et Bavister, 1991), est maintenant employé chez le bovin (Pinyopummintr et Bavister. 1996). Dans ce dernier cas, la version modifiée HECM-3 est celle qui est utilisée (McKieman et al, 1995). Sa composition se résume, en plus des sels de base habituels, à 10 acides aminés, de la glutamine, de l'insuline, de la transferrine et du sélénium à des concentrations bien définies.

Ces derniers doivent être préparés au moyen d'une eau ultra pure, distillée, désionisée et débarrassée de ses germes et éléments pyrogènes (Système Millipore).

Leur pH doit être ajusté à 7,4 et leur pression osmotique sera comprise entre 280 et 300 mosmole/kg d'eau. (Bruyère 2002, Hanzen 2004).

N'étant pas spécifiques à la culture des ovocytes, ces milieux doivent être supplémentés avec divers éléments, et ce, dans le but de mimer au mieux les conditions de maturation in vivo.

#### **a- Protéines :**

Afin de déterminer avec certitude les besoins réels des ovocytes subissant une maturation in vitro, tous les produits dont la composition exacte n'est pas définie, devraient être éliminés du milieu de culture. (Atef et al 2002).

Le sérum de veau fœtal ou SVF en est un parfait exemple, car il est à lui seul un milieu très complexe, dont la composition n'est pas maîtrisée (Bruyère 2002), il a cependant été démontré que le SVF était nécessaire à l'expansion du cumulus, et qu'il améliorait la viabilité de ses cellules ainsi que l'accomplissement de la première division méiotique. (Leibfried-Rutledge et al 1986).

Le rôle de du (bovine serum albumine) BSA lors de la culture reste ambigu (Atef et al 2002), Il existe plusieurs fonctions connues de l'albumine dans le milieu de culture : elle constitue un chélateur pour les métaux lourds et contribue au tamponnement du pH, ce qui peut également être réalisé par l'inclusion des acides aminés dans le milieu de culture (Metha, Kiessling 1990). La propriété surfactante de l'albumine prévient l'adhésion des cellules aux surfaces en verre et en plastique, mais cet effet peut être assuré par les polymères synthétiques tels que le PVA (Bavister 1981) (Pinyopummintr, Bavister 1991).

Un autre type de sérum peut également être utilisé, il s'agit de sérum de vache en oestrus ECS. Une étude a testé l'influence du type de sérum, en fonction du moment de la récolte (au début de l'oestrus, au moment de l'ovulation et 24h après l'ovulation), sur la maturation in vitro ; il a été démontré que l'effet de l'ECS sur MIV était indépendant du type de sérum. Cependant, il semblerait que le sérum obtenu en début d'oestrus ait un effet bénéfique sur le taux de fécondation.

D'une manière générale, l'ECS a pour effet de minimiser l'apoptose blastocystaire. (Boelhauve et al 2005).

Etant vecteurs possibles de prions, les sérums et protéines d'origine animale devraient disparaître des milieux de PIV. (Mizushima et Fukui 2000) et (Geshi et al 2000) ont utilisé un milieu chimiquement défini en remplaçant le sérum par un polyvinyle alcool (PVA), donnant des résultats similaires à ceux habituellement obtenus.

#### **b- Hormones :**

Généralement, les complexes cumulus-ovocytes (COCs) sont collectés à partir d'ovaires d'abattoir non stimulés. Ces follicules peuvent ne pas avoir été suffisamment exposés aux hormones et aux facteurs de croissance in vivo, pour pouvoir bien se développer in vitro.

Bien que 80% des ovocytes collectés au stade de follicule antral, subissent une maturation nucléaire spontanée en culture (Sirard et al 1988), les gonadotrophines sont souvent ajoutés au milieu de culture afin d'induire la maturation cytoplasmique, l'expansion du cumulus et améliorent le développement embryonnaire. (Calder et al 2003).

La FSH induit l'expansion du complexe cumulus ovocyte in vitro chez la souris (Eppig 1979) et améliore le taux de clivage et de fécondation chez la vache (Izadyar et al 1998). Mais elle ralentit la reprise de la méiose en allongeant la durée de condensation des chromosomes. (Bruyère 2002)

La LH a des effets bénéfiques sur la maturation ovocytaire bovine (Zuelke, Brackett 1990), elle augmente le métabolisme du glucose dans les COCs mais diminue les taux d'expulsion du globule polaire, de clivage et de blastocystes à fortes concentrations. (Bruyère 2002)

Dans la plupart des cas, des concentrations hormonales supra physiologiques sont ajoutés au milieu de maturation in vitro mais il n'a pas été clairement démontré que ces hautes concentrations étaient requises.

Depuis peu des gonadotrophines recombinantes sont disponibles sur le marché, il s'agit d'hormones pures qui peuvent permettre des investigations sur les rôles individuels sans réactions croisées. (Calder et al 2003).

L'utilisation de l'œstradiol est controversée, la concentration la plus utilisée est de 1 µg/ml, ce qui correspond approximativement à la concentration présente dans le liquide folliculaire dans le follicule pré ovulatoire juste après le pic de LH. Une étude a démontré que le pourcentage des aberrations nucléaires augmentait considérablement lors d'utilisation d'œstradiol, et bien que cet effet soit estompé par la FSH, il est fortement conseillé de s'abstenir d'utiliser l'E2 dans les protocoles de MIV de routine. (Beker et al 2002)



### c- Facteurs de croissance :

L'addition d'hormone de croissance à la concentration de 100 ng/ml augmente significativement le taux d'obtention de blastocyste chez la vache (Izadyar et al 2000).

L'EGF a une action synergique avec les gonadotrophines, à condition que leur concentration globale reste faible (à cause d'interactions sur les récepteurs) c'est-à-dire, autour de 500 ng/ml (Harper, Brackett 1993). Il est le facteur de croissance à retenir dans la supplémentation des milieux de MIV ; des récepteurs et de nombreux sites de liaison sont présents dans l'ovaire de vache (thèque, granulosa, corps jaune), molécules dont la synthèse est stimulée par les gonadotrophines (Sakagushi et al 2000).

### 4-3/ Méthodes de culture :

Les Co-cultures sur cellules folliculaires (cellules de la granulosa) ont été développées et sont largement utilisées chez les ruminants et le porc. De nombreuses études ont montré l'effet positif de la présence de cellules du cumulus : les COCs sont plus aptes à maturer in vitro que les ovocytes dénudés. (Bruyère 2002).

Il existe, dans les protocoles de culture cellulaire, deux grands groupes de méthodes, toutes deux applicables aux ovocytes :

- Les méthodes de culture « stationnaire », ou en monocouche ;
- Les méthodes de culture en suspension.

#### ➤ Méthodes de culture stationnaire :

Le principe général de ces méthodes est lié à l'affinité des cellules pour un support. Par conséquent, si on introduit dans un récipient de culture un certain nombre de cellules, celles-ci vont adhérer à la surface et s'y développer. La nature du support est donc très importante.

Dans la culture stationnaire, on distingue plusieurs systèmes : les systèmes clos, semi-clos et ouverts.

Le système semi-clos est le mieux adapté à la culture des ovocytes, puisqu'il permet une meilleure régulation de l'environnement gazeux et du pH, surtout dans les premières heures de la culture, particulièrement lorsque le système tampon utilisé est le HCO<sub>3</sub>Na. (Adolphe, M et Barlovatz - Meinson.G 1987).

#### ➤ Méthodes de culture en suspension :

La culture en suspension est surtout utilisée pour la culture « en masse ». En effet, la culture en suspension permet l'obtention d'une plus grande quantité de cellules que la culture stationnaire.

Il semblerait que le système optimum soit le système en suspension, chez les bovins (taux de blastocystes maximum). (Nagai 2001)

L'osmolarité doit être contrôlée. En effet, à partir de 315 mosmoles/kg d'eau, il y a mort des ovocytes bovins. (Guyader 1998)

Elle est régulée par la quantité de milieu utilisée, ainsi on distingue deux types de culture :

- La culture en puits ;
- La culture en microgouttes.

❖ **La culture en puits :**

Le volume de milieu varie selon les équipes, entre 0,5 et 1 ml par puits. Cette technique permet de réaliser des cultures en masse (plusieurs dizaines d'ovocytes par puits) (Bruyère 2002), on parle d'effet de groupe, car en effet, l'absence d'interactions ovocytaires pénaliserait la maturation cytoplasmique des ovocytes (Fukui et al 2000).

❖ **La culture en microgouttes :**

On dispose généralement 8 à 10 gouttes de milieu par boîte, d'un volume de 10 µl par goutte. (Frydman et al 2004). Le nombre d'ovocyte mis en culture est d'un par goutte. La culture se fait sous huile afin d'empêcher l'évaporation du milieu. Cette méthode est plus économique que la précédente du fait du faible volume de milieu utilisé, mais semble déficiente du fait de l'absence d'effet de groupe.

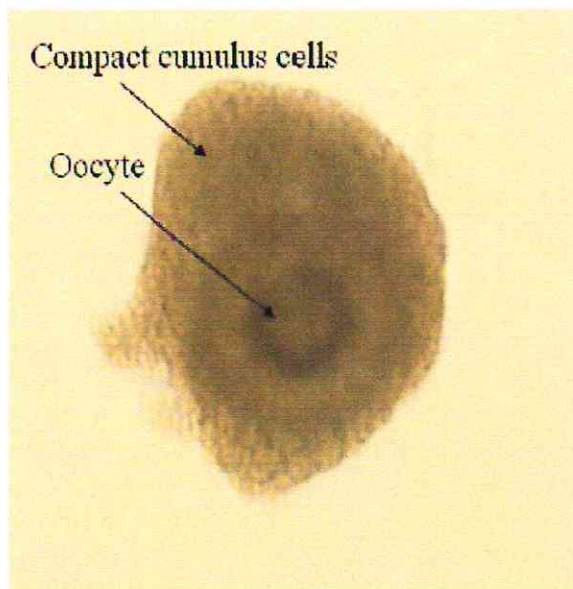
**4-4/ Evaluation de la maturation ovocytaire :**

In vitro, l'ovocyte placé dans des conditions optimales et donc soustrait à l'influence inhibitrice du milieu folliculaire et de l'OMI (Oocyte Maturation Inhibiting factor) en particulier, reprend spontanément sa division méiotique. L'expulsion du 1<sup>er</sup> globule polaire signe la fin de la maturation. (Hanzen 2004)

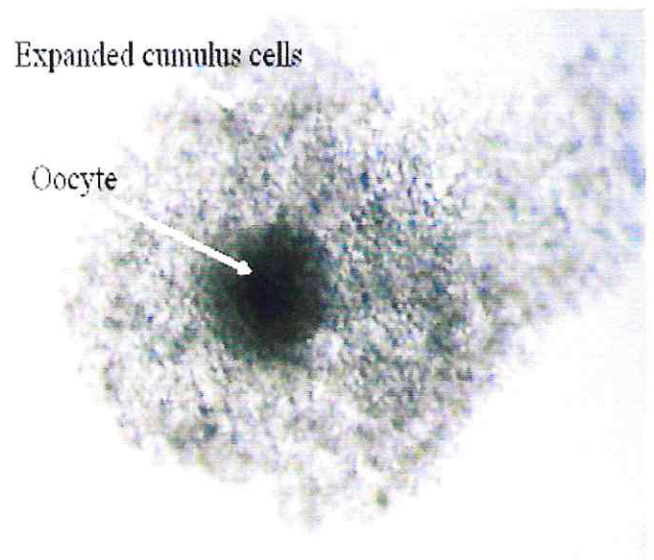
La morphologie du cumulus et le stade nucléaire de l'ovocyte sont les critères d'évaluation de l'état de maturité du COCs. Ces paramètres ont été systématiquement étudiés quelle que soit l'origine du COCs : collecté par ponction in vivo ou par ponction d'ovaires provenant de l'abattoir, analysé directement après la collecte ou après culture in vitro, ces COCs sont toujours analysés individuellement. L'évaluation de la maturation ovocytaire se fait donc sur la base de trois critères :

- L'expansion du cumulus ;(cf. figure 09 et 10)





**Figure 09 :** Complexe cumulus ovocyte bovin avec compactes couches de cumulus avant maturation. (Sirard et al 1989)



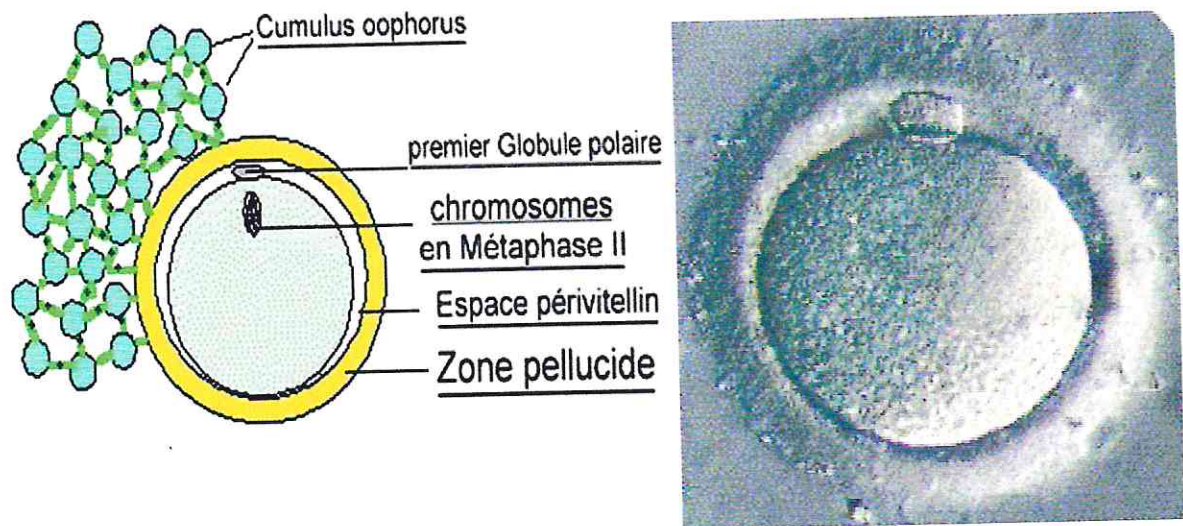
**Figure 10 :** Complexe cumulus ovocyte bovin avec cumulus expansé après 24h de maturation. (Sirard et al 1989)

- La présence d'un globule polaire dans l'espace périvitellin ;(cf. figure 11)
- Le noyau ovocytaire doit être en métaphase II.

L'absence de globule polaire n'implique pas nécessairement l'absence de maturation nucléaire, on peut ainsi observer la migration des vésicules, mitochondries et des gouttelettes lipidiques au sein de l'ovocyte, donnant a ce dernier un aspect condense. Il est cependant difficile de conclure à la maturation de l'ovocyte sur son seul examen morphologique. Un complément d'information sera obtenu après coloration à base de solution tyrode et de fuschine.

Le critère définitif sera néanmoins le développement de l'ovocyte fécondé jusqu'au stade blastocyste. (Hanzen, 2004)





**Figure 11** : Schéma et photo d'ovocyte après maturation. (Coloré au DAPI). (Crozet, 1993)

## 5. Fécondation in vitro :

### 5-1/ Capacitation des spermatozoïdes et fécondation in vitro :

Les spermatozoïdes de mammifères sont incapables de féconder l'ovule tant qu'ils n'ont pas subi un processus appelé capacitation.

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

In vivo, la capacitation a lieu uniquement dans l'utérus et dans les trompes. (Thibault 2001).

C'est essentiellement par l'enlèvement des protéines déposées sur la membrane du spermatozoïde dans l'épididyme et/ou apportées par les glandes annexes et l'enlèvement d'une partie du cholestérol intercalé entre les phospholipides membranaires, que le spermatozoïde devient capacité. (Hamamah 1999).

En résumé, le spermatozoïde passe par trois étapes pour devenir fécondant :

- Enlèvement des protéines de revêtement,
- Enlèvement d'une partie du cholestérol libre,
- Remaniement des chaînes saccharidiques.

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

La durée importante de la capacitation chez les bovins, nécessite de maintenir les spermatozoïdes dans des conditions de culture qui permettent leur survie et leur



mobilité. C'est pourquoi cette étape est souvent réalisée dans le milieu de FIV. (Guerin et al 1996)

La méthode la plus employée (et la moins traumatique) est la nage ascendante. (Bruyère 2002). Elle consiste à déposer sur un milieu tampon (ou un milieu de culture) sur un culot de spermatozoïdes obtenu après centrifugation, puis à récupérer, après incubation de 60 minutes à 38,5°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, la partie supérieure (contenant les spermatozoïdes mobiles), les cellules mortes et immobiles restent dans le culot. (Sakagushi et al 2000)

La capacitation est initiée pendant le *swim-up*, consistant en des modifications métaboliques, de mobilité, de concentrations ioniques intracellulaires, de fluidité membranaire et en des réorganisations des protéines de surface. Sa durée est de 4 à 6 heures chez les bovins (Guérin et al 1996). Elle permettra l'induction de la réaction acrosomique par élimination de composés de surface (séminaux ou testiculaires), déstabilisation de la membrane plasmique et augmentation de la perméabilité aux ions calcium, et ainsi la pénétration du spermatozoïde dans la zone pellucide (Marchal 2001).

Elle se poursuivra pendant l'incubation en présence des ovocytes maturés. C'est pourquoi, des facteurs capacitants (épinéphrine, agents chélateurs) sont incorporés aux milieux de FIV par la plupart des équipes. Ainsi, chez les bovins (et non chez tous les ruminants), l'héparine est un facteur capacitant (Parrish *et al* 1988) qui est ajouté au milieu de fécondation.

### **5-2/ Fécondation proprement dite :**

Comme pour la MIV, les techniques de FIV ont fait l'objet de nombreuses variantes concernant le milieu de culture, le nombre de cellules co-incubées, la durée de co-incubation...

Divers milieux de culture ont été utilisés. Les milieux les plus employés sont le milieu 199, le TALP (Tyrode albumine lactate pyruvate), et le Krebs Ringer bicarbonate. (Guerin et al 1996), avec un pH de 7,4 et une pression osmotique comprise entre 280 et 300 mOs (Guerin et al 1996).

On incorpore à ce milieu de l'hypotaurine (Guerin et al 1995), de la pénicillamine et de l'épinéphrine (Bruyère 2002)

La fécondation est réalisée dans une goutte de 50 à 100 microlitres de milieu sous huile de paraffine ou minérale pour éviter toute évaporation. Chaque goutte renferme une vingtaine d'ovocytes et environ 100.000 spermatozoïdes (2 millions/ml) L'incubation dure 18h à 39°C dans une atmosphère d'air renfermant 5% de CO<sub>2</sub>. L'atmosphère sera également saturée d'humidité pour éviter toute évaporation du milieu. Une augmentation du temps d'incubation est un facteur de risque de polyspermie.

Chez les ruminants, 80 à 85% des ovocytes maturés et fécondés in vitro se clivent et 30 à 40% forment des blastocystes, qui transplantés dans des femelles

receveuses conduisent en moyenne à 50% de mise bas. La tendance est à l'utilisation de milieux entièrement synthétiques, sans apport de sérum. (Hasler 2000)

## 6. La culture des embryons :

Le développement embryonnaire est le reflet de l'état de différenciation ovocytaire et de la qualité des étapes de maturation, de fécondation et des conditions de culture embryonnaire (Marchal 2001)

La culture des embryons est une étape cruciale de la production d'embryons. Chez les mammifères domestiques, c'est au stade blastocyste que l'embryon est transférable dans l'utérus de la femelle porteuse. La culture jusqu'à ce stade embryonnaire est donc indispensable. (Bruyère 2002)

### ➤ La culture de l'embryon in vivo :

Pendant longtemps, le seul moyen d'assurer le développement embryonnaire avant la mise en place dans l'utérus d'une receveuse, était la « culture in vivo », dans l'oviducte d'un hôte intermédiaire. (Eyestone 1987).

Il s'agit de transférer des embryons dans des oviductes ligaturés de lapine ou de brebis, et les récupérer après 3 à 7 jours.

D'autres méthodes ont également été évaluées : transfert à des ovocytes de vaches ou à des femelles bovines prépubères, culture dans le sac amniotique d'embryons de poulet. (Hanzen 2004)

### ➤ La culture de l'embryon in vitro :

Les faibles rendements de la culture in vivo, et la lourdeur des manipulations ont conduit à s'orienter vers la culture in vitro des embryons avec d'autres cellules. La culture des embryons en présence de cellules d'origines diverses a reçu le nom de « co-culture ». (Guérin et al 1996).

❖ **Les techniques de Co-culture** : les embryons sont mis en culture en présence de substrat nourricier (cellules feeder), ces cellules peuvent être trophoblastiques, tubaires, cellules de la granuleuse ou somatiques ; dans un milieu (le plus souvent le milieu M199 enrichi parfois à l'ECS ou de divers facteurs de croissance tels l'IGF, le TGF, l'EGF,...) (Hanzen 2004)

❖ **La culture dans un milieu chimiquement défini** : La nécessité de mieux comprendre les besoins de l'embryon au cours du développement embryonnaire, ainsi que les risques sanitaires liés au transfert d'embryon produits in vitro, ont également conduit à l'utilisation de milieux « chimiquement définis » ou « semi-définis ».

Ce sont des milieux salins relativement simples, additionnés d'acides aminés : SOF (Synthétique Oviduct Fluid) (Takashi, First 1993), CR1 (milieu de Rosenkrans) (Rosenkrans et al 1993), BMOC-3 (milieu de Brinster) (Yoshioka et al 1993).



La culture des embryons dans ce type de milieu permet de mesurer directement l'impact d'un certain nombre de facteurs (facteurs de croissance par exemple) sur le développement embryonnaire, sans qu'il y ait d'effet sur les cellules environnantes (comme c'est le cas lorsque les œufs sont dans un système de Co-culture) (Guérin 1996).

# Partie expérimentale :



## Introduction :

La fécondation in vitro (FIV) est un procédé par lequel un ovule qui a atteint sa maturité est fécondé par de la semence hors de l'organisme maternel. (Badinand et al 2000)

La réussite de la FIV dépend entièrement de la réussite de ces différentes étapes: la récolte des ovocytes, la sélection des COCs, la maturation ovocytaire in vitro, la capacitation des spermatozoïdes et la fécondation proprement dite.

Dans cette partie nous avons tenté de maîtriser la technique de maturation ovocytaire in vitro, une étape clé dans le protocole de fécondation in vitro.

La récolte des ovocytes a été réalisée à partir d'ovaires de vaches près abattage ; la ponction folliculaire nous a permis de récupérer des COCs qui seront sélectionnés et soumis à la maturation.

Le protocole suivi pour la réalisation de notre étude ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans la partie ci dessous :

## I- Matériels et méthodes :

### I-1/ Matériels :

#### a) Les ovaires :

Les ovaires sont collectés au niveau de l'abattoir de BLIDA.

Ils sont ensuite transférés dans des conditions adéquates dans les 2 heures qui suivent la récolte, au laboratoire de culture cellulaire du service de biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Alger, où nous avons réalisé les principales étapes de notre travail.

#### b) Matériels :

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

- Couteau stérilisé,
- Des gants stériles,
- Sachets de congélation,
- Un sac isotherme contenant de l'eau tiède (30 a35°C) qui sert à la préservation de la température pendant le transport des ovaires,
- Thermomètre pour le contrôle de la température pendant le transport des ovaires,
- Seringues stériles avec aiguilles (G : 18) pour la ponction folliculaire,
- Boîtes de pétri quadrillées pour faciliter le comptage des ovocytes récoltés,
- Sérum physiologique : NaCl 0.9%,
- Microscope inversé.

Le matériel nécessaire pour la mise en culture des COCs est le suivant :

- Les milieux de culture, (TCM199, MEM)
- SVF (sérum de veau foetal) (sigma),
- hCG (human chorionic gonadotropins) (organon),
- Des antibiotiques : pénicilline- streptomycine,
- De la glutamine,
- Bain marie,
- Tubes stériles et des seringues stériles pour la préparation des milieux,
- Micropipettes et embouts stériles et/ou seringues à insuline,
- Hotte à flux laminaire (avec bec benzène),
- Champs stérile tapissant la hotte,
- Plaques de culture cellulaire (6 et 24 puits),
- Plaque chauffante,
- Incubateur à CO<sub>2</sub>,
- Lames et lamelles pour la coloration des ovocytes après culture,
- Colorant Giemsa,
- Appareil photo numérique,
- Réfrigérateur pour les milieux.

Tout matériel susceptible d'être en contact avec les COCs doit impérativement être stérile.

Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire. Le laboratoire est équipé de 2 hottes : l'une est utilisée pour la ponction des ovaires, une seconde est réservée à la préparation des milieux de culture, et à la mise en culture des ovocytes.





**Figure 12:** image de la salle de culture cellulaire

L'utilisation d'un microscope inversé nous a permis d'observer et de manipuler les COCs.

L'incubateur à CO<sub>2</sub> placé à proximité de la hotte de capacité moyenne abrite les cultures ovocytaires. La température y est de 38.5°C, à une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et saturée en humidité ; toute perturbation entraînant une déviation de ces paramètres (porte interne mal fermée par exemple) peut gêner la maturation.



**Figure 13 :** photo de l'étuve a CO<sub>2</sub>.

Les produits entrant dans la composition des milieux de culture sont conservés selon leur nature : à température ambiante (eau ultra pure, sels...), à + 4°C (réfrigérateur indispensable à la préservation des hormones et des milieux après préparation) ou à -18°C (congélateur pour une conservation optimale du sérum de veau foetal, des antibiotiques et de la glutamine)

Il est impératif que le liquide folliculaire récupéré après ponction soit transvasé dans de la verrerie stérile : les ovaires sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille 18G montée sur une seringue de 5cc, tout en évitant les stress cellulaires (thermique, osmotique) en ajoutant un petit volume du sérum physiologique 38.5°C à la seringue vide (0.5ml environs), ce qui a un effet moins traumatisant pour les ovocytes que l'aiguille reliée à une pompe à vide.

## **II- Méthodes :**

### **II-1/ Milieux utilisés :**

Deux milieux différents ont été utilisés dans notre étude :

- Le TCM199
- Le MEM

Ces derniers sont enrichis avec du :

- Sérum du veau foetal (SVF) (sigma)
- hCG (Organon)
- De la Glutamine, et des antibiotiques.



Les doses de ces facteurs d'enrichissement sont calculées en fonction de la quantité du milieu.

### II-2/ La préparation du milieu : (cf. figure14)

Les milieux de culture se présentent sous forme lyophilisée ; la dilution se fait avec une eau ultra pure stérile, et filtrés via un système millipore, qui constitue un filtre, empêchant toute contamination du milieu lors de sa dilution, qui serait délétère pour les cultures ultérieures.

Le milieu est transvasé dans de la verrerie stérile, tamponné au bicarbonate et conservé à +4°C.

Quelques heures avant le départ à l'abattoir (12h), les milieux sont enrichis, disposés dans les plaques de culture et mis en étuve à 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> et 100% d'humidité.



Figure 14: préparation des plaques de culture

### II-3/ Collecte des ovaires :

Avant d'aller à l'abattoir un sac isotherme contenant des sachets de congélation remplis d'eau tiède de 30 à 35 °C est préparé afin de maintenir une température optimale durant le transport.

Un thermomètre placé à l'intérieur du sac isotherme nous a permis de contrôler de la température tout au long du trajet.

Par session les ovaires sont prélevés à l'abattoir de BLIDA de façon la plus propre possible (couteau ébouillanté, port des gants a usage unique stériles) et dans les

deux heures suivant l'abattage de la vache. Placés dans des sachets stériles et soudés par la suite pour éviter toute contamination. Ces derniers sont ensuite placés dans le sac isotherme pour être transportés rapidement jusqu'au laboratoire de culture cellulaire à l'Institut Pasteur d'Alger à Dely Brahim.

**a) Ponction ovarienne :** (cf. figure15)

Au laboratoire les ovaires sont manipulés individuellement, un rinçage à l'aide d'un sérum physiologique tiède, avec un léger massage est pratiqué afin d'éliminer les traces de sang ; les follicules ovariens sont repérés pour la ponction.

Une première étape, principale consiste à ponctionner les follicules de 2 à 8 mm de diamètre en position superficielle, visibles, à l'aide du montage aiguille 18G/seringue. Ensuite une seconde étape, plus brève consiste à ponctionner l'ovaire en aveugle afin de collecter les follicules en position plus profonde.

Les ovaires étant maintenus entre 2 doigts, en appliquant une légère pression sur l'ovaire permettant de mettre en évidence les follicules et de mieux apprécier la vidange des follicules.

Régulièrement, lorsque la seringue se remplit, le liquide folliculaire collecté est versé dans des boîtes de pétri quadrillées, facilitant le comptage et la classification des ovocytes au microscope inversé.

Toutes ces manipulations se déroulent sous hotte à flux laminaire. La rapidité est un critère de réussite, limitant les stress (thermique, lumineux, et oxydatif)



**Figure 15 :** image de la ponction ovarienne

**b) Sélection des ovocytes :**

Après la ponction, le liquide folliculaire est observé sous un microscope inversé : on remarque alors de nombreux débris tissulaires et quelques ovocytes sous forme de COCs. Grossissement (G : 10)



Ces derniers sont prélevés à l'aide d'une micropipette et/ou une seringue à insuline et transférés dans une autre boîte de pétri contenant environ 1ml de NaCl.

Ces COCs sont observés au grossissement (G : 40) et triés selon leur morphologie selon la classification rapportée par C. Hanzen 2004.

Cette manipulation est rendue facile grâce aux conseils avisés de notre promoteur.

Les données bibliographiques préconisent de ne conserver que les ovocytes de qualité 1 et 2.

Mais nous avons retenu tous les ovocytes présents sauf les ovocytes de très mauvaise qualité ou en voie d'apoptose, dans le but d'observer le phénomène de maturation sur les différentes classes (classes 1, 2, 3, 4).

Le transfert des ovocytes dans du NaCl pour la lecture sous microscope inversé a permis de les rincer avant d'être placés en puits (plaques de cultures de 6 et /ou a 24 puits) pour la maturation proprement dite. On élimine par ce rinçage la plus grande partie du liquide folliculaire, qui se retrouve très dilué.

#### **c) Les différents milieux de maturation utilisés :**

Plusieurs manipulations ont été faites utilisant divers milieux de MIV mais jamais de façon parallèle simultanée.

On parlera du :

##### **Milieu n°1 :**

- 100 ml de TCM199
- 10ml de SVF (sigma) décomplémenté a 56°C pendant 30min.
- 2ml de glutamine.
- 200µl d'antibiotiques (pénicilline - streptomycine)

##### **Milieu n°2 :**

Le MEM (enrichi à 10% du SVF décomplémenté et d'antibiotiques) auquel nous avons ajouté 0.2ml de glutamine pour 10ml de MEM.

##### **Milieu n°3 :**

- 80ml de TCM199
- 10ml du SVF décomplémenté.
- 2ml de glutamine
- 200µl d'antibiotiques (pénicilline - streptomycine)
- 40UI d'hCG (Organon)

#### **d) Mise en maturation des COCs :**

Une fois les milieux préparés et incubés et les ovocytes sélectionnés, la mise en maturation peut être initiée.

Les COCs sont placés au nombre de 1 à 5 COCs par puits. Tous débris cellulaires et COCs apoptiques ont du être éliminés au cours du rinçage et doivent être absents des puits de culture.

La MIV a lieu sous 5% de CO<sub>2</sub> et 100% d'humidité, à 38.5°C. Les plaques de culture ne seront retirées de l'incubateur qu'après 24h de MIV.

#### e) Evaluation morphologique de la maturation in vitro :

Après 24h de maturation, les COCs sont observés directement dans leurs puits au microscope inversé.

L'idéal est de pouvoir observer des COCs expansés avec un globule polaire en périphérie de l'ovocyte.

On considère comme mature tout ovocyte ayant un cumulus expansé clair et un ovocyte central légèrement plus foncé relativement flou mais homogène.

Dans les autres cas, les COCs sont considérés comme immatures (cf. figure 19) voire comme apoptiques (cumulus noirâtre, cytoplasme ovocyttaire hétérogène). (Selon Sirard et al 1989)

La technique de coloration au DAPI (4,6diamidino 2-phénylindol, sigma D9542) est une technique qui permet la mise en évidence de la maturation nucléaire des ovocytes soumis à la MIV. Ce colorant fluorescent de l'ADN permet de mettre en évidence la méiose des ovocytes bovins.

Cette méthode demeurant inaccessible du fait du coût élevé du kit et sa rareté sur le marché, nous a poussés à envisager d'autres techniques de coloration moins onéreuses, permettant la mise en évidence du noyau et du globule polaire.

« Le GIEMSA », un colorant dont le principe n'est pas fluorescent permet la coloration en violet de la chromatine de toute cellule avec laquelle il est mis en contact.

Ce colorant utilisé habituellement dans la coloration de différents types des cellules nous a permis l'observation de la maturité nucléaire des ovocytes mis en MIV sur lesquels on observe clairement une structure ovoïde « le globule polaire » visible sous microscope inversé au grossissement (G : 40) situé en dessous de la membrane ovocyttaire plus exactement dans l'espace périvitellin. (cf. figure 18)

Le protocole de coloration est simple : il faut d'abord éliminer les cellules du cumulus entourant l'ovocyte choisis pour la coloration (dénudage), qui, colorées, empêcheraient toute visualisation de l'ovocyte.

L'opération de dénudage a été rendue facultative pour la simple raison que l'ovocyte choisi pour la coloration est un ovocyte de classe 3, le dénudage s'est donc fait spontanément suite à l'expansion complète du cumulus après maturation.

On dépose l'ovocyte a coloré, sur une lame avec quelques gouttes du colorant Giemsa dilué à 4%. 10 min après, l'observation sous microscope inversé peut avoir lieu.



### III- Résultats et commentaires:

#### A- résultats :

Après 24h d'incubation nous avons pu observer le phénomène de maturation ovocytaire via l'expansion de cumulus. (cf. figure16-17)  
Nos résultats sont représentés dans le tableau suivant (tableau I)

Tableau I: résultat global de maturation

Milieux	Nombre d'ovaires	Nombre d'ovocytes récoltés	Nombre d'ovocytes mis en culture	Nombre d'ovocytes expansés	Nombre d'ovocytes immatures	Taux de maturation in vitro
Milieu n°1	16	73	71	39	32	54.92%
Milieu n°2	02	10	10	05	05	50%
Milieu n°3	05	33	33	21	12	63.64%
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>116</b>	<b>114</b>	<b>65</b>	<b>49</b>	<b>57.02%</b>

L'expansion du cumulus a pu être observée sur 65 ovocytes sur 114 mis en culture, soit un taux global de 57,02%.

Le but initial de nos expérimentations était de déclencher une maturation in vitro tout en se familiarisant avec les différentes techniques de manipulation. Pour ce faire nous avons dans un premier temps mis des ovocytes en culture dans deux milieux différents, composés d'un milieu de base, enrichi au SVF, glutamine, et des antibiotiques. La différence entre ces deux milieux résidait dans le choix du milieu de base ainsi le TCM199 (milieu n°1) et le MEM (milieu n°2) ont été utilisés à cet effet. (Tableau II)

**Tableau II:** maturation en fonction du milieu de base

Milieux	Nombre d'ovaires	Nombre d'ovocytes récoltés	Nombre d'ovocytes mis en culture	Nombre d'ovocytes expansés	Nombre d'ovocytes immatures	Taux de maturation in vitro
Milieu n°1	02	11	09	05	04	55.55%
Milieu n°3	02	10	10	05	05	50%

Dans le milieu n°1 : 09 ovocytes ont été mis en culture sur 11 récoltés (2 d'entre eux ayant subi des altérations, nous avons choisi de les écarter des lots d'ovocytes mis en maturation)

Nous avons pu observer une expansion du cumulus sur 5 ovocytes ce qui correspond à un taux de 55.55%

Dans le milieu n° 2 : la totalité des ovocytes récoltés ont été mis en culture (10 ovocytes), dont 5 ont subi l'expansion du cumulus. (50%)

Nous avons observé une certaine analogie entre les résultats obtenus et ce, indépendamment du milieu de base utilisé, qui démontre la possibilité d'utilisation de ces deux milieux dans le processus de MIV chez la vache.



Après avoir déclenché une maturation lors de notre premier essai, nous nous sommes intéressés à certains facteurs d'enrichissement, à savoir les hormones gonadotropes et plus particulièrement, la LH.

Il existe sur le marché, une LH recombinante, qui est le hCG (human Chorionic Gonadotropins), elle est très avantageuse du fait de sa pureté, car n'étant pas polluée par d'autres facteurs susceptibles d'influencer la maturation (la FSH notamment), elle permet une meilleure investigation sur l'effet de la LH sur les ovocytes mis en culture.

Pour mener à bien cette expérimentation, nous avons préparé deux milieux différents, (le milieu n°1) à base de TCM199, SVF, Glutamine et des Antibiotiques. (Le milieu n°3) se distingue par la présence d'hCG.

Deux essais ont été faits avec chacun des deux milieux. (Les résultats sont représentés sur le tableau III)

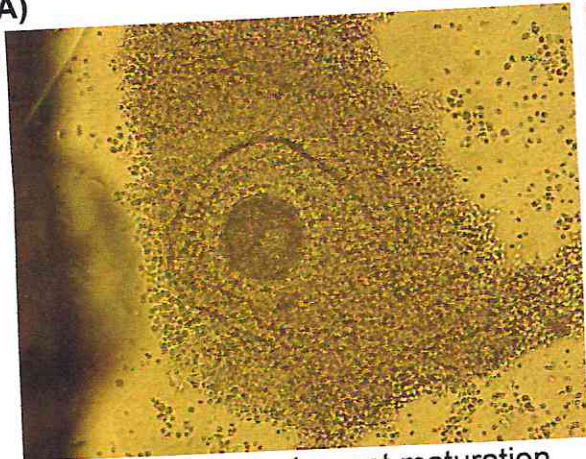
**Tableau III:** maturation en fonction de la présence du hCG

Milieux	Nombre d'ovaires	Nombre d'ovocytes récoltés	Nombre d'ovocytes mis en culture	Nombre d'ovocytes expansés	Nombre d'ovocytes immatures	Taux de maturation in vitro
Milieu n°1 hCG -	14	62	62	34	28	54.84%
Milieu n°3 hCG+	05	33	33	21	12	63.64%

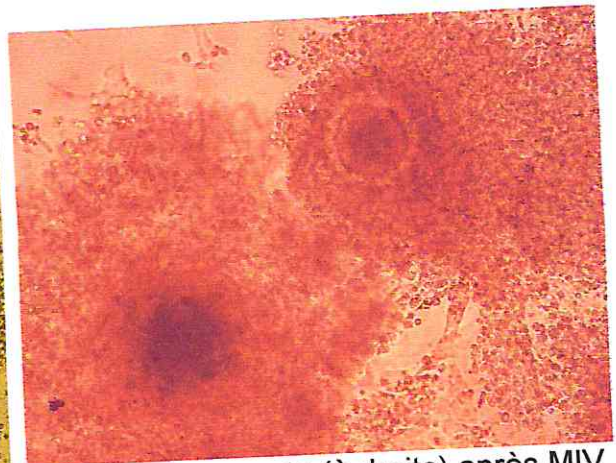
54,84% des ovocytes mis en maturation dans le milieu n°1 (hCG -) ont exprimé une expansion du cumulus, contre 63,64% pour ceux soumis au milieu n°2 (hCG+).



A)

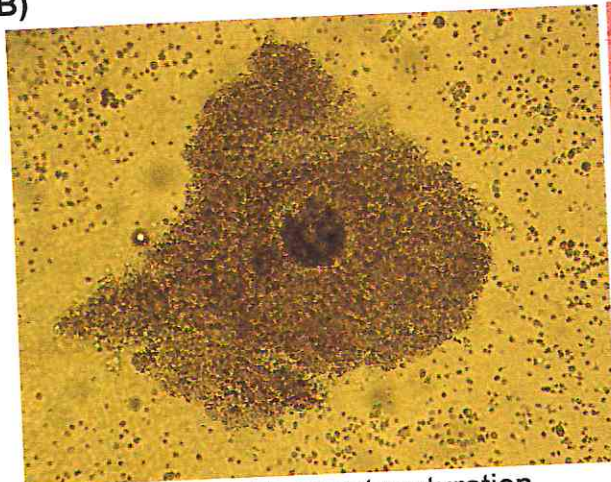


Ovocyte de classe 1 avant maturation

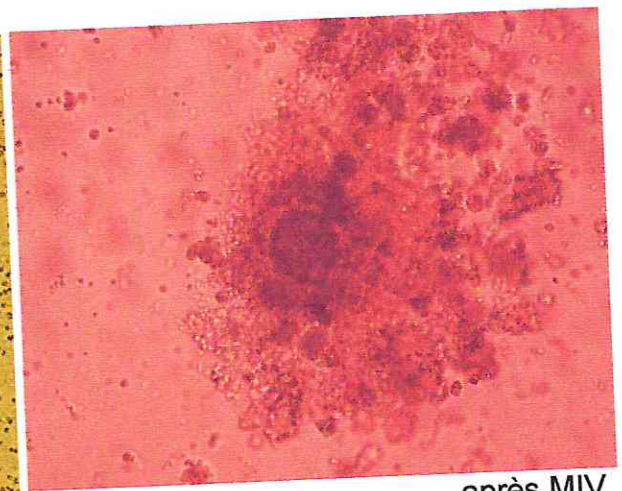


le même ovocyte (à droite) après MIV.  
A gauche, l'ovocyte présente une expansion très nette

B)

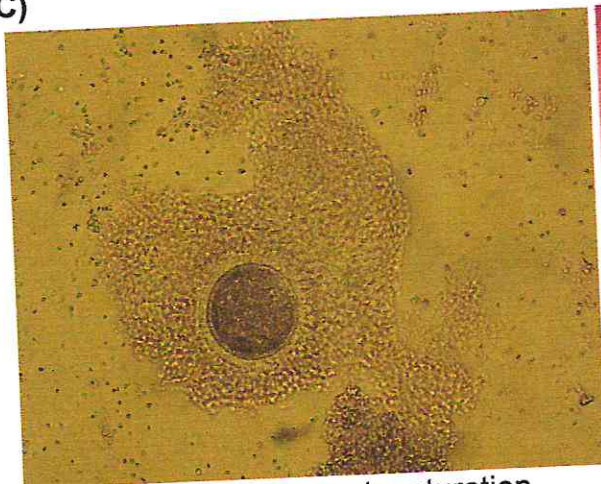


Ovocyte classe 2 : avant maturation

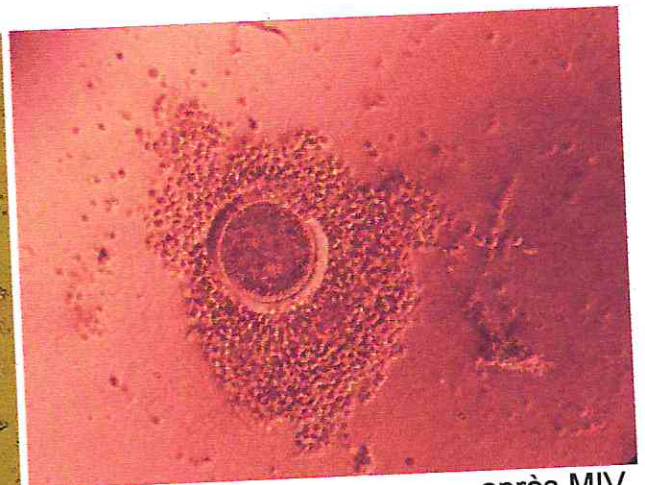


après MIV

C)



Ovocyte classe 2 : avant maturation

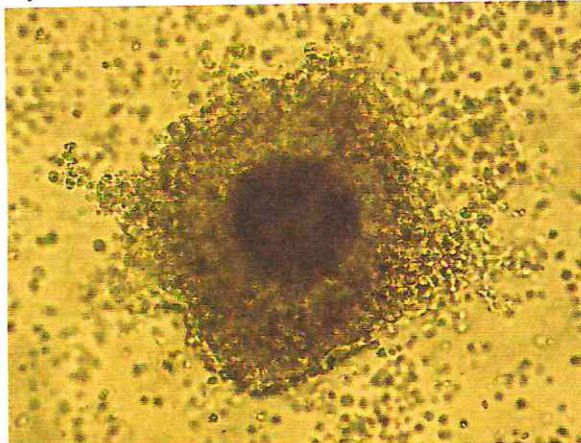


après MIV

Figure 16 (A, B, C): Photos d'ovocytes matures ou expansés



D)

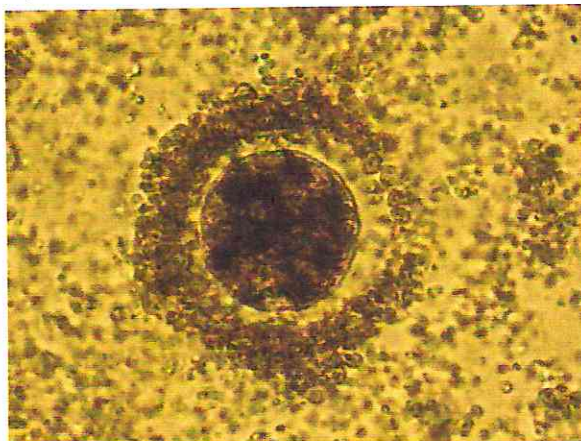


Avant maturation



après MIV

E)

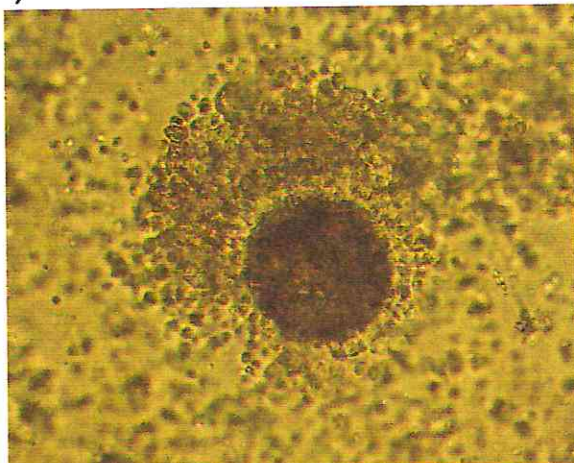


Avant maturation

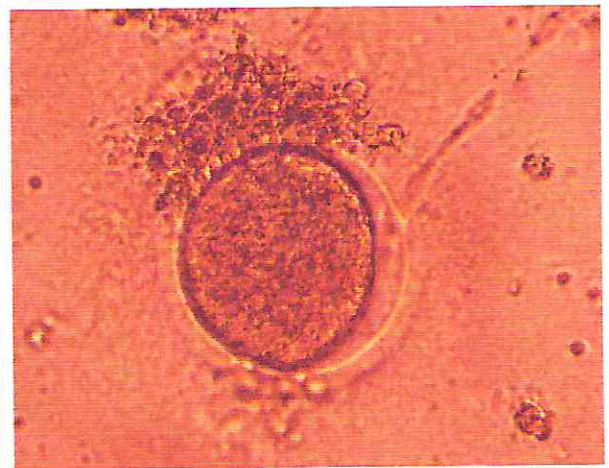


après MIV

F)



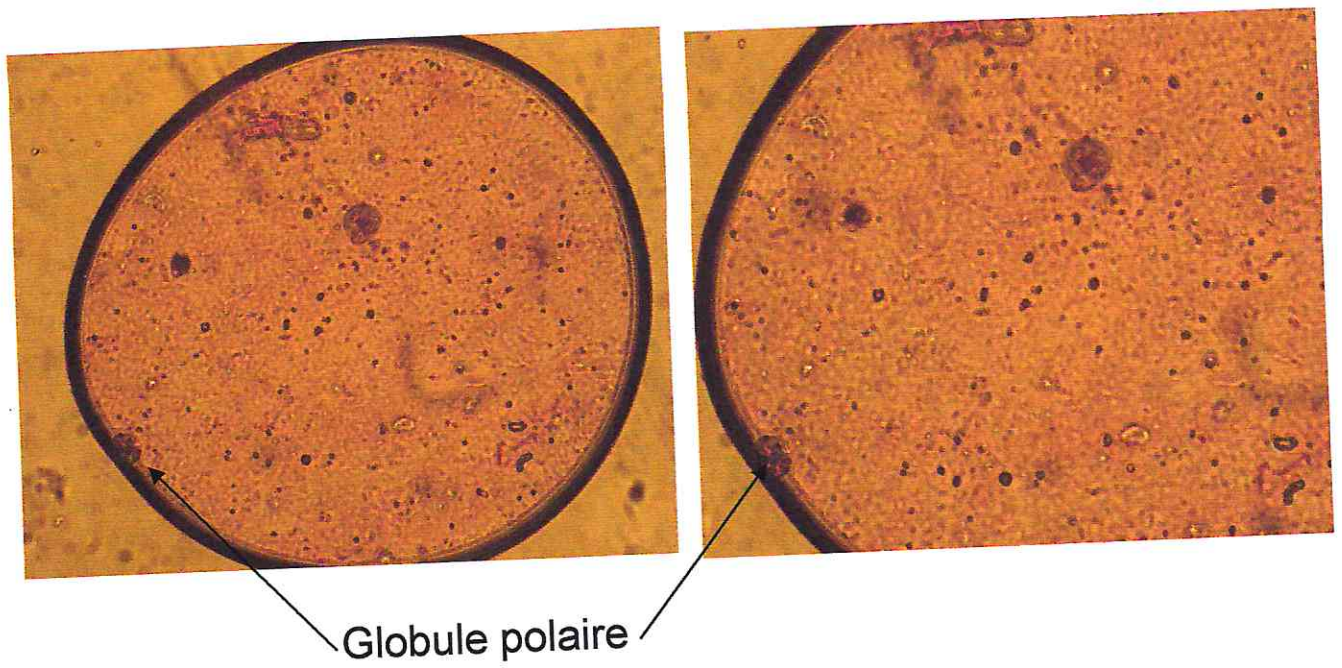
Avant maturation



après MIV

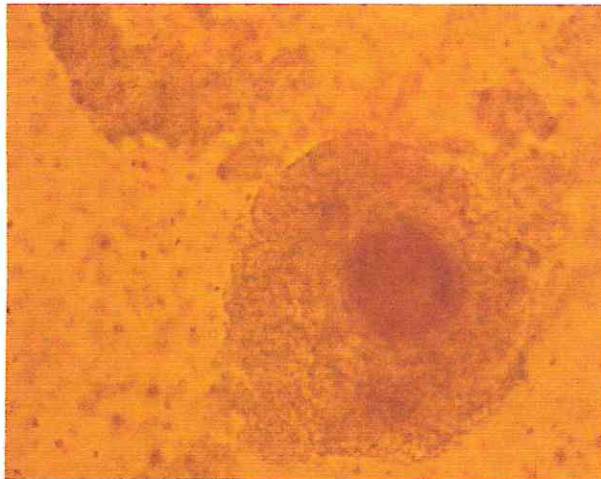
Figure 17 (D, E, F): Photos d'ovocytes matures ou expansés :



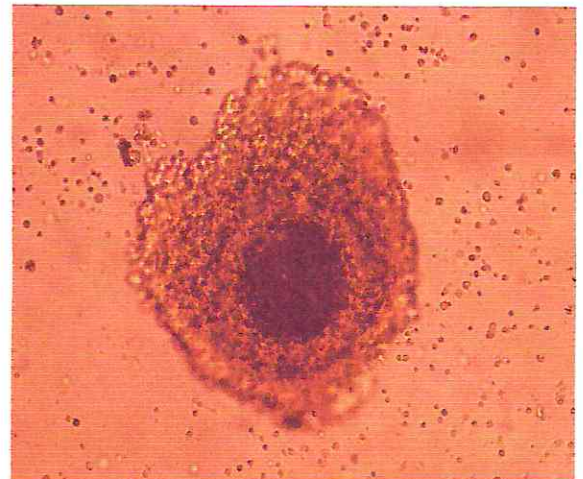


**Figure 18** : Photos d'un ovocyte présentant un globule polaire après coloration au Giemsa. Au grossissement (G : 40)

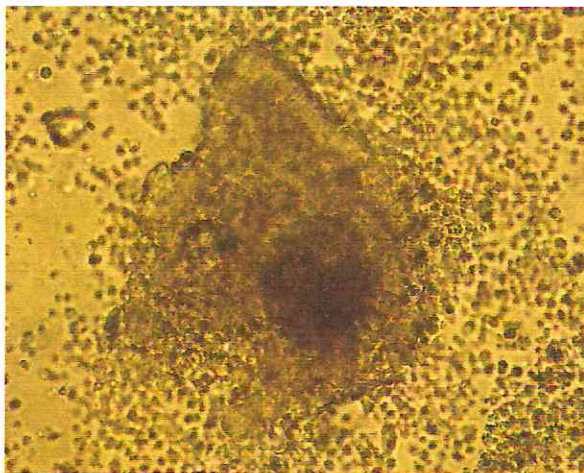




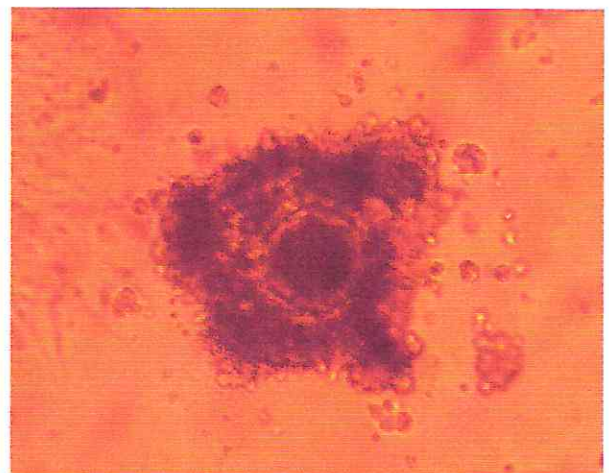
Ovocyte avant culture



après culture (non expansion du cumulus)



Ovocyte avant culture



après culture (non expansion du cumulus)

**Figure 19:** Photos d'ovocytes considérés immatures ou non expansés :

## Discussion :

Dans notre protocole expérimental, nous avons totalisé 6 essais. Les ovocytes ont été collectés à partir d'ovaires d'abattoir et mis en culture dans différents milieux, à une température de 38,5°C à 5% de CO<sub>2</sub> et dans une atmosphère saturée en humidité.

Les résultats obtenus sont variables. Nous allons nous intéresser en premier lieu au taux global de maturation :

Sur 114 ovocytes mis en culture, 65 ont exprimé une maturation, à travers une expansion du cumulus, soit un taux de 57,02%, ce qui se rapproche des résultats obtenus par Bryuere en 2002 (67,81%), mais reste néanmoins inférieur, ce qui peut être justifié par l'absence de certains facteurs d'enrichissements, tels que les facteurs de croissance, qui augmentent d'une façon significative l'expansion du cumulus ainsi que les taux de clivages des jeunes embryons (Neufeld et al.1987) ou les hormones : les gonadotrophines sont souvent ajoutés au milieu de culture afin d'induire la maturation cytoplasmique, l'expansion du cumulus et améliorent le développement embryonnaire. (Calder *et al* 2003).

Dans un premier temps, nous avons réalisé deux essais, en employant deux milieux de base différents, à savoir le TCM199 et le MEM, tous deux enrichis de la même manière. Les résultats obtenus, respectivement 55,55% et 50% illustrent la capacité de ces deux milieux de culture cellulaires à déclencher une maturation, comme l'a clairement spécifié Thibault en 2001.

Dans le but d'observer l'influence des hormones, et plus particulièrement celui de la LH sur la maturation *in vitro*, 4 essais ont été réalisés dont deux en présence d'hCG (milieu n°3) et deux en absence d'hCG (milieu n°1). Le nombre d'ovocytes maturés était de 34 sur 62 mis en culture, soit un taux de 54,84%.

En revanche, les ovocytes mis en culture dans un milieu contenant de l'hCG, ont subi une expansion du cumulus dans 63,64%, soit 21 ovocytes sur un total de 33 mis en culture. Il apparaît clairement sur ces résultats obtenus, que l'addition d'hCG dans le milieu de culture a permis d'optimiser la maturation, donnant ainsi des chiffres se rapprochant plus de ceux obtenus par Bruyère en 2002. (67,81%)

Cette amélioration du taux de maturation est due à l'effet de la LH sur les ovocytes mis en culture, en effet, La LH a des effets bénéfiques sur la maturation ovocytaire bovine (Zuelke, Brackett 1990), elle augmente le métabolisme du glucose dans les COCs mais diminue les taux d'expulsion du globule polaire, de clivage et de blastocystes à fortes concentrations. (Bruyère 2002).



---

## CONCLUSION

Au terme de notre étude, nous avons réalisé avec succès la première maturation ovocytaire in vitro en Algérie, avec un taux global de 57,02% d'ovocytes maturés.

Ce chiffre s'est vu amélioré après enrichissement du milieu au hCG, pour atteindre 63,64%, ce qui démontre que la qualité et l'enrichissement du milieu de culture sont des facteurs déterminants pour la réussite de la maturation ovocytaire in vitro.

Ces chiffres sont satisfaisants, comparativement à nos repères bibliographiques (Bruyere 2002) et démontrent clairement la possible application de cette technique en Algérie, qui est une étape clé de la fécondation in vitro, mais qui demeure malheureusement mal connue, que ce soit en médecine vétérinaire ou en médecine humaine.

La technique de maturation ovocytaire in vitro apporte ainsi une révolution dans les biotechnologies de la reproduction animale, car elle constitue une voie d'entrée à la production d'embryons in vitro, applicable dans la notion d'amélioration génétique des cheptels, au sauvetage génétiques des individus à haut potentiel, ainsi qu'à la sauvegarde des espèces menacées.

En médecine humaine, la MIV, systématiquement contournée dans les protocoles de FIV en Algérie, permettra de rendre l'assistance médicale à la procréation plus accessible, de réduire les traitements hormonaux, bien souvent lourds, coûteux et non disponibles et enfin de donner une chance supplémentaire à des couples malchanceux de concevoir un enfant.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :**

- Adashi EY, 1993, The intraovarian insulin-like growth factor system, in : The ovary, E.Y. adashi and PCK Leung eds., Raven Press, New York, 1993, pp.319-335.
- Ashworth, C. J., Antipatis, C., and Beattie, L. 1999, Effects of pre- and post-mating nutritional status on hepatic function, progesterone concentration, uterine protein secretion and embryo survival in Meishan pigs. *Reprod Fertil Dev* 11, 67-73.
- Aspar J, et coll, *Pédiatrie D.E. infirmier*. Estem 2002. 424p.
- Atef A, Sirard M.A, Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation *Biology of Reproduction* **66**, 901-905 (2002)
- Badinand F, Bedouet J, Cosson JL, Hanzen C, Vallet A 2000. Lexique des termes de physiologie et pathologie et performances dereproduction chez les bovins. *Annales de Médecine Vétérinaire* 144 :289-301.
- Bao B, Garverick HA, 1998, Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review - *J Anim. Sci*, 1998; 76: 1903-1921.
- Barlow P, Puissant F, Van Der Zwalen P, Vandromme J, Trigaux P, Leroy F, 1992, In vitro fertilization, development and implantation after exposure of mature mouse oocytes to visible light, *Mol Reprod Dev* 1992,33 : 297-302
- Bavister BD, 1995, Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts, *Hum Rprod Update*, 1995, 2: 91-148.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T, 1992, Development of in vitro matured/ in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media, *Theriogenology* 1992, 37: 127-146.
- Bavister BD. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 1981; 217:45-51
- Becker ARCL, Izadyar F, Colenbander B, Bevers MM, Effect of GHRH and VIP on in vitro bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, 2000. 53: 1171-1783.



- Bevers MM, Dieleman SJ, Kruip Tam, 1988, Chronic treatment with bromocryptine during the oestrous cycle of the cow: Evidence that prolactin is not involved in preovulatory follicular. Growth, Anim Reprod Sci, 1988, 17: 21-32.
- Blondin P, Sirard M-A, 1995, Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence of bovine oocyte, Mol Reprod Dev 1995, 41: 54-62
- Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J., Hunt, T, 1998, Cyclin b2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin b1- null mice die in utero. Proc Natl Acad Sci U S A (1998) 95: 4344-4349.
- Bryuere G, Maturation ovocytaire in vitro chez la vache. Thèse vétérinaire ENV Lyon 2002.
- Buccione R, Schroeder Ac, Eppig JJ, 1990, Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis, Biol Reprod 1990, 43: 543-547.
- Cetica PD, Dalvit GC, Beconi MT, 1999, Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation, Bicocell, 1999, 23: 125-133.
- Cozet N. 1993. Reproduction chez les mammifères et l'homme. Ed C. Thibault et M.C. Levasseur Ed. INRA Ellipses Paris 345.
- De Witt AA, Kruip TA, 2001, Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for  $\alpha$ -amantin, oocyte diameter and developmental capacity. Anim Reprod, Sci, 2001, 65: 51-65
- Derynck R, 1990, Transforming growth factor alpha, Mol Reprod dev 1990, 27: 3-9.
- Driancourt, M. A., Gougeon, A., Monniaux, D., Royère, D., Thibault, C. 2001, Folliculogenèse et ovulation. In: Thibault, C., Levasseur, M.-C. (eds.), Le reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: INRA éditions; 2001: 65-84.
- Eckert J, Niemann H, 1995, In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media, Theriogenology 1995, 43: 1211-1225

- Eng LA, Kornegay ET, Huntington J, Wellman T, 1986, Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1986, 76: 657-662.
- Ennuyer M, 2000, Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction - *Point Vet*, 2000 ; 31 (209) : 377-383.
- Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K, 1996, Mammalian oocyte growth and development in vitro, *Mol Reprod Dev* 1996, 44: 260-273.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL, 1985, Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentration and activity in maintaining oocyte meiotic arrest, *Biol Reprod* 33: 1041-1049, 1985
- Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Gilligan BG, First NL, Culture of one and two-cell embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 1987;28:1-7.
- Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF, Battu I, 1995, Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache – *Bull GTV*, 1995 ; 4 : 35-49.
- First NI, Leibfried-Rutledge ML, Sirard MA, 1988, Cytoplasmic of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence, In: *Meiotic inhibition: Molecular control of meiosis*, Alan R. Liss Inc, New York, 1988, pp1-46.
- Fukui Y, Kikushi Y, Kondo K, Mizushima S, fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology*, 2000, 53:1553-1565.
- Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in non serum maturation medium on maturation and subsequent development in bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* . 2000, 63: 1730-1734.
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J., and Kot, K, 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*. 63, 383 -9.
- Gordon I, 1994, oocyte recovery and maturation, In : *Laboratory production of bovine Embryos*, CAB international, UK, 1994, pp 30-142.



- Guénard, H., Boisseau, M. R., Carré, F., Deviller, P., Hanoune, J., Harf, A., Lacour, J.-R., Lamour, Y., Lévy, B., Marthan, R., Martineaud, J. P., Minaire, Y., Mion, F., Paillard, M., Swynghedauw, B., Varène, P., and Vincent, J, 1996, "Physiologie Humaine." Éditions pradel, 4, passage de la Main d'Or, Paris.
- Guerin P, Guyader-Joly C, Mermillod P, Leguyenne B, la production in vitro et la cryoconservation de l'embryon chez les bovins, Le point vétérinaire 1996 : 13-26.
- Guérin P, Guyader-Joly C, Mermillod P, Leguyenne B, 1996, la production in vitro et la cryoconservation de l'embryon chez les bovines. Le point vétérinaire, 1996, 28n special, P 184.
- Guerin P, Tappaz M, Guillaud J, Ménézo Y, demonstration of cysteine sulfinate decarboxyase in cultured oviduct epithelial cells in cows and goats. C R Acad Sci. 1995, 318:523-528.
- Guyader-Joly C, Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit in vitro. Thèse de doctorat de sciences biologiques fondamentales et appliquées, université de Paris VI 1998. 197p.
- Hanzen C. 2004 La production d'embryons in vitro. Thèse de 2e doctorat.
- Harper KM, Brackett BG, Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with EGF and low concentrations of gonadotropins. Biol Reprod, 1993, 84: 409-416
- Hashler JF, In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. Anim.Reprod.Sci.2000, 60-61: 81-91.
- Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ, Schultz GA, 1993, The role of growth factors in embryo production, Theriogenology 1993, 39: 151 - 161.
- Hsueh AJ, Billing H, Tsafiri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev 1994. 15: 707-724.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod* 5, 122-30.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H, 1989, Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle, J. Reprod, 1989, suppl.38:

- Hyttel P, Viuff D, Laurincik J, Schmidt M, Thomsen PD, Avery, Callesen H, Rath D, Rosenkranz C, Schellander K, Ochs RL, Greve T, 2000, Risks of in vitro production of cattle and swine embryos: aberrations in chromosome numbers, ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology. *Hum. Reprod*, 2000, 15 suppl: 87-97.
- Hyttel, P , Laurincik, J, Viuff, D , Fair, T., Zakhartchenko , V, Rosenkranz, C, Avery, B. Rath, D. Niemann, H., Thomsen, P. D., Schellander, K., Callesen, H., Wolf, E., Ochs, R. L., Greve, T, 2000, Activation of ribosomal rna genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Anim Reprod Sci* (2000) 60-61: 49-60.
- Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM. Follicle stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 1998;**51**:339–345.
- jacqueline laurent, 1999, cours de meiose de l'université de paris –sud 1
- Komar CM, Berndtson AK, Evans ACO, Fortune JE, 2001, Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450 aromatase and P450 15  $\alpha$ hydroxylase, in bovine periovulatory follicle. *Biol. Reprod*, 2001, 64: 1797-1805
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD, 1987, Differential modulation of rat follicle ce11 gap junction populations at ovulation, *Dev Biol* 1987, 122: 61-71.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL, 1983, In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes, *Biol Reprod* 1983, 29: 173-179.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, 2001, *Molecular cell biology*. W.H. Freeman and company, New York.
- Lonergan P, Carolan C, Mermillod P, 1994, development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions, *Reprod Nutr Dev* 1994b,34: 329-339.
- Marchal R, 2001, production d'embryon porcins in vitro: influence de la qualité de l'ovocyte, thèse de doctorat, université de tours, 2001, 151P.
- Marchal R, Production d'embryons porcins in vitro : influence de la qualité de l'ovocyte. Thèse de doctorat, université de Tours, 2001, 151p.



- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., and Mermillod, P, 2002, Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 57, 1523-32.
- Martoriati A, 2002. Le système interleukine-1 dans le follicule ovarien de jument: expression et effets sur la maturation ovocytaire et l'ovulation, thèse de doctorale, science de la vie, 2001-2002
- Masui, Y. 2001, From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: The history of discoveries of maturation-promoting factor (mpf) and cytostatic factor (csf). *Differentiation* (2001)69: 1-17.
- Mayes MA, Sirard MA, 2001, the influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, 2001, 55: 911-922.
- McKiernan SH, Bavister BD, Tasca RJ, 1991, Energy substrate requirements for in vitro development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage, *Human Reprod* 1991, 6 : 64-75.
- McKiernan SH, Clayton MK, Bavister BD, 1995, Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos in vitro. *Mol Reprod dev* 1995,42 :188-199
- McNatty kp, Heath Da, Lundy T, Fidler Ae, Quirke L, O'connell A, Smith P, Groome N, Tisdall Dj , 1999, Control of early ovarian follicular development - *J Reprod Fertil Suppl*, 1999 ; 54 : 3-16
- Mehta TS, Kiessling AA. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biol Reprod* 1990; 43:600-606
- Mermillod P, Le lannou D, 1999, Maturation ovocytaire in vivo et in vitro chez les mammifères, ovocyte et embryon, de la physiologie à la pathologie, Hamamah S, Ménézo Y, Ellipses/ Editions Marketing, 1999, Paris, 368P.
- Mermillod, P., Tomanek, M., Marchal, R., Meijer, L. 2000, High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of mpf kinase activity. *Mol Reprod Dev* (2000) 55: 89-95.
- Mialot JP, Constant F, Chastant- Maillard S, Ponter AA, GRIMARD B, 2001, La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications -Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie, Paris, Novembre 2001 : 163-168

- Monniaux, D., Monget, P, Besnard, N., Huet, C, and Pisselet, C, 1996, Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 47, 3-12.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1990; 40:197-210
- Motlik J, Crozet N. Fulka J, 1984, Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles, *J Reprod Fertil* 1984, 72: 323-328.
- Motlik J, Fulk J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 1986; 25:87-96
- Mulheron GW, Schomberg DW, 1993, The intraovarian transforming growth factor system. In: *The ovary*, Ey Adashi and PCK Leung eds., Raven Press, New York, 1992. Pp. 337-361
- Murray, A. A., Molinek, M. D., Baker, S. J., Kojima, F. N., Smith, M. F., Hillier, S. G., Spears, N. 2001, Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* (2001) 121: 89-96.
- Nagai T, The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *theriogenology*. 2001, 55: 1291-1301.
- Neufeld G, Ferrara N, Mitchell R, Schweingener L, Gospodarowicz D, 1987, Granulosa cells produce basic fibroblast growth factor, *Endocrinology* 1987, 121: 597-602
- Pinyopummintr T, Bavister BD, 1991, In vitro-matured/ in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media, *Biol Reprod* 1991, 45: 736-742.
- Pinyopummintr T, Bavister BD, 1996, Energy substrates requirements for in vitro development of early cleavage-stage bovine embryos, *Mol Reprod Dev* 1996, 44: 193-199.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. In vitro maturation/in vitro fertilization bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture medium. *Biol Reprod* 1991; 45:736-742
- Porret C, Aspects physico-chimiques des milieux utilisés pour la production d'embryons in vitro chez les mammifères. Thèse vétérinaire ENV Lyon 2004.
- Robert, C., Hue, I., McGraw, S., Gagne, D., Sirard, M. A, 2002, Quantification of cyclin b1 and p34(cdc2) in bovine cumulus-oocyte complexes and



- expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biol Reprod* (2002a) 67: 1456-1464.
- Rose TA, Bavister BD, 1992, Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos, *Mol Reprod Dev* 1992, 31: 72-77.
  - Rose TA, Bavister BD, 1992, Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos, *Mol Reprod Dev* 1992, 31: 72-77.
  - Sakagushi M, Dominko T, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology*, 2000, 54: 1327-1342.
  - Salustri A, Petrunaro S, De Felici M, Conti M, Siracusa G, 1985, Effect of folliclestimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell- enclosed oocytes cultured in vitro. *Biol Reprod*1985; 33: 797-802.
  - Sanbuissho A, Coskun S, Lin YC, 1990, Stimulatory action of epidermal growth factor (EGF) on bovine oocyte maturation in serum free defined medium. *Theriogenology*1990,33: 318
  - Sato E, Matsuo M, Miyamoto H, 1990, Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, *J Anim Sci*1990, 68: 1182-1187.
  - Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Rodriguez H,1994, A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocystes stage with improved viability, *Theriogenology*1994,41: 1033-1043
  - Sirard MA, 1989, Temporary inhibition of in vitro meiotic resumption by adenylate cyclase,stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology* 1989; 31: 257.
  - Sirard MA, Coenen K, 1993, The use of a defined medium to evaluate meiotic resumption of immature bovine oocytes, *Theriogenology* 1993b, 39: 314.
  - Sirard MA, First NL, 1988, Invitro inhibition of oocyte nuclear maturation in bovine, *Biol Reprod* 1988, 39:29-234
  - Skinner MK, Lobb D, Dorrington JH, 1987, ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology*1987b, 121: 1892-99