



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Essais de la maturation ovocytaire in vitro chez la vache

Présenté par
Belarouci Fatma Zohra
Tafet Naouel

Devant le jury :

Président :	YAHIMI. A	MCB	ISV-B
Examineur :	BELALA. R	MCB	ISV-B
Promoteur :	ADEL. D	MAA	ISV-B
Co-promotrice :	KELLOU. R	D.VET	PARC ZOO BEN AKNOUN

Année : 2016/2017

DEDICACES

A

Mes parents qui m'ont toujours encouragé, soutenu, accompagné durant tout mon parcours, pour leurs sacrifices et soutien moral.

A

Mon frère et ma sœur pour leur disponibilité et soutien.

A

Toute ma famille pour son soutien et encouragement.

REMERCIEMENTS

Il me plait à travers la présentation de ce modeste mémoire de louer Allah le tout puissant qui m'a permis d'accomplir ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon promoteur, Dr ADEL.D pour ses orientations précieuses, sa rigueur, sa générosité, son soutien moral et son aide durant tout le long de mon parcours.

Un grand merci au président de jury Dr YAHIMI.A , à l'examineur Dr BELALA.R et à la co-promotrice Dr Kellou.R.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Directeur, au Dr DJOUDI, Professeur KAIDI et à l'ensemble de l'équipe pédagogique, pour m'avoir si bien accompagné dans l'acquisition des compétences et Médecine Vétérinaire.

Mes remerciements au Dr TERZAALI.D et Dr FEKNOUS.M pour tout ce qu'elles m'ont donné.

Mes remerciements également à toutes les équipes des abattoirs de Boufarik, El Harrach et Chiffa et l'équipe du laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida.

Mes remerciements à toute personne qui a contribué à ma réussite.

SOMMAIRE

DEDICACES

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUMES

Introduction générale.....1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I « physiologie de l'ovaire »

Introduction.....2

I-1 L'ovogenèse.....3

I-2- La folliculogenèse.....3

I-2-1- La folliculogenèse basale (gonadotrophine indépendante).....6

I-2-2- La folliculogenèse terminale (gonadotrophine dépendante).....7

I-2-2-1- Les vagues folliculaires.....8

I-2-2-2- Le follicule pré-ovulatoire et maturation ovocytaire.....10

I-2-3- Régulation endocrinienne du cycle ovarien.....11

CHAPITRE II « Maturation in vitro de l'ovocyte bovin »

Introduction.....14

II.1 Collecte des ovocytes bovins in vivo.....14

II.2 Collecte des ovocytes sur ovaires d'abattoir.....15

II.2.1 Collecte et acheminement des ovaires.....15

II.2.2 Ponction des follicules.....16

II.2.2.1 Ponction par aspiration.....17

II.2.2.2 Le slicing(Tranchage).....17

II.2.2.3 Digestion enzymatique.....18

II.3Classification des ovocytes récoltés.....18

II.3.1 Selon la morphologie du cumulus (l'expansion) et l'aspect de l'ooplasme.....18

II.3.2 Selon l'aspect de la chromatine de la VG.....20

II.4La MIV des ovocytes sélectionnés après classification.....22

II.4.1 Les milieux de maturation utilisés dans l'espèce bovine.....	22
• Milieux de base.....	23
• Hormones.....	25
• Sérums.....	26
1-3-1-Le liquide folliculaire.....	28
1-4- Facteurs de croissance et autre additifs.....	34
1-5- Antibiotiques.....	39
2- Les condition de la mise en incubation et MIV.....	39
4- Evaluation et classification des ovocytes après MIV.....	40
• Selon le degré d'expansion du cumulus.....	41
• Selon la maturation nucléaire.....	41
• Selon la maturation cytoplasmique.....	41
• La fécondation in vitro.....	41

PARTIE EXPERIMENTALE

Introduction.....	42
Matériel et méthodes.....	42
I. Matériel.....	42
II. Méthodes.....	43
Les milieux utilisés pour la MIV.....	49
La mise en culture des COCs.....	49
Résultats.....	52
1- Milieu 01.....	52
2- Milieu 02.....	52
3- Milieu 03.....	53
4- Milieu 04.....	53
Discussion.....	54
Conclusion.....	58

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AKT1 : v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1

AMH : anti-Mullerian hormone

BAF : Fluide Amniotique Serum

bFF : Fluide Folliculaire bovin

β ME : β mercaptoéthanol

BMP4 : bone morphogenetic protein 4

BMP7 : bone morphogenetic protein 7

BMP15 : bone morphogenetic protein 15

BSA : bovin serum albumin

BSC : Body Condition Scoring

CCNB1 : cyclin B1

CDC2 : cell division cycle 2

CG : cellules granuleuses

CO₂ : dioxyde de carbone

COC : Complexe ovocyte/cumulus

CR1 : Charles Rosenkrans

CYP11A1 : cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1

CYP17A1 : cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1

CYP19A1 : cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1

DIV : Développement in vitro

E2 : Œstradiol

ECS : sérum de vache en chaleur

EGF : epidermal growth factor

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

FBS : Fetal Bovine Serum

FGF : fibroblast growth factor

FGF7 : fibroblast growth factor 7

FIV : Fécondation in vitro

FOXO3 : forkhead box O3

FSH : hormone folliculo-stimulante

FSHp : hormone folliculo-stimulante porcine

GDF9 : growth differentiation factor 9

GH : growth hormone

GSH : glutathion

GV : vésicule germinale

GVBD : Germinal Vesicle Break Down (rupture de la vésicule germinale)

HCG : human chorionic gonadotropin

HIOCs : hydrophobic ionizable organic compounds

HSD3B2 : hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2)

IGF1 : insulin-like growth factor 1

KITLG : KIT ligand

KSOM : K Simplex Optimization Medium

LH : hormone lutéinisante

MEM : Milieu Essentiel Minimum

MIV : Maturation in vitro

MPF : M-phase Promoting Factor

NGF : nerve growth factor

O₂ : Dioxygène

OMI : Ovocyte Maturation Inhibitor

OPU : Ovum Pick Up

PRKAC protein kinase, cAMP-dependent

PTEN : phosphatase and tensin homolog

PVA : Polyvinyle alcool

ROS : reactive oxygen species

SMM : Shipping and Maturation Medium

SOFa : Synthetic Oviduct Fluid Medium

STAR : steroidogenic acute regulatory protein

SVF : sérum de veau fœtal

SVO : Sérum de Vache en Œstrus

TCM199 : Tissue Culture Medium 199

TGF : transforming growth factor

TGF a : transforming growth factor alpha

TGF b : transforming growth factor beta

TSH : thyroid-stimulating hormone

uPA : urokinase

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique de l'évolution d'un follicule (D'après Secchi) (Drion et Beckers., 1996).....	5
Figure 02 : Vagues de croissance folliculaires au cours du cycle œstral de la vache (Gayrard, 2007).....	9
Figure 03 : technique de ponction écho-guidé chez le bovin (Hanzen., 2016).....	14
Figure 04 : Ponction des follicules d'ovaires bovins par la technique d'aspiration d'après Hanzen., 2016.....	17
Figure 05 : Classification ovocytaire chez le bovin selon Kouamo et al, 2014 a: Ovocyte grade 01, b: Ovocyte grade 02, c: Ovocyte grade 03, d: Ovocyte grade 04.....	19
Figure 06 : classification des ovocytes bovins après récolte selon Hanzen (2016) A: Ovocyte grade 01, B: Ovocyte grade 02, C: Ovocyte grade 03, D: Ovocyte grade 04.....	20
Figure 07 : Les changements dynamiques de la configuration de la chromatine dans la vésicule germinale du stade GV0 au stade GV3 d'après Luciano <i>et al</i> , 2012.....	21
Figure 08 : Matériel et produits utilisés lors de la récolte et le transport des ovaires...43	
Figure 09 : Produits utilisés pour la désinfection la paille.....44	
Figure 10 : Matériel et produits utilisés pour la préparation des ovaires à la ponction.....	44
Figure11 : Matériel et produits utilisés pour la ponction des follicules, la récolte du liquide folliculaire et la conservation et l'observation des ovocytes.....	45
Figure 12 : Ponction des follicules en surface.....	45
Figure 13 : Le liquide obtenu à partir de la ponction des follicules d'un diamètre inférieur à 5mm.....	46
Figure14 : Matériel nécessaire pour la préparation et la conservation du liquide folliculaire: a)seringue 10ml vide , b)tube sec c) centrifugeuse réglée à 2000 tours pendant 10 minutes, d) tube Eppendorf pour la conservation du liquide folliculaire à -20C°, e) bain mari réglé à 56C° pendant 30 minutes pour l'utilisation du liquide folliculaire décongelé.....	47
Figure15 : classification des COCs observés sous microscope inversé: a) Ovocyte classe I, b) ovocyte classe II, c) ovocyte classe III, d) ovocyte classe IV.....	48
Figure 16 : Matériel et roduits utilisés pour le rinçage des COCs: a) paillette attachée à une seringue 2.5ml, b) milieu de rinçage PBS, c) milieu de rinçage et ovocytes MOFA.....	48
Figure17 : Les 3 milieux de rinçage des COCs sélectionnés.....	49
Figure 18 : a) boîte de 24 puits stérile, b) la boîte multi-puits prête pour la mise en culture des COCs.....	49
Figure 19 : Préparation de l'atmosphère d'incubation: a) boîte multi-puits, sac en plastique refermable, seringue 50ml, boîte de Pétri remplie de NaCl 9%, b) bonbonne à CO2, c) étuve réglée à 38C°, d) la mise en incubation des COCs pendant 24h.....	50

Figure 20: a) milieu de transport et de maturation des ovocytes MOFA emballé , b) tube du milieu de transport et de maturation des ovocytes MOFA, c) mise en incubation des COCs dans le système SMM.....51

Figure 21 : Les ovocytes expansés après maturation.....54

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (Drion et Beckers., 1996).....	5
Tableau 02 : Caractéristiques du développement folliculaire chez la vache (Gayrard, 2007).....	8
Tableau 01 : Tableau synthétique des techniques de ponctions des ovaires, des milieux et des conditions de leur transport.....	ANNEXES
Tableau 02 : Tableau synthétique des milieux et des conditions de la maturation ovocytaire in vitro.....	ANNEXES
Tableau 03 : Résultats du premier milieu après MIV.....	52
Tableau 04 : Résultats du deuxième milieu après MIV.....	52
Tableau 05 : Résultats du troisième milieu après MIV.....	53
Tableau 06 Résultats du quatrième milieu après MIV.....	53

Résumé:

Cette étude a été menée pour développer les techniques pratiquées durant la maturation des ovocytes bovins in vitro et permettre le choix de la composition du milieu idéal pour cette étape importante et pour tester sa faisabilité au laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida.

Nous avons récolté les ovocytes après ponction des ovaires d'abattoir, ces derniers ont été acheminés dans une solution saline seule à une température ambiante. Nous avons testé 04 milieux de maturation in vitro des ovocytes bovins.

Selon les auteurs (Garcia *et al.*, 1988; Bruyere., 2002; Sadeesh *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015; Satitmanwiwat *et al.*, 2015; Bohlooli *et al.*, 2015), nous avons choisi le milieu TCM199 comme milieu de base.

D'après nos résultats, le taux global de maturation est de 56,77%. Dans la première expérimentation, nous avons testé le milieu de base seul et a donné un taux de maturation égal à 54,34%. Dans la deuxième expérimentation, nous avons enrichi le milieu de base avec 10% de liquide folliculaire, ce qui a donné un taux de maturation de 52,54%. Dans la troisième expérimentation, on a rajouté 50% de liquide folliculaire au milieu de base pour obtenir un taux de maturation de 63,79%, plus élevé qu'aux précédents. Dans la quatrième expérimentation, nous avons testé le milieu de transport et de maturation des ovocytes produit par le laboratoire MOFA, et nous avons obtenu un taux de maturation égal à 56,16%. A partir de ces résultats, nous avons constaté la nécessité de développer certaines techniques de manipulation et d'enrichissements du milieu de base afin d'améliorer la qualité ovocytaire et augmenter les taux de maturation in vitro.

Mots Clés: Maturation, ovocytes, Bovin, milieu, techniques, enrichissements.

Abstract:

This study was conducted to develop the techniques used during the maturation of bovine oocytes in vitro and to allow the choice of the composition of the ideal environment for this important stage and to test its feasibility in the laboratory of the Institute of Veterinary Sciences of Blida.

We harvested the oocytes after puncture of the slaughterhouse ovaries, which were transported in saline solution alone at an ambient temperature. We tested 04 in vitro maturation media of bovine oocytes.

According to the authors (Garcia *et al.*, 1988; Bruyere., 2002; Sadeesh *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015; Satitmanwiwat *et al.*, 2015; Bohlooli *et al.*, 2015), TCM199 medium was chosen as the base medium.

According to our results, the overall maturation rate is 56.77%. In the first experiment, we've tested the basic medium alone and gave a maturation rate equal to 54.34%. In the second experiment, we've enriched the base medium with 10% follicular fluid, which gave a maturation rate of 52.54%. In the third experiment, 50% follicular fluid was added to the base medium to obtain a maturation rate of 63.79%, higher than in the previous ones. In the fourth experiment, we've tested the shipping and maturation medium of the oocytes produced by the MOFA laboratory, and we've obtained a maturation rate equal to 56.16%. From these results, we have seen the need to develop certain manipulation techniques and enrichments of the basic medium in order to improve the oocyte quality and increase the rates of maturation in vitro.

Keywords: Maturation, oocytes, bovine, mediums, techniques, enrichments.

Introduction générale:

En Algérie, le cheptel bovin occupe une place économique importante et les besoins des citoyens augmentent de plus en plus en terme de quantité et de qualité, cependant, nos recherches doivent s'intéresser à l'amélioration des performances des animaux pour satisfaire ces besoins.

Après l'insémination artificielle qui a permis de sélectionner les taureaux selon leur qualité génétique et sa transmission à leurs descendances, nous devons nous intéresser à une étape plus développée, celle de la fécondation in vitro. Cette dernière nous permettra de sélectionner les mâles et les femelles pour une amélioration génétique plus poussée.

Notre recherche s'intéresse à la maturation des ovocytes bovins in vitro qui est la première étape de la FIV (Fécondation in vitro). Cette étape très importante, permet d'obtenir des ovocytes matures prêts à être fécondés au laboratoire.

Le but de notre étude est d'améliorer les techniques et de choisir les milieux adéquats pour avoir un taux de maturation élevé.

Introduction:

Les ovaires sont de petites glandes paires, de forme ovoïde, situés en position latérale de la cavité pelvienne (Gayrard., 2007). Ils sont constitués d'une medulla centrale par où pénètre l'innervation et la vascularisation sanguine et lymphatique et d'un cortex périphérique qui est le siège de l'activité folliculaire (Gayrard., 2007). Ils assurent les fonctions germinales (production d'ovocytes) et endocrines (sécrétions d'œstrogènes, progestérone) (Gayrard, 2007). La fonction de l'ovaire bovin est de produire à chaque ovulation un ovocyte fécondable et de créer un environnement hormonal propice au démarrage éventuel d'une gestation (Monniaux *et al.*, 2009). Au sein de l'ovaire, deux processus de développement étroitement imbriqués, l'ovogenèse et la folliculogenèse, déterminent le nombre et la qualité des ovocytes produits (Monniaux *et al.*, 2009).

I-1- L'ovogenèse:

L'ovogenèse est un processus de développement long et discontinu qui aboutit à la formation, la croissance et la maturation des gamètes femelles (Monniaux *et al.*, 2009). Il débute pendant la vie fœtale et peut prendre des mois (Gayrard, 2007). Selon Norris et Lopez (2011), elle est définie comme l'ensemble des mécanismes qui permettent aux cellules germinales de l'embryon de se diviser, se développer en follicule jusqu'à atteindre le stade de follicule primordial, et à la méiose qui va conduire à la formation de gamètes haploïdes ou l'ovule.

La phase de multiplication débute pendant la vie embryonnaire, du 45^{ème} au 150^{ème} jour de la vie intra-utérine chez la vache (Drion et Beckers., 1996) et se termine avant la naissance, les ovogonies se multiplient par mitose jusqu'à leur entrée en méiose (Gayrard, 2007). Cette dernière débute au stade fœtal, se bloque au stade de prophase de première division méiotique lors de la formation des follicules ovariens, puis reprend à l'ovulation pour se bloquer à nouveau au stade de métaphase de deuxième division méiotique, stade auquel l'ovocyte mature est expulsé dans les voies génitales femelles, Ce blocage ne sera levé qu'à la fécondation si jamais elle aura lieu (Monniaux *et al.*, 2009).

Chez la vache, la phase de multiplication par mitoses successives des ovogonies est en général terminée avant ou peu après la naissance (Drion et Beckers., 1996). L'importance de ce stock folliculaire constitué dépend de l'espèce (16.000 chez la brebis, 235.000 chez la vache) de la race, de l'individu, de l'âge, du niveau hormonal ou du statut de reproduction (Betteridge *et*

al., 1989 ; Driancourt *et al.*, 1991a ; Russe., 1983 ; Erickson., 1966b ; Peters., 1976 ; Erickson *et al.*, 1976 ; Cahill., 1981) . Cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal, Chez la vache, le nombre de follicules primordiaux a été estimé à 40.000 vers l'âge de 2 à 3 ans et à 2500 entre 12 et 14 ans (Erickson., 1966b).

I-2- La folliculogénèse:

La folliculogénèse, commence au démarrage de la croissance du follicule primordial et se termine à l'ovulation, c'est un processus continu qui se termine par la dégénérescence (ou atrophie) de plus de 99% des follicules en croissance (Monniaux *et al.*, 2009).

La phase d'accroissement se déroule au sein du follicule (Gayrard., 2007). L'ovocyte I s'entoure d'une assise de cellules folliculeuses, ébauche de la granulosa (Gayrard., 2007). Elle est séparée du stroma ovarien par une membrane basale, l'ensemble constitue le follicule primordial (Figure 01) (Gayrard., 2007).

Les cellules folliculeuses prolifèrent pour former d'abord un épithélium cubique monostratifié puis une structure pluristratifiée : la granulosa (Gayrard., 2007) (Figure 01). Lors du démarrage du développement folliculaire, les cellules de granulosa commencent leur activité de prolifération qui atteint un maximum en fin de la folliculogénèse basale. En parallèle, ces cellules synthétisent de nombreux facteurs de croissance (EGF epidermal growth factor, FGF fibroblast growth factor, AMH anti-Mullerian hormone) et des cytokines (KITLG KIT ligand) (Monniaux *et al.*, 2009), en particulier la production d'AMH, faible à indétectable dans les follicules primaires, augmente dans les follicules préantraux pour atteindre un maximum en fin de folliculogénèse basale (Visser et Themmen., 2005). L'assise cellulaire la plus interne conserve sa morphologie épithéliale cubique et prend le nom de corona radiata (Gayrard., 2007). Pendant ce temps, l'ovocyte I entre en accroissement (Gayrard., 2007). Dans l'interstice qui le sépare de sa corona radiata se dépose une couche mucoprotéique formée conjointement par l'ovocyte et les cellules de la corona radiata : la zone pellucide (Gayrard., 2007). A ce stade, le follicule est qualifié de follicule primaire (Gayrard., 2007) (Figure 02). Au terme de l'évolution du follicule primaire, l'ovocyte a presque atteint son diamètre maximum (Gayrard., 2007). Les follicules primordiaux et primaires constituent le groupe des follicules pré-antraux (Gayrard., 2007).

La prolifération des cellules de la granulosa se poursuit activement, augmentant le diamètre du follicule. Au sein de la granulosa apparaît une cavité ou antrum formée par la coalescence d'inclusions expulsées par les cellules folliculeuses. Le follicule prend le nom de follicule secondaire ou antral (Gayrard, 2007) (Figure 01). Selon Monniaux *et al.*, (2009), à partir

de deux couches de cellules de granulosa, le follicule est appelé secondaire ou préantral (Figure 01). Bruyere., 2002 a différencié la phase préantrale de la phase antrale en caractérisant la taille ovocytaire qui varie de 30 à 90 um et de 90 à 120 um de diamètre respectivement.

Quand le follicule atteint une taille voisine de 0,2 mm de diamètre, une cavité, appelée antrum, se forme à l'intérieur de la granulosa. C'est dans l'antrum que s'accumulent les produits de sécrétion des cellules folliculaires (granulosa et thèque), ainsi que les substances plasmatiques diffusant librement à partir des capillaires sanguins qui irriguent la thèque. A ce stade, le follicule à antrum, appelé aussi follicule tertiaire (Monniaux *et al.*, 2009). Des vaisseaux sanguins colonisent les deux thèques, mais ne traversent pas la membrane basale, laissant la granulosa avascularisée (Gayrard, 2007). La croissance folliculaire jusqu'au stade préovulatoire s'effectue essentiellement par accroissement du volume de l'antrum (Monniaux *et al.*, 2009). L'ovocyte est refoulé à un pôle de l'antrum, entouré de sa zone pellucide et de quelques assises de cellules folliculeuses. L'ensemble, qui fait saillie dans l'antrum, prend le nom de cumulus oophorus (Gayrard, 2007).

Chez tous les mammifères, le follicule ovarien présente dès la formation de l'antrum un aspect caractéristique : la thèque externe, la thèque interne séparée de la granulosa par la lame basale, l'ovocyte et son noyau ou vésicule germinative au sein d'un massif de cellules de la granulosa appelé cumulus oophorus. La cavité intrafolliculaire contient un liquide dont la composition est proche de celle du plasma sanguin. Il existe des communications intercellulaires entre les cellules de la granulosa et entre les cellules du cumulus et l'ovocyte: « gap junctions » ou jonctions perméables . Ces jonctions assurent le couplage ionique des cellules et le passage de petites molécules (poids moléculaire inférieur à 1 kDa). Elles pourraient ainsi permettre le passage de facteurs inhibiteurs de la méiose, sécrétés par les cellules de la granulosa (Gayrard, 2007).

L'étape finale de la croissance folliculaire est le follicule préovulatoire dénommé follicule de De Graaf, son diamètre est de 15 à 20 mm chez la vache (Gayrard, 2007).

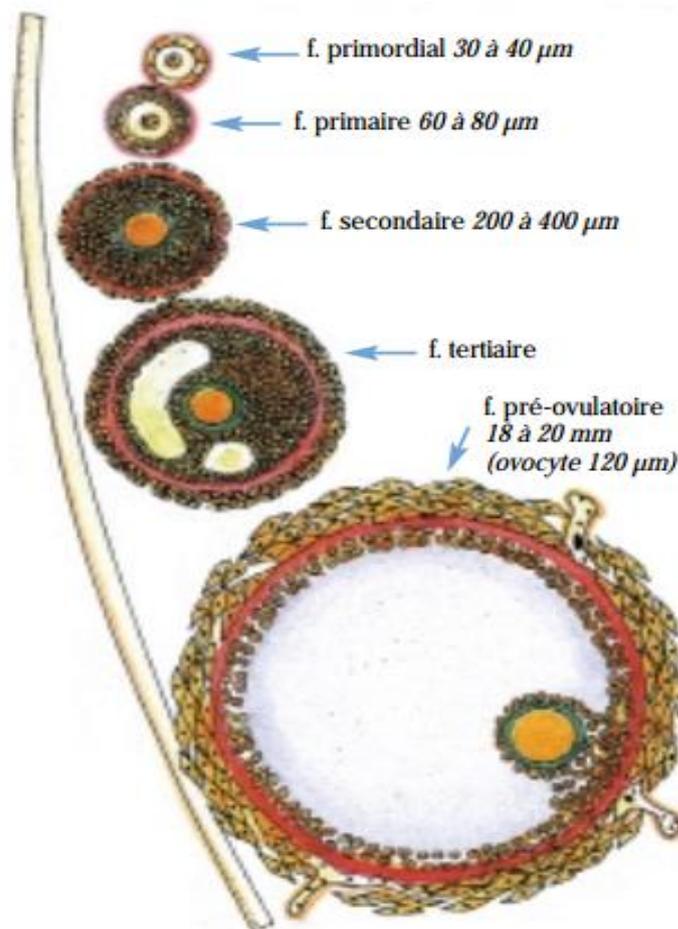


Figure 01: Représentation schématique de l'évolution d'un follicule (D'après Secchi) (Drion et Beckers., 1996).

Tableau 01: Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (Drion et Beckers., 1996).

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

I-2-1- La folliculogénèse basale (gonadotrophine indépendante):

La folliculogénèse basale se déroule apparemment normalement en l'absence de FSH (hormone folliculo-stimulante) (Monniaux *et al.*, 2009).

La folliculogénèse basale est contrôlée par de nombreux facteurs de croissance, d'origines ovocytaire et somatique, agissant essentiellement selon un mode paracrine de régulation. C'est au cours de cette phase que s'effectue l'essentiel de la croissance de l'ovocyte, à partir d'un diamètre initial de 20 à 30 microns, et que l'ovocyte acquiert la compétence méiotique, c'est-à-dire la capacité à reprendre la méiose (bloquée au stade diplotène/diacinèse) quand il est extrait de son follicule (Monniaux *et al.*, 2009).

Les cellules de la thèque interne expriment, dès leur formation, des facteurs de croissance, des récepteurs de LH (hormone lutéinisante), ainsi que des enzymes et des facteurs-clés de la stéroïdogénèse, permettant la synthèse de progestagènes (CYP11A1 cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1, STAR steroidogenic acute regulatory protein, HSD3B2 hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2) et d'androgènes (CYP17A1 cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1) (Monniaux *et al.*, 2009).

- Mécanismes de régulation:

Une fois les follicules primordiaux formés, certains vont démarrer leur croissance immédiatement et d'autres vont attendre, pendant plusieurs mois ou plusieurs années, un signal de démarrage de nature encore inconnue (Monniaux *et al.*, 2009).

L'inactivation dans l'ovocyte des facteurs ubiquistes FOXO3 (forkhead box O3) ou PTEN (phosphatase and tensin homolog) induit un démarrage de croissance massif et un épuisement accéléré de la réserve folliculaire (Castrillon *et al* 2003, Reddy *et al* 2008).

Selon Monniaux *et al* (2009), des facteurs d'origine somatique seraient aussi impliqués dans le démarrage de croissance folliculaire. Ainsi la cytokine KITLG (KIT ligand), exprimée par les cellules de granulosa dès le stade de follicule primordial, est capable de stimuler la croissance ovocytaire *in vitro*.

Dès le stade de follicule primaire, l'ovocyte exprime et sécrète les facteurs BMP15 (bone morphogenetic protein 15) et GDF9 (growth differentiation factor 9) qui jouent un rôle crucial dans le déroulement de la folliculogénèse basale. Ces facteurs stimulent la prolifération des cellules de granulosa et favorisent leur survie (Monniaux *et al.*, 2009). Shimasaki *et al* (2004)

ont montré que les cellules de granulosa participent à la croissance ovocytaire par la production de KITLG, dont l'expression est modulée par BMP15 et GDF9 d'origine ovocytaire. Cependant, l'ovocyte contrôle le transport actif d'acides aminés dans les cellules de cumulus, et ces acides aminés peuvent être ensuite transférés à l'ovocyte par l'intermédiaire de jonctions communicantes (Eppig *et al.*, 2005), ce qui montre l'importance majeure de ces jonctions dans le maintien de la croissance et la survie des ovocytes (Carabatsos *et al.*, 2000).

Les cellules thécales contribuent aussi à la régulation du développement folliculaire basal par la sécrétion d'androgènes (testostérone) et de nombreux facteurs de croissance (BMP4 (bone morphogenetic protein 4), BMP7 (bone morphogenetic protein 7), NGF (nerve growth factor), FGF7 (fibroblast growth factor 7), EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming growth factor)...) capables de stimuler la prolifération des cellules de granulosa (Monniaux *et al.*, 2009).

L'administration de FSH est capable de stimuler la prolifération des cellules de granulosa des follicules préantraux et des petits follicules à antrum. Au cours des cycles sexuels, de modestes fluctuations de concentrations de FSH dans le sang régulent la transition vers le développement folliculaire terminal et le démarrage des vagues folliculaires. L'insuline et l'IGF1 (insulin-like growth factor 1) stimulent cette transition en augmentant la sensibilité folliculaire à FSH (Mazerbourg *et al.*, 2003).

I-2-2- La folliculogenèse terminale (gonadotrophine dépendante):

Selon Monniaux *et al.* (2009), le développement folliculaire terminal est strictement dépendant de la présence de gonadotropines, et particulièrement de FSH qui en est le chef d'orchestre.

L'apparition de récepteurs de LH sur les cellules de granulosa est la signature d'une maturité complète du follicule, qui devient apte à ovuler. Cette maturité finale est atteinte pour des tailles folliculaires variant entre 10 à 20 mm de diamètre chez la vache (Monniaux *et al.*, 2009). La folliculogenèse terminale est contrôlée essentiellement par la FSH et la LH, mais de nombreux autres facteurs (facteurs de croissance, matrice extracellulaire, protéases, stéroïdes), d'origine locale ou endocrine, agissent en synergie avec les gonadotropines pour réguler son déroulement (McGee *et Hsueh.*, 2000).

Eu début de la folliculogenèse terminale, l'ovocyte termine sa croissance à un diamètre folliculaire de 3 à 4mm, puis il subit des remaniements chromatiniens associés à l'acquisition

de la compétence au développement, c'est-à-dire la capacité à assurer un développement embryonnaire normal après fécondation (Monniaux *et al.*, 2009).

Au cours de la folliculogénèse terminale, les cellules de granulosa perdent progressivement leur activité de prolifération et de synthèse d'AMH, et se différencient en cellules stéroïdogènes par l'apparition et l'augmentation de l'expression des gènes CYP11A1, STAR, HSD3B2, et surtout CYP19A1 qui code l'enzyme aromatasase, permettant la synthèse d'œstradiol à partir des androgènes d'origine thécale (Monniaux *et al.*, 2009).

En fin de cycle ovarien, le pic préovulatoire de LH induit d'importants changements fonctionnels dans les cellules de granulosa et de thèque du follicule préovulatoire, conduisant à leur lutéinisation et à la formation du corps jaune (Monniaux *et al.*, 2009).

I-2-2-1- Les vagues folliculaires:

Le développement folliculaire terminal se déroule sous forme de vagues folliculaires. Une vague folliculaire correspond à la croissance synchrone d'une cohorte de follicules, suivie de la sélection d'un ou plusieurs follicules appelés dominants, et de leur évolution vers l'ovulation ou de leur régression quand les conditions endocriniennes sont défavorables (Monniaux *et al.*, 2009).

Tableau 02: Caractéristiques du développement folliculaire chez la vache (Gayrard, 2007)

Espèce	Nombre de follicules	Nombre de vagues folliculaires/ cycle	Diamètre du follicule pré-ovulatoire (mm)
Vache	3-10>4mm	2 ou 3	10-20mm

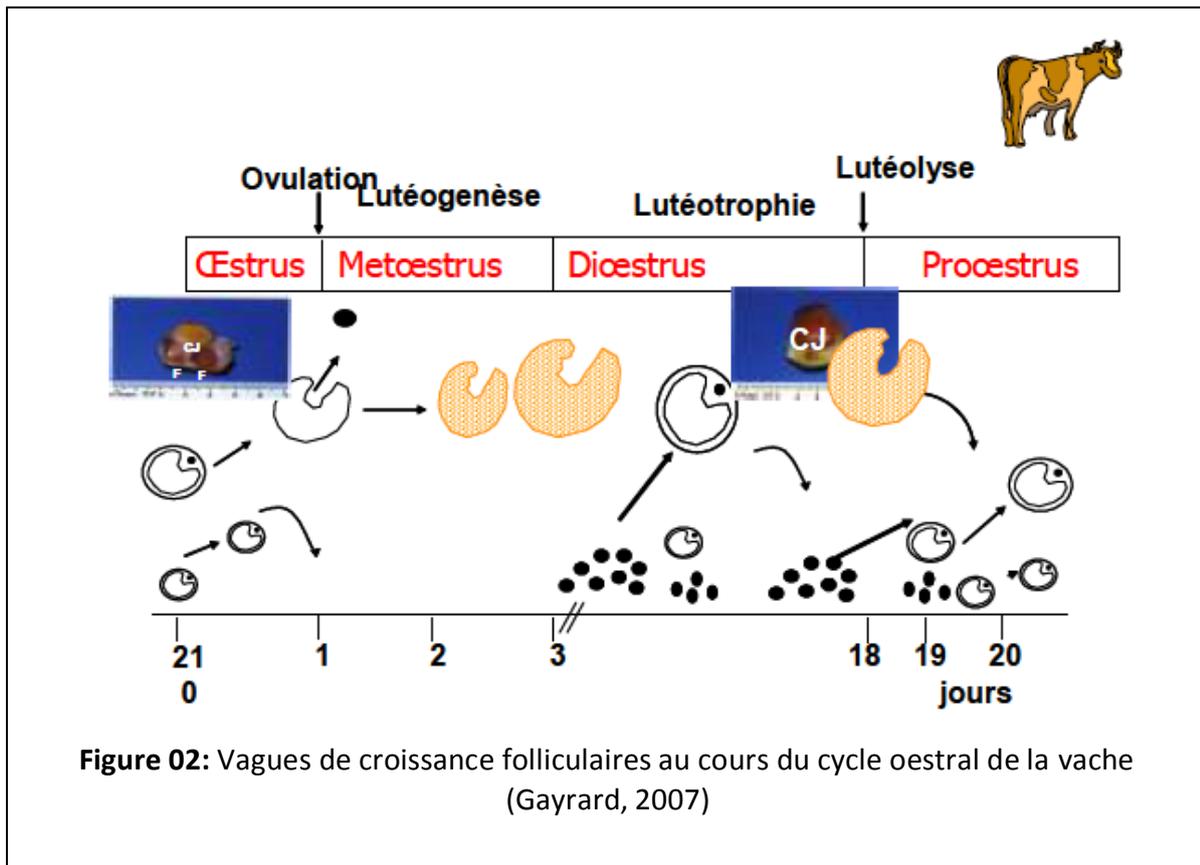
Dans toutes les espèces, la vague du développement folliculaire terminal qui aboutit à l'ovulation démarre au moment de la lutéolyse, l'ovulation ayant lieu en fin de phase folliculaire du cycle sexuel (Monniaux *et al.*, 2009).

Pendant la période prépubère, les follicules régressent à partir du stade à antrum. Au moment du début de l'activité sexuelle (puberté), il y a maturation du ou des follicules qui deviennent ovulatoires. Un follicule ovulatoire est un follicule arrivé au stade final de croissance et susceptible d'ovuler lorsque la décharge gonadotrope ovulante (la LH) a lieu.

Il est caractérisé par :

- Une taille maximale (de 15mm) (tableau 02)
- L'atrésie des follicules de taille inférieure immédiatement (le plus gros follicule sain mesure 8mm chez la vache)

- Un rapport œstradiol/progestérone élevé dans le liquide folliculaire à la différence des follicules atrétiques.
- Présence de récepteurs à LH sur les cellules de la granulosa
- Production d'inhibine élevée
- Augmentation du flux sanguin (Gayrard, 2007).



Parmi les peptides ovariens, l'inhibine, inhibe la sécrétion de FSH. L'activine exerce une action paracrine et autocrine et stimule la synthèse des récepteurs à FSH. La follistatine est une protéine de liaison de l'activine qui inhibe l'action de l'activine (Gayrard, 2007) (Figure 02).

La croissance folliculaire terminale commence à une taille folliculaire de 3-5 mm chez la vache, C'est la taille critique au-delà de laquelle la croissance du follicule est strictement dépendante de niveaux minimaux de FSH (Monniaux *et al.*, 2009).

L'atrésie est le devenir de la majorité des follicules. Elle entraîne la régression du follicule jusqu'à sa disparition. D'un point de vue morphologique, elle est identifiée par la diminution de la taille du follicule visualisé par échographie et par l'accumulation de pycnose (grains de chromatine condensée) dans les cellules de la granulosa. D'un point de vue

fonctionnel, elle est associée à une réduction de la stéroïdogénèse qui résulte d'une diminution de l'activité aromatasase (accumulation de testostérone) (Gayrard, 2007).

I-2-2-2- Le follicule pré-ovulatoire et maturation ovocytaire:

En réponse au pic préovulatoire de LH, l'ovocyte entre en phase de maturation. La reprise de la méiose s'accompagne de modifications structurales et biochimiques au sein du cytoplasme, et est associée à une différenciation des cellules du cumulus (Monniaux *et al.*, 2009).

Au cours de la folliculogénèse, depuis la formation du follicule primordial jusqu'à la phase de croissance finale du follicule dominant, l'ovocyte est bloqué en prophase de première division méiotique et ce blocage est maintenu essentiellement par un niveau élevé d'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) intra-ovocytaire. In vitro, la reprise de méiose intervient spontanément quand le complexe ovocyte-cumulus est sorti du follicule et résulterait de l'arrêt de l'apport de ce facteur inhibiteur (Monniaux *et al.*, 2009). In vivo, le pic préovulatoire de LH induit la phosphorylation de la connexine 43 (GJA1) qui constitue les jonctions communicantes, bloquant ainsi le passage d'AMPC par interruption du couplage métabolique entre les cellules folliculaires et l'ovocyte (Norris *et al.* 2008).

Selon les auteurs, La rupture de la vésicule germinale (Germinal Vesicle Break Down ou GVBD) est le premier signe visible de maturation, d'après Monniaux *et al.* (2009), elle se produit dans les heures qui suivent le pic préovulatoire de LH et elle commence par un plissement de l'enveloppe nucléaire. Les pores nucléaires disparaissent puis l'enveloppe se fragmente avant d'être dégradée en 6 h. Ensuite, le nucléole disparaît rapidement au contact du cytoplasme puis les chromosomes se condensent durant et après la GVBD et les chiasmas migrent vers l'extrémité des bras chromosomiques (Monniaux *et al.*, 2009). Les chromosomes de l'ovocyte se répartissent sur une plaque métaphasique pour que les premier et second fuseaux méiotiques des deux divisions méiotiques se forment (métaphase I et II) (Brunet *et Maro* 2005, Terret *et Wassmann* 2008). Par la suite, le globule polaire contenant la moitié du complément chromatinien est expulsé dans l'espace périvitellin. C'est à ce stade qu'intervient l'ovulation (Monniaux *et al.*, 2009).

La reprise de méiose repose sur l'activation du MPF (*M-phase Promoting Factor*), hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique, CDC2 (cell division cycle 2), et d'une sous-unité régulatrice, la cycline CCNB1 (cyclin B1). La progression de la méiose s'accompagne

encore de l'activation de la kinase AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) et de la déphosphorylation de la kinase PRKAC (proteine kinase, cAMP-dépendant) (Mermillod et Marchal 1999, Dekel 2005).

D'après Monniaux et al (2009), La maturation s'accompagne d'une dégradation modérée des ARN, d'une désadénylation sélective affectant les messagers à des degrés variables et la réorganisation des composants cytoplasmiques de l'ovocyte sous la dépendance des microtubules (Mermillod et Marchal., 1999). Les granules corticaux migrent vers la zone corticale en s'associant au cytosquelette, les mitochondries forment des agrégats avec le réticulum endoplasmique dans la région périnucléaire. Parallèlement à ces changements, la réserve en lipides et la concentration en glutathion augmentent, ce qui indiquent les changements métaboliques. La reprise de la méiose est corrélée à une augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol (Monniaux *et al.*, 2009).

Le pic préovulatoire de LH induit aussi l'expansion du cumulus qui entoure l'ovocyte. Cette expansion résulte de la sécrétion d'une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique, elle est stimulée par FSH et certains facteurs de croissance (EGF, IGF1). Des facteurs ovocytaires interviennent également dans ce phénomène, notamment le GDF9 (Monniaux *et al.*, 2009). D'après Tanghe *et al* (2002), Le cumulus expansé constitue un micro-environnement protecteur pour l'ovocyte et joue un rôle dans la capacitation des spermatozoïdes avant la fécondation.

I-2-3- Régulation endocrinienne du cycle ovarien:

Pour tous les mammifères, la maturation folliculaire et l'ovulation sont sous le contrôle direct du système hypothalamo-hypophysaire qui intègre les informations des facteurs endogènes et exogènes, et les traduit par des modifications de sécrétion des gonadotropines FSH et LH (Monniaux *et al.*, 2009).

Le début du cycle (J0) correspond au pic préovulatoire de LH, hormone gonadotrope hypophysaire, hormone lutéinisante. Ce pic a lieu peu après le début de l'oestrus (10 h après), il dure 6-7 h et déclenche l'ovulation au bout de 24 heures. Il coïncide avec le pic préovulatoire de FSH, la deuxième hormone gonadotrope hypophysaire, hormone folliculo-stimulante. L'ovulation est suivie d'une seconde élévation des concentrations plasmatiques en FSH (Gayraud, 2007).

Les sécrétions des hormones gonadotropes hypophysaires sont pulsatiles. Gayrard (2007) a défini un pulse comme un épisode de libération hormonale dans le sang, intense mais bref. On désigne souvent par pulse, le résultat de son événement sur les cinétiques hormonales. Un pulse se traduit ainsi par une montée rapide des concentrations sanguines suivie d'une diminution exponentielle liée à la demi-vie de l'hormone (Figure).

Au début de la phase folliculaire, la fréquence des pulses de LH est faible (1 pulse toutes les 3 heures). Elle augmente pour atteindre un pulse d'amplitude faible par heure. Au moment de la décharge préovulatoire de LH, la fréquence élevée des pulses de LH masque le caractère pulsatile des sécrétions. Pendant la phase lutéale, la fréquence des pulses de LH est faible (1 pulse toutes les 6 heures) mais les pulses présentent une grande amplitude (Gayrard, 2007).

Les cellules de la thèque interne possèdent des récepteurs à LH. Les cellules de la granulosa possèdent des récepteurs à FSH. La LH stimule la production d'androgènes par les cellules de la thèque interne. La FSH stimule l'activité aromatasase des cellules de la granulosa et donc la synthèse d'oestrogènes. La FSH induit des récepteurs à LH sur les cellules de la granulosa, la LH stimule la synthèse de progestérone par les cellules de la granulosa (Gayrard, 2007).

Au début de la phase folliculaire du cycle, les concentrations plasmatiques en œstradiol sont faibles (quelques pg/mL). Cependant, l'augmentation de la pulsativité de LH est responsable de l'élévation des concentrations d'œstradiol. L'augmentation des taux plasmatiques d'œstradiol induit le comportement d'œstrus et est le signal initiateur de l'ovulation. En effet, lorsque les concentrations plasmatiques en œstradiol ont atteint un certain seuil, l'œstradiol déclenche par rétroaction positive le pic préovulatoire de LH et FSH qui induit l'ovulation 24 heures plus tard. La décharge ovulante de LH/FSH induit à la fois la rupture du follicule, l'ovulation et la maturation de l'ovocyte (reprise de la méiose) (Gayrard, 2007).

Après l'ovulation, la lutéinisation, comme Gayrard (2007) l'a défini c'est une transformation à la fois morphologique et fonctionnelle du follicule qui a ovulé. Les cellules lutéales dérivées des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque synthétisent de la progestérone sous l'influence de LH (hormone lutéotrope). La présence d'un corps jaune coïncide donc avec une augmentation importante des sécrétions de progestérone accompagnée de l'inhibition des sécrétions d'œstradiol.

Introduction

La production in vitro (PIV) à partir d'ovocytes immatures implique trois étapes : la maturation in vitro (MIV), la fécondation in vitro (FIV) et le développement in vitro (DIV) des zygotes jusqu'au stade voulu pour le transfert & une femelle receveuse.

L'étape la plus importante dans la production d'embryons in vitro est la maturation du follicule avec des ovocytes immatures qui sont bloqués au stade diplotène en prophase de la première division méiotique (Nandi *et al.*, 2002).

II.1 Collecte des ovocytes bovins in vivo:

Sur un animal vivant, la collecte se fait par ponction écho-guidée ou OPU (Ovum Pick Up), elle est réalisée à l'aide d'un dispositif muni d'une sonde à ultrasons et une aiguille rétractable reliée à un système d'aspiration (figure 03). Cette technique peut être appliquée une à deux fois par semaine pendant plusieurs mois avec l'obtention de 3 à 4 complexes ovocytes cumulus (COCs) à chaque séance sans affecter apparemment la fertilité ultérieure des animaux (Nibart et Marquant-Leguienne., 1995), mais une importante variabilité est notée entre les femelles donneuses d'ovocytes (Colleau *et al.*, 1998).

D'après Barceló-Fimbres *et al* (2015), la plupart des embryons bovins commercialisés nécessitent la collecte des COCs par la technique OPU effectuée à la ferme pour être transportés au laboratoire de PIV utilisant un milieu de maturation en présence de dioxyde de carbone (CO₂).

Les COCs obtenus après OPU peuvent être transportés au laboratoire dans un milieu de transport et de maturation avec FBS et huile minérale produit et emballé par Mofa avec l'assurance qualité (anonyme).



Figure 03: technique de ponction écho-guidé chez le bovin (Hanzen., 2016)

II.2 Collecte des ovocytes sur ovaires d'abattoir:

II.2.1 Collecte et acheminement des ovaires

Selon Klumpp., 2004, le temps et la température doivent être pris en considération lors du transport des ovaires car ils sont les deux facteurs clés qui peuvent contribuer aux effets néfastes sur la qualité de l'ovocyte en termes de maturation nucléaire et taux de clivage suivants FIV. Les ovaires récoltés sont transportés jusqu'au laboratoire dans les 03 heures qui suivent l'abattage des animaux dans des tampons à 30-35°C, mais la température la plus appropriée reste à 20°C, d'autant plus que la durée de transport est plus longue (peut aller jusqu'à 24h) (Bruyere., 2002).

Solano *et al* (1994) ont constaté que le stockage des ovaires bovins à 4 ° C pendant 12 ou 24h n'a eu aucun effet significatif sur le nombre total d'ovocytes qui a mûri avec succès et clivée après la fécondation. Cependant, beaucoup moins d'embryons ont atteint le stade blastocyste, ce qui indique que les ovaires bovins peuvent être stockés pendant une courte période à 4 ° C et produisent encore des blastocystes viables.

Les ovaires tenus à 22 ° C ont donné lieu à un plus grand nombre d'ovocytes suite à une maturation par rapport à des ovaires stockés à 5°C et 37°C. Ces résultats suggèrent que la température optimale pour stocker les ovaires jusqu'à l'aspiration est proche de la température ambiante (22 ° C) (Klumpp, 2004). Bohlooli *et al* (2015) ont prouvé que le taux de maturation des COCs a été affecté par le milieu et la température. Ils ont constaté qu'une température de 4 ° C a donné lieu à une maturation plus élevée par rapport à 25°C et 38°C.

Rosenkranz., 1993 a conclu qu'un plus grand nombre d'ovocytes, d'ovaires transportés à 20°C au laboratoire, présentaient une plus grande expansion des cellules du cumulus et des taux de maturation en comparaison avec les ovocytes prélevés sur des ovaires qui avaient transporté à 30°C jusqu'à 37°C avec un taux significatif d'ovocytes qui ont atteint la Métaphase-II (d'ovaires ont été transportés à 20°C). Cette constatation indique qu'une température élevée pendant le transport des ovaires pourrait provoquer des effets néfastes sur la qualité des ovocytes maturés in vitro.

Azambuja *et al.*, 1998 ont démontré que le refroidissement in vitro lors d'une maturation des ovocytes bovins diminue le pourcentage d'ovocytes qui se développent au stade blastocystes suite à une FIV.

Certains ont suggéré que les ovocytes de bovins peuvent être légèrement plus tolérants à la baisse de la température. De plus, il a été suggéré que les ovaires bovins doivent être

maintenus à une température non inférieure à 35°C afin de promouvoir la compétence au développement optimal de l'ovocytes (Pollardet *al.*, 1996).

Wang *et al.* (2011) ont démontré que la température 15 °C était mieux que 30 °C et 35 °C en termes de réduction de l'indice de l'apoptose. Cependant, le taux de maturation élevé qui a été atteint à 4 ° C peut être liée à la basse température, ce qui devrait réduire le métabolisme cellulaire (Chaveset *al.*, 2008), de minimiser la consommation d'énergie, et ralentir le taux d'autolyse des tissus (Salehiet *al.*, 2004). En outre, l'efficacité des enzymes et de l'incidence de l'apoptose diminue aux températures basses (Pedersen *et al.*, 2004).

Bohlooliet *al.*, 2015 ont conclu que le transport des ovaires à 4 C° dans les milieux Charles Rosenkrans (CR1) et K Simplex Optimization Medium (KSOM) qui contiennent l'HEPES est conseillé pour maintenir des taux élevés d'IVM et de clivage (voir annexes - tableau 01) .

Une étude suggère qu'un temps plus court entre l'abattage et l'aspiration a donné lieu à une augmentation de la production de blastocystes (Shioya *et al.*, 1988), ce qui est similaire aux résultats rapportés par Blondin *et al.*, 1997 qui ont constaté que les ovocytes bovins collectés seulement en 4 heures après l'abattage produisent beaucoup plus de blastocystes (30,5%) par rapport aux ovaires ont été aspirés à 6 (13%) et 8 (14,7%) heures après abattage. Dans une étude plus récente, Love *et al.*, 2003 ont constaté que les ovocytes stockés dans les ovaires à une température ambiante pendant 15 à 18 heures étaient moins capables de subir la maturation (27%) que les ovocytes témoins qui ont été aspirés immédiatement après l'abattage(72%). Cependant, Shabparedet *al.*, 1993 n'ont pas trouvé une différence dans les résultats par rapport aux durées dans leur étude.

Bohlooliet *al.*, 2015 ont prouvé que le transport des ovaires dans le CR1 (Charles Rosenkrans) à une température de 4°C est efficace pour maintenir la compétence au développement précoce des ovocytes bovins.

II.2.2 Ponction des follicules

D'après Kouamo *et al.*, 2014 les follicules sont sélectionnés selon leurs diamètres mesurés en 03 catégories: les petits (dont le diamètre est inférieur à 3m), les moyens (entre 3mm et 8mm de diamètre) et les grands (dont le diamètre est supérieur à 8mm).

Il a été montré que le pourcentage d'ovocytes avec des cellules du cumulus expansées varierait considérablement entre les différents milieux utilisés avec les mêmes additifs en

utilisant les techniques d'aspiration et de dissection (Hussain *et al.*, 2015) (voir annexes - tableau 01).

II.2.2.1 Ponction par aspiration

Cette méthode consiste à collecter les ovocytes sur animal mortou après ovariectomie(animal vivant), c'est la technique la moins onéreuse. Elle a ainsi permis la mise au point de la technique MIV/FIV/DIV(Maturation in vitro/Fécondation in vitro/Développement in vitro).Elle est réalisée par ponction et aspiration des follicules visibles à l'œil nu (de 2 à 8 mm de diamètre) (Kumar *et al.*, 1997), à l'aide d'une aiguille de 18G ou 12/10ème liée à une seringue de 5 ou 10 ml ou à une pompe à vide (figure 04). On évalue entre 30 et 60% le pourcentage d'ovocytes récoltés à partir des follicules ponctionnés (Rivera *et al.*, 2000).

Le rendement en ovocytes varie selon la technique utilisée : 2.35 ovocytes sont collectés par vache et par session en utilisant l'aspiration directe des follicules apparents. (Kumar *et al.*, 1997)



Figure 04 : Ponction des follicules d'ovaires bovins par la technique d'aspiration d'après Hanzen, 2016

II.2.2.2 Le slicing (le tranchage):

Le tranchage (Cognié et Baril, 2002), cette technique permet l'obtention des ovocytes de tous les follicules présents dans tout le cortex ovarien quel que soit leur localisation (Hochiet *al.*, 1993 ;Ward *et al.*, 2001; Annemarie*et al.*, 2003). La dissection des follicules antraux peut être pratiquée sur des follicules intacts ou partiels placés dans un milieu de maturation, ainsi que d'exclure les follicules atrétiques (elle permet d'observer la vascularisation, la transparence, et la régularité des couches de la granulosa) et donc, d'obtenir des ovocytes de meilleure qualité (Fouladi*et al.*,1998).

Le rendement avec cette technique est de 3.10 passe à et 6.25 par les techniques respectivement de ponction et le slicing (Kumar *et al.*, 1997).Ce type de collecte est effectué

après sections multiples de l'ovaire à l'aide d'une lame de scalpel dans un milieu de culture après lavage des fragments obtenus (technique trois fois plus longue avec un rendement horaire identique). Le taux de récolte peut augmenter jusqu'à 100% après dissection de l'ovaire (Rivera *et al.*, 2000). Ces sections peuvent être faites en complément à l'aspiration afin d'augmenter le taux de collecte (Coskumet *al.*, 1991; Fukui *et al.*, 2000; Harper et Brackett., 1993; Hasler, 2000; Rivera *et al.*, 2000; Zulkeet *al.*, 1990).

Dolakasaria *et al.*, 2013 ont obtenu un nombre d'ovocytes récoltés par la technique de tranchage significativement plus élevé par rapport à la technique d'aspiration.

La différence des taux obtenus par le slicing comparé à ceux de l'aspiration pourrait s'expliquer par le traumatisme des cellules de cumulus engendrés par cette dernière (Fouladiet *al.*,1998).

II.2.2.3 Digestion enzymatique

C'est Une autre technique de collecte plus développée et plus rentable quantitativement et qualitativement, basée sur l'utilisation d'enzymes. Plus de 200 ovocytes par ovaire sont récoltés après une heure de digestion du tissu ovarien par la trypsine (Fouladiet *al.*, 1998) ainsi que la collagénase, issue de *Clostridium hystolicum* (Nicosia, 1975), à l'état physiologiques, cette enzyme joue un rôle lors de l'ovulation dans la fragilisation et la dissociation du tissu ovarien périfolliculaire qui est de sa nature riche en collagène. D'après Pénélope (2014), le cortex ovarien doit être découper en plusieurs fragments d'environ 01mm² qui seront par la suite mis en incubation durant 20 minutes dans une solution contenant 150UI de collagénase par millilitre de milieu de culture, composé de 95% de TCM199 (Tissue Culture Medium 199) et 05% de sérum de lapin inactivé par la chaleur ainsi que des antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Cependant, il ne faut pas laisser l'enzyme agir plus de 30 minutes afin de ne pas modifier la structure des follicules et leur qualité par la suite.

II.3 Classification des ovocytes récoltés

II.3.1 Selon la morphologie du cumulus (l'expansion) et l'aspect de l'ooplasm

❖ Après la ponction des follicules, Kouamoet *al.*, (2014) ont classé les ovocytes en 04 groupes basés sur la morphologie du cumulus-oophorus et les variations cytoplasmiques des ovocytes.

- Grade 01: ovocyte avec plus de 04 couches de cellules du cumulus compactes, avec un cytoplasme uniformément granulé. (figure 05a)

- Grade 02: ovocyte avec au moins 2 à 4 couches de cellules du cumulus compactes, avec un cytoplasme uniformément granulé.(figure 05b)
- Grade 03: ovocyte avec au moins une couche de cellules du cumulus compacte, avec un cytoplasme uniformément granulé.(figure 05c)
- Grade 04: ovocyte dénudé, sans cellules du cumulus ou couche incomplète de cellules du cumulus, ou encore des cellules expansées ayant un cytoplasme sombre ou inégalement granulé. (figure 05d)

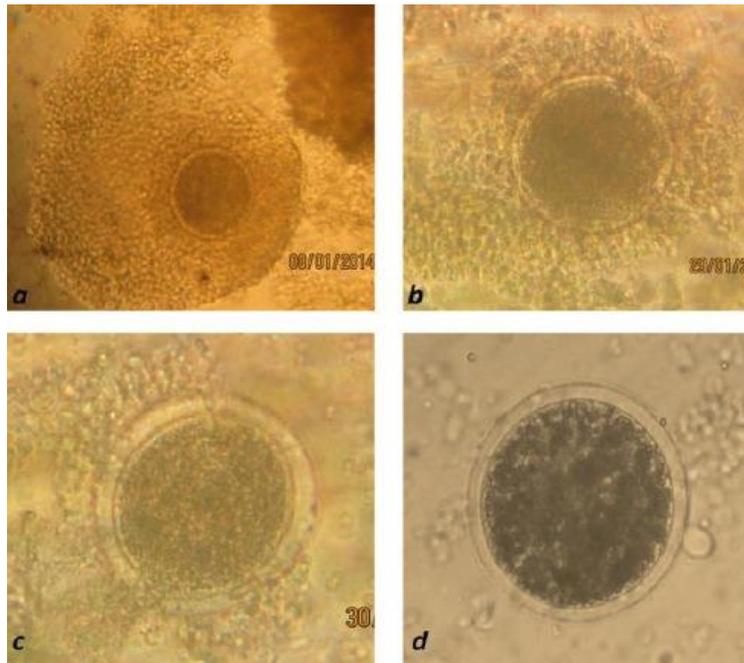


Figure 05 : Classification ovocytaire chez le bovin selon Kouamo *et al.*, 2014. a: Ovocyte grade 01, b: Ovocyte grade 02, c: Ovocyte grade 03, d: Ovocyte grade 04

- ❖ D'après Hanzan (2016), l'ovocyte bovin est classé selon quatre catégories comme il est montré dans la figure 06:
- Classe 1 : avec un aspect transparent du COC, Cumulus compact et Ooplasme homogène (figure 06a)
 - Classe 2 : avec COC et cumulus identique et ooplasme plus irrégulier (figure 06b)
 - Classe 3 : Cumulus moins compact et ooplasme sombre et plus irrégulier (figure 06c)
 - Classe 4 : Cumulus expansé voire absent (ovocytes nus) (figure 06d)

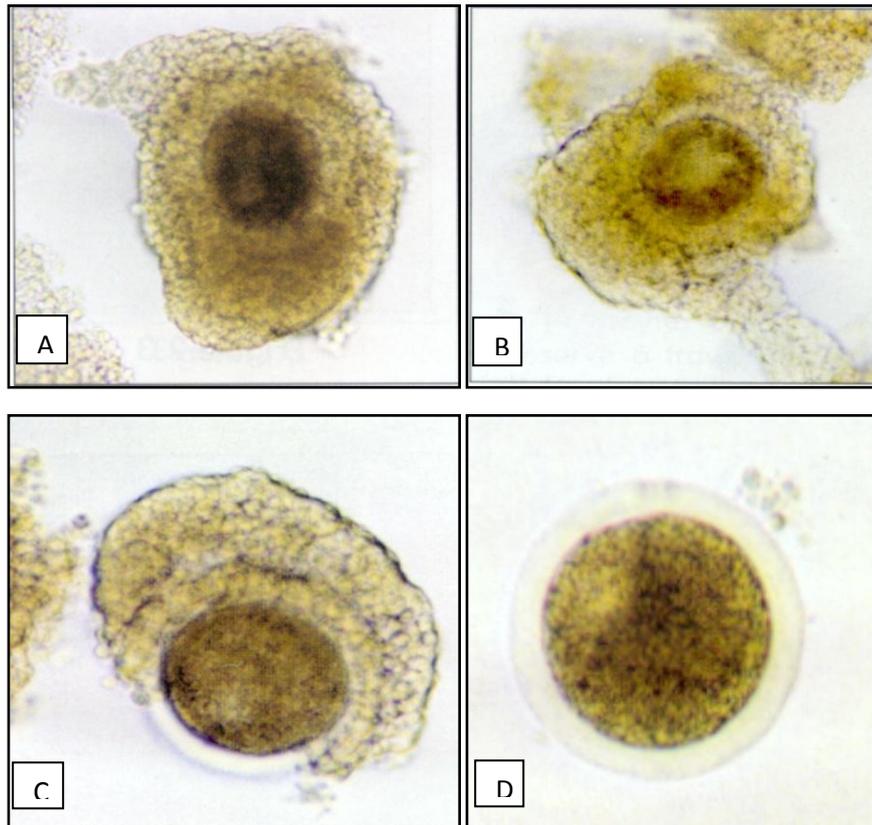


Figure 06 : classification des ovocytes bovins après récolte selon Hanzen (2016)
A: Ovocyte grade 01, B: Ovocyte grade 02, C: Ovocyte grade 03, D: Ovocyte grade 04

II.3.2 Selon l'aspect de la chromatine de la VG

Selon Luciano et Lodde, 2013 l'organisation et l'architecture de la chromatine sont des éléments caractéristiques du processus de différenciation des ovocytes chez les mammifères. Le développement de l'ovocyte se caractérise par des changements impressionnants dans la structure et la fonction de la chromatine dans le noyau, à savoir la vésicule germinale (GV).

Non seulement les différences de configuration de la chromatine nous renseignent sur les modifications morphologiques de l'ovocyte, mais aussi sur sa fonctionnalité (De La Fuente, 2006; Luciano et Lodde, 2013), car il existe une relation directe entre la configuration de la chromatine de l'ovocyte et la compétence au développement embryonnaire, ce qui a été constatée chez la souris et chez la vache (Lodde *et al.*, 2007 ; Luciano *et al.*, 2011 ; Zuccottiet *al.*, 1998, 2002).

Chez la vache, les ovocytes prélevés des follicules antraux présentent quatre modèles de configuration de la chromatine (Figure x) de GV0 à GV3 caractérisée par une augmentation

progressive de la condensation (Lodde *et al.*, 2007), le silençage transcriptionnel (diminution de la transcription) (Lodde *et al.*, 2008; Luciano *et al.*, 2011), la méthylation globale de l'ADN (Lodde *et al.*, 2009)

- Stade GV0 : chromatine filamenteuse et diffuse dans toute la zone nucléaire (figure 07)
- Stade GV1 : représentent le stade précoce du remodelage de la chromatine, un procédé qui commence par l'apparition de quelques foyers de condensation dans les ovocytes (figure 07)
- Stade GV2 : intermédiaires du remodelage de la chromatine, avec formation d'amas distincts de la chromatine condensée dans les ovocytes (figure 07)
- Stade GV3 : est le stade où le plus haut niveau de condensation est atteint avec la chromatine organisée en un seul bouquet (Lodde *et al.*, 2007). (figure 07)

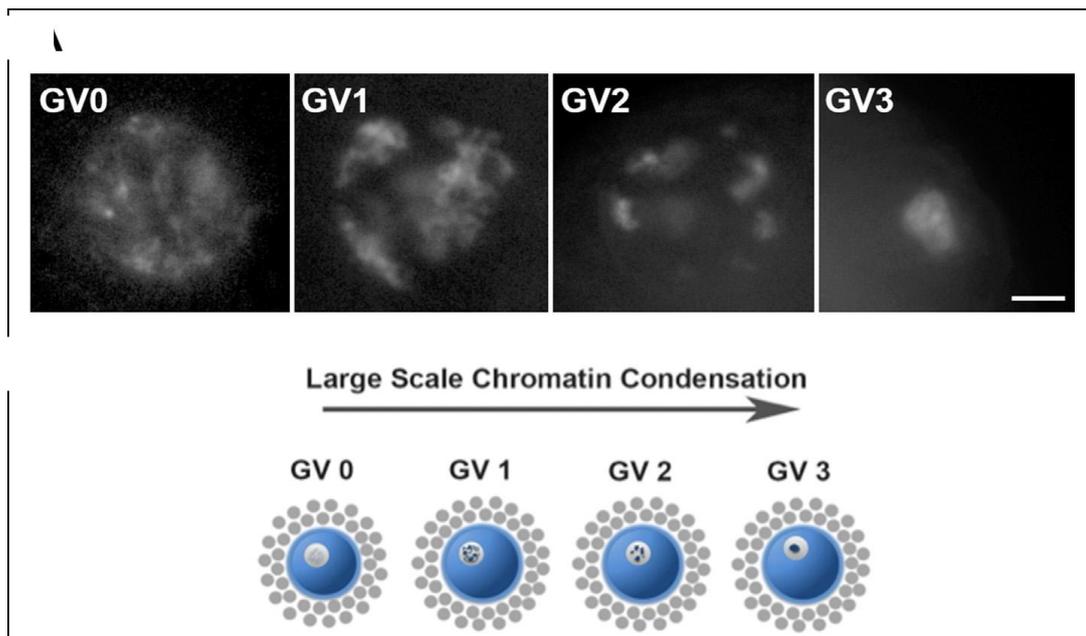


Figure 07: Les changements dynamiques de la configuration de la chromatine dans la vésicule germinale du stade GV0 au stade GV3 d'après Luciano *et al.*, 2012.

Les ovocytes avec une configuration de GV0 ont montré une capacité très limitée de reprendre la méiose I complète après maturation *in vitro*, alors que la quasi-totalité des ovocytes GV1, GV2 et GV3 ont pu atteindre le stade Métaphase II. Au contraire, seul un pourcentage limité d'ovocytes GV1 atteint le stade blastocyte, après la fécondation *in vitro*,

tandis que GV2 et GV3 ovocytes ont montré un potentiel élevé de développement embryonnaire (Loddeet *al.*,2007).Ces résultats confirment que le remodelage de la chromatine peut être considéré comme un marqueur de la différenciation de l'ovocyte et de la compétence au développement.

II.4 La MIV des ovocytes sélectionnés après classification

Quand les follicules bovins immatures sont récoltés de leurs follicules et sont mis en culture dans des milieux standards, ils subissent la première division méiotique (Edward., 1965). L'altération des conditions de la maturation de base peut affecter la compétence de l'ovocyte de manière significative comme en témoigne le rendement du blastocyste et morula après fécondation in vitro (Rose et Bavister., 1992).Les conditions utilisées au début de la maturation jusqu'au stade blastocyste vont agir non seulement sur le développement de la compétence ovocytaire mais aussi sur l'épigénétique normale de l'embryon (Khosla *et al.*,2001).

II.4.1 Les milieux de maturation utilisés dans l'espèce bovine

Dans les conditions naturelles, le processus de maturation ovocytaire implique l'activation et l'inhibition des enzymes, des hormones et des facteurs de croissance, ce qui conduit à une maturation nucléaire et cytoplasmique(Gilchrist et Thompson., 2007).Afin d'améliorer les taux de maturation des ovocytes, il est nécessaire d'enrichir le milieu de maturation ovocytaire approprié avec divers suppléments (Sadeeshet *al.*, 2014).Les milieux de culture doivent reproduire aussi fidèlement que possible les conditions de l'environnement que les cellules trouvaient in vivo. (source Culture des cellules animales). Cependant, L'addition de sérum, d'hormone et d'antibiotique dans le milieu a également amélioré le taux de maturation d'ovocytes bovins (Hussain *et al.*, 2015) (voir annexes - tableau 02). Il a été conclu que le milieu de maturation bovine pourrait être complété avec d'autres composés pour donner des taux de maturation acceptables(Queroet *al.*, 1994).

Kotsuji et al (1994) ont rapporté que 100% des ovocytes bovins mûris lors de la culture avec des cellules de la granulosa seules.

- Milieux de base

Les milieux de base sont tous synthétiques, de composition plus ou moins complexe, portent généralement le nom du chercheur qui les a mis au point par exemple: Eagle, Parker, Ham, Dulbecco, Grace.

On les désigne également par l'appellation MEM = Milieu Essentiel Minimum. Ces milieux sont dits de base car ils assurent seulement la survie des cellules *in vitro*. La prolifération et l'expression des différentes fonctions cellulaires en culture nécessitent l'addition d'une certaine concentration de sérum au milieu synthétique de base (source Culture des cellules animales).

Les milieux de base sont généralement constitués de plusieurs éléments essentiels : sels minéraux (Servent de cofacteurs d'enzymes, jouent un rôle dans la pression osmotique, le potentiel de membrane, les communications, les transports, la régulation du pH et dans l'attachement des cellules), acides aminés (Sous-unités constitutives des protéines), vitamines (Cofacteurs d'enzymes ou précurseurs pour la synthèse de molécules), glucose (Source d'énergie et de carbone), rouge de phénol (Permet de visualiser les variations du pH) et un système tampon (assurant la régulation du pH) (source Culture des cellules animales).

Garcia *et al.*, (1988) ont enregistré un degré élevé de IVM d'ovocytes en utilisant le milieu TCM-199. Il a été rapporté dans une étude plus récente menée par Lorenzo *et al.*, 1993 que l'incidence de la métaphase II ne diffère pas significativement entre les milieux. Baruma, 1995 a confirmé cette constatation et n'a pas observé une différence significative entre les milieux.

Il a été montré que le pourcentage d'ovocytes avec des cellules du cumulus expansées varierait considérablement entre les différents milieux utilisés avec les mêmes additifs. Cette variation pourrait être attribuée à la variation de la composition des milieux de base qui ont été utilisés pour l'IVM (Hussain *et al.*, 2015) (voir annexes - tableau 02). L'incidence des ovocytes avec l'expansion des cellules du cumulus ainsi que les taux de métaphase 1 et 2a ont été jugés plus élevés dans le TCM-199 avec des additifs en pratiquant les techniques d'aspiration et de la dissection et plus bas en milieu de Ham F-10 utilisant les mêmes additifs et les mêmes techniques (Hussain *et al.*, 2015). Cette variation pourrait être due à des différences dans l'efficacité des milieux pour l'IVM d'ovocytes. En effet, cette variation des taux est due à la différence dans la composition de base des milieux utilisés pour l'IVM, ainsi que la durée et la température de l'incubation (Hussain *et al.*, 2015). Barua, 1995 a par contre observé que l'incidence de la Métaphase-I n'a pas différé d'une manière significative entre les milieux TCM-199, Ham F-12 et m-KRB.

L'ajoute de pyruvate de sodium, de gentamicine, de glutamine, liquide folliculaire, FSHp et HIOCS et autres additifs au milieu TCM199 peut donner une meilleure performance de l'IVM

d'ovocytes récupérés de bovins en comparant entre les milieux Ham F-10 et Ham F-12 avec les mêmes additifs (voir annexes - tableau 02) (Hussain *et al.*, 2015).

Wastonet *al.*, 2000 ont proposé que le milieu SOFa (Synthetic Oviduct Fluid Medium) était un milieu de base utile pour les études de la maturation ovocytaire chez le bovin. Les résultats de leur étude ont confirmé ce point de vue. Il a été montré que non seulement le milieu cSOF Maa est un milieu de base efficace pour la culture d'embryons (Xu et al, 1992; Keskintepe et Brackett, 1996; Gardner, 1994; Watson et al, 1994; Walker et al, 1996) mais aussi il peut être utilisé efficacement en tant que milieu de base pour la maturation ovocytaire. Cependant, un nombre de cellules de blastocystes comparable à celui obtenu avec TCM199 est observé lors de maturation des ovocytes dans un milieu cSOFMaa (Watson *et al.*, 2000).

Il est à signaler l'existence d'un nouveau milieu d'expédition et de maturation BoviPRO™ avec FBS (Fetal Bovine Serum) et huile minérale fabriqué aux États-Unis; c'est le premier support commercial autonome et complet pour soutenir le transport et la maturation des complexes COCs dans l'air ambiant après la collecte par OPU ou après aspirations des ovocytes au laboratoire à partir des ovaires récoltés. Ce milieu n'exige pas l'utilisation de gaz CO₂, c'est un milieu de transport et de maturation complet HEPES (FBS, hormones et antibiotiques) sans CO₂, 10 COCs immatures peuvent être transportés et maturés par flacon emballé dans des conditions stériles. Ce système appelé SMM (Shipping and Maturation Medium) nous offre beaucoup d'avantages: c'est un support complet prêt à l'emploi, pratique pour les conditions OPU de terrain, ne nécessite pas un équilibrage du CO₂ lors de transport d'ovocytes, maturation complète des ovocytes à 38,5 ° C après 24 heures d'incubation, les ovocytes matures peuvent être placés directement dans le milieu de fécondation (anonyme).

Barceló-Fimbres *et al.* (2015) n'ont remarqué aucune différence trouvée ($P > 0,1$) pour les taux de clivage au jour 2,5 lorsque le système SMM (Shipping and Maturation Medium) a été comparé au témoin (83,1 contre 84,1% respectivement).

- **Hormones**

Les hormones telles que les gonadotrophines sont souvent ajoutées aux milieux de culture afin d'induire la maturation cytoplasmique, l'expansion du cumulus et améliorer le développement embryonnaire (Calder et Al, 2003).

La culture des COCs bovins en présence d'hormones de croissance accélère le processus de l'expansion des cellules du cumulus, Izadyaret *al.*, 1996 et 1997 ont observé que

l'incorporation de la FSH pourrait provoquer une expansion marquée des cellules du cumulus lors de la IVM des COC pendant 24 heures.

Une maturation des ovocytes *in vitro* en présence de gonadotrophine et d'œstradiol a entraîné un taux de maturation plus élevé par rapport au milieu où aucunes hormones n'ont été ajoutées (Totey *et al.*, 1992).

Choi *et al.*, 2001 ont étudié l'effet des hormones gonadotropes sur la MIV bovine en supplémentation à un milieu TCM199 avec BSA, glutamine et œstradiol. Les résultats sont de meilleures expansions du cumulus en présence de gonadotrophines.

L'addition de l'HCG dans les milieux de culture permet d'optimiser la maturation (Bruyere, 2002).

La LH a des effets bénéfiques sur la maturation ovocytaire bovine (Zuelke, Brackette, 1990), elle augmente le métabolisme du glucose dans les COCs mais diminue les taux d'expulsion du globule polaire, du clivage et du blastocyste à fortes concentrations (Bruyere, 2002). L'apport en LH dans milieux de culture est directement corrélée avec la maturation cytoplasmique ovocyte (Shaet *et al.*, 2010).

La FSH ralentit la reprise de la méiose en allongeant la durée de la condensation des chromosomes (Bruyere, 2002).

La FSH maintient les associations entre les ovocytes en croissance et les cellules du cumulus pendant la culture *in vitro*, probablement en soutenant les ovocytes (Cayo-Colca *et al.*, 2011).

Silva et Knight, 2000 ont étudié les effets des stéroïdes sur la compétence au développement des ovocytes maturés *in vitro*: tandis que la progestérone n'aurait aucun effet, voire un effet négatif sur les taux de clivage et de blastocyste, la testostérone et la dihydrotestostérone stimuleraient les premiers stades du développement embryonnaire.

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

La GH (growth hormone), la TSH (thyroid-stimulating hormone), leTGFa et b (facteur de croissance transformant alpha et beta) ont également des effets bénéfiques sur la maturation d'ovocytes bovins (Bever *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1994).

- Sérums

Le sérum est un mélange de composition extrêmement complexe qui contient, entre autres, un grand nombre de substances libérées par toutes sortes de types cellulaires de l'organisme donneur (Culture des cellules animales).

Pour obtenir la maturation des complexes cumulus-ovocytes bovins (COCs) *in vitro*, les méthodes ont employé le TCM199 (Tissu Culture Medium 199) complété avec 10% de sérum, gonadotrophine et l'œstradiol 17B (Ho et al., 1995; Fukui et Ono., 1989; Xu et al., 1992). Ces conditions soutiennent la maturation méiotique d'environ 90% des ovocytes et ont préparé le terrain pour la fréquence et le développement d'une haute fécondation jusqu'au stade blastocyste (Watson et al., 2000). Le pourcentage de sérum additionné au milieu de base varie, selon le type cellulaire, de 2 à 20 %, le plus souvent de l'ordre de 5 à 10 %, les plus fréquemment retrouvés sont : le sérum de veau, le sérum de veau nouveau-né, le sérum de veau fœtal (SVF), ce dernier ayant les meilleures performances, il a un rôle protecteur en augmentant la viabilité cellulaire et la stabilité des produits cellulaires, une propriétés nutritives et un pouvoir tampon et détoxifiant, d'une autre part, il constitue une source de plusieurs facteurs de croissance, d'hormones, protéines de transport, d'attachement et des propriétés nutritives. Il existe actuellement des mélanges permettant de remplacer le SVF, on peut citer aussi le liquide amniotique enrichi en certains constituants (Culture des cellules animales).

Bruyere (2002) a noté que la supplémentation en sérum chez les ruminants pose un problème sanitaire. Vecteur possible de prion, et a supprimé le sérum de la composition des milieux de PIV.

Le BSA (Bovine Serum Albumine) est typiquement utilisé en tant que supplément protéique pour améliorer la qualité du milieu de culture (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986).

Le SVF (Sérum de Veau Fœtal), le SVO (Sérum de Vache en Œstrus), les hormones (FSH, LH, œstradiol) et les cellules de la granulosa ont été ajoutés au milieu de culture pour déterminer les fréquences de la maturation *in vitro*, la fécondation des ovocytes, le clivage (de 2 à 8 cellules) et le développement des blastocystes (Fukui and Ono., 1989).

Fukui and Ono., 1989 ont conclu que les taux de maturation après 24h de culture ne sont pas significativement différents entre les 3 facteurs testés (56 à 72%). Par contre, les taux de fécondation ont été affectés de façon significative en fonction du type du sérum et de l'ajout des cellules de la granulosa. FCS (Sérum de Veau Fœtal) a donné un taux significativement plus élevé de fécondation (57 à 71%) que le sérum de vache en chaleur (SVC) (34 à 52%), mais les proportions de la fécondation polyspermiq ue étaient significativement plus élevées dans la

première addition (8 à 19%) que dans la seconde (2 à 3%). L'ajout d'hormones n'a pas affecté la fécondation, le clivage et le développement. Les taux les plus élevés de la formation du blastocyste ont été obtenus lorsque les cellules de la granulosa ont été ajoutées seules (FCS 17%, ECS 16%).

Garcia *et al.*, 1988 ont enregistré un degré élevé d'IVM d'ovocytes en utilisant le milieu TCM-199 et ont obtenu 85,70 % d'ovocytes maturés alors qu'il était de 90.60 % en utilisant le TCM-199 + FCS.

Le pourcentage d'ovocytes matures était significativement plus élevée dans les milieux supplémentés avec de l'ECS (sérum de vache en chaleur) (78%), FBS (Sérum de Veau Fœtal) (79%) et le BAF (Fluide AminioticSerum) (77%) par rapport à bFF (Fluide Folliculaire bovin) (52%).

L'incidence de la métaphase II enregistrée par Martins *et al.*, 2005 en utilisant le milieu TCM-199 en combinaison avec de l'OCS10% et du FSH était de 74,60% (Watson *et al.*, 2000).

L'élimination complète de sérum du protocoles de culture a été difficile, et a été d'abord appliqué aux milieux de culture d'embryons. Des étapes transitoires de la supplémentation de sérum ont inclus le remplacement par BSA et, plus récemment, l'addition de PVA et d'acides aminés (Keskintepe et Brackett, 1996; Keskintepe et al, 1995; Krisher et Bavister, 1999; Gardner et Lane, 1993; Walker et al, 1996). Les efforts de recherche ont mis l'accent sur la caractérisation des milieux sans sérum bovin maturation ovocytaire (Keskintepe et Brackett, 1996; Gardner, 1994; Krisher et Bavister, 1999; Gardner et Lane, 1993). Ces études ont rapporté un développement réussi d'embryons de bovins à l'étape de blastocyste suivant la maturation de l'ovocyte sans sérum en utilisant pour le TCM199 sans sérum en grande partie en tant que milieu de maturation de base (Keskintepe et Brackett, 1996; Gardner, 1994; Krisher et Bavister, 1999; Gardner et Lane, 1993).

Mizushima et Fukui (2000) ont utilisé un milieu chimiquement défini (sans sérum ni protéine d'origine animale) telle que le BSA ou la SVF avec une supplémentation du milieu de base TCM199 en PVA (Polyvinyle alcool) et en hypotaurine et B-mecarptoéthanol, donnant des résultats similaires à ceux habituellement obtenus.

1-3-1-Le liquide folliculaire:

Les fonctions du liquide folliculaire consiste en la nourriture à l'ovocyte et les cellules de granulosa en facilitant le transport des nutriments spécialisés du plasma (Klumpp., 2004).

Un total de huit hormones stéroïdes ont été trouvées dans le liquide folliculaire de buffle, avec E2 étant présent dont la concentration la plus élevée lorsque les follicules atteignent environ 15 mm de diamètre (Court., 1962). D'autre part, les concentrations des stéroïdes trouvés dans le liquide folliculaire varient au cours des différentes étapes du cycle de reproduction (Klumpp, 2004). L'analyse biochimique a révélé que le glucose était d'environ 75% de la quantité totale des glucides contenu dans le liquide folliculaire bovin avec du fructose étant présent en tant qu'une seule fraction mineure (Lutwak-Mann., 1954).

Des résultats ont démontré la présence d'une protéine stimulatrice des ovocytes dans le liquide folliculaire de vache, qui peut être isolée (en partie sous forme purifiée) par chromatographie d'ions de la fraction protéique obtenue par saturation (30-50%) avec du sulfate d'ammonium. D'autres caractérisations de la fraction protéique basique sont essentielles pour trouver des molécules ayant un effet positif sur la maturation des ovocytes qui pourrait être utilisé comme complément dans des milieux de culture (Saranya *et al*, 2015).

Le liquide folliculaire a été montré pour être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation du porc (Naito *et al*, 1988; Gallardo *et al*, 2001), moutons (Sun *et al*, 1994), la vache (Romero-Arredondo et Seidel, 1994; Elmileik *et al*, 1995; Kim *et al*, 1996; Choi *et al*, 1998; Avery *et al*, 2003), cheval (Dell 'Aquila *et al*, 1997; Bogh *et al*, 2002; Hinrichs *et al*, 2002) et le buffle (Chauhan *et al*, 1997). Certaines études ont démontré que milieu de maturation complété avec le FF fournit un environnement approprié au développement de l'ovocyte bovine (Romero-Arredondo et Seidel, 1996), car il augmente le degré de l'expansion des cellules du cumulus (Aguilar *et al*, 2001) et augmente le développement embryonnaire (Algriany *et al*, 2004).

Le liquide folliculaire (FF), constitué d'électrolytes, d'hormones, d'acides aminés, et de facteurs de croissance. Il a été utilisé comme un produit naturel qui renforce la maturation cytoplasmique comme il est indiqué par la formation pronucléaire (Gallardo *et coll*, 2001).

Il a été rapporté que les divers éléments du liquide folliculaire sont semblables à ceux trouvés dans le sérum, avec seulement quelques différences (Edwards., 1974; Greve *et al*, 1989; Chance *et al*, 2001). Son PH est similaire aussi à celui du plasma (7,4). Chez la vache, les plus fortes concentrations de potassium et de sodium ont été trouvées dans le liquide folliculaire que dans le sérum (Klumpp., 2004). Cependant, les concentrations de magnésium, le chlorure, le zinc, le cuivre et le phosphate inorganique sont semblables à celles du sérum bovin (Petkov *et al*, 1969).

Des études ont montré que la capacité de développement des ovocytes bovins est affectée par plusieurs facteurs, dont deux comprennent la taille du follicule (Tan et Lu, 1990; Pavlok et al., 1992; Carolan et al., 1996) et la qualité du follicule (Blondin et Sirard, 1994; Blondin et al., 1997; Fouladi et al., 1998).

La production de E2 par les cellules folliculaires est importante dans la promotion de la maturation de l'ovocyte (Kruip., 1985). Cependant, la sélection des follicules qui ont la capacité de produire des quantités suffisantes de E2 est essentielle pour l'IVM des ovocytes bovins (Klumpp., 2004).

La qualité ovocytaire est également liée de façon claire avec la taille folliculaire. Cependant, cette relation est bornée: au-delà de 8mm de diamètre, la compétence au développement de l'ovocyte chute (3 fois plus faible). Cela est probablement dû à une modification de la composition du milieu folliculaire (hormones, cytokines...) (Bruyere., 2002).

La concentration des hormones stéroïdiennes trouvée dans le liquide folliculaire varie avec la taille du follicule, le degré d'atrésie et le stade du cycle et de l'œstrus, ce qui rend la sélection du follicule pour les études in vitro une tâche difficile (Klumpp., 2004). Une augmentation substantielle de la concentration de E2 accompagnée d'une diminution de la testostérone est généralement détectée par une augmentation de la taille des follicules. En outre, il y a une augmentation du taux d'IGF-1 quand la taille des follicules a augmenté dans les deux ovaires porcins et bovins (Hammond et al., 1985; Spicer et al., 1988). Cela pourrait être dû au fait que les fonctions de l'IGF-1 régulent la différenciation des cellules folliculaires (Hazeleger et al., 1995, Austin et al., 2001).

Afin de déterminer l'influence de la taille des follicules sur la compétence des ovocytes bovins, Pavlok et al (1992) ont classé les follicules en trois groupes selon leur taille : 4 à 8 mm (grand), 2 à 4 mm (Moyen) et 1 à 2 mm de diamètre (petit). Après la fécondation in vitro, le développement embryonnaire était enregistré et il a été noté qu'il y avait significativement plus d'embryons clivés à partir d'ovocytes récupérés de grands follicules (68,9%) par rapport à ceux récupérés à partir de moyens (64,3%) ou faibles (19,7%). De même, le développement du blastocyste suivit le même schéma. Significativement plus d'embryons développés au stade de blastocyste après ovocytes avaient été récupérés à partir de grands follicules (27,7%) que des moyens (20,9%) et ceux des petits (0%). Ces résultats démontrent la corrélation entre la taille des follicules et la compétence développementale de l'ovocyte.

Lonergan *et al* (1994) ont également étudié l'effet de la taille des follicules bovins à partir de lesquels les ovocytes proviennent sur leur capacité ultérieure de développement *in vitro*. Les follicules ont été classés en deux groupes en fonction du diamètre: 2 à 6 mm (petits) et > 6 mm (grands). Les taux de clivage ne différaient pas entre les petits follicules (92,9%) et les grands (90,8%). Cependant, le développement de blastocyste était significativement plus faible des ovocytes récupérés à partir des petits follicules (34,3%) par rapport aux ovocytes récupérés des grands follicules (65,9%).

Le liquide folliculaire des grands follicules a un effet inhibiteur réduit sur la maturation ovocytaire par rapport au liquide folliculaire récolté à partir de petites et moyennes follicules (Dostal *et al.*, 1996).

Un autre facteur qui peut être corrélé avec la taille folliculaire et le résultat de la FIV est le diamètre de l'ovocyte (Klumpp, 2004). Fair *et al* (1995) ont identifié une relation possible entre le diamètre des ovocytes bovins et la taille des follicules et l'activité transcriptionnelle de l'ARN. Une corrélation positive a été trouvée entre le diamètre de l'ovocyte et la taille des follicules.

Il a été noté que les ovocytes bovins peuvent atteindre une taille maximale lorsque le follicule est développé à 3 mm. Hendriksen *et al* (2000) ont également documenté que les ovocytes acquièrent la capacité de se développer en un embryon suite d'une FIV au stade folliculaire de 3 mm.

Une légère tendance différente a été remarquée par Choi *et al* (1998) quand ils ont comparé les taux de l'IVM d'ovocytes bovins matures dans un milieu complété avec du liquide folliculaire recueilli à partir des follicules de grande taille (10 à 20 mm) ou trop petite (2 à 5 mm). Il convient de noter que la maturation a été réalisée en co-culture avec les cellules épithéliales oviducte bovin. Significativement plus d'ovocytes matures dans le milieu additionné de bFF des petits follicules (77,9%) par rapport aux grands (69%). Ces résultats indiquent le développement de la capacité des ovocytes bovins matures dans le liquide folliculaire est dépendante du développement du stade de follicules à partir duquel le fluide a été collecté (Choi *et al*, 1998). Bien que les résultats contradictoires ont déjà été signalés par Elmileik *et al* (1995). Les taux de maturation ont également été diminués lorsque le liquide folliculaire bovin a été ajouté au milieu de maturation (Ayoub *et Hunter*, 1993).

Il a été montré que le bFF aspiré à partir de petites, moyennes et grandes follicules a pu inhiber la décomposition de la vésicule germinale, conduisant finalement à une mauvaise production d'embryons (Ayoub et Hunter, 1993).

Autres facteurs, en plus de la taille et de la qualité du follicule, qui affectent l'IVM sont le type du sérum, les hormones et l'addition de cellules du cumulus (Fukui et al, 1997).

D'autres études ont identifié plusieurs substances dans le liquide folliculaire qui ont empêché la reprise de la méiose dans les ovocytes. Des substances inhibitrices mullériennes, des sous-produits des cellules de la granulosa, ont été trouvés pour inhiber la maturation des ovocytes de rats (Takahashi et al, 1986). L'acide linoléique, l'acide gras le plus abondant trouvé dans le liquide folliculaire, était révélé inhiber reprise de la méiose des ovocytes bovins dénudés (Homa et Brown, 1992). En outre, une autre substance, appelée Ovocyte Maturation Inhibitor (OMI), a été rapportée à supprimer la maturation des ovocytes de rats et de porcs (Tzafiriri et al, 1982). La source originale de l'OMI a été pensé pour être les cellules granuleuses (Klumpp, 2004). Hillensjo et al (1979) ont trouvé que l'OMI a inhibé la reprise de la méiose que dans les ovocytes en culture au sein de leurs cumulus intacts, mais n'a pas réussi à affecter la maturation des ovocytes de porcs dénudés. Ceci indique que le signal d'inhibition de l'OMI est communiquée à travers l'ovocyte et les interactions des cellules du cumulus (Tzafiriri et al, 1982).

Chauhan et al (1997) ont remplacé les additifs sériques et hormones avec le liquide folliculaire dans le milieu IVM pour examiner les effets sur la maturation, la fécondation et le développement embryonnaire des ovocytes de buffle. Les taux de maturation nucléaires étaient similaires entre les ovocytes placés dans TCM-199 + 10% FBS + 5 pg / ml pFSH (74%), TCM-199 + 20% de liquide folliculaire (FF) (67%) et le TCM-199 + 40% de liquide folliculaire (67%), mais ceux-ci étaient significativement plus élevés que ces ovocytes matures dans TCM-199 + 10% de FBS (47%). Il y avait aussi une plus grande expansion du cumulus dans ces ovocytes mûri avec 20% ou 40% de liquide folliculaire.

Des résultats comparables ont été obtenus lorsque le liquide folliculaire des grands follicules bovins (≥ 15 mm) a été ajouté au milieu de maturation (Elmileik et al., 1995).

L'utilisation du liquide folliculaire comme un milieu de maturation est suffisante pour favoriser la maturation nucléaire; cependant, il présente des limites pour soutenir le développement approprié de l'embryon (Avery et al, 2003; Coleman et al, 2007). Ces résultats

sont dus à l'effet inhibiteur sur la décomposition de la vésicule germinale et sur la progression de la méiose, le liquide folliculaire conduit à un retard de la maturation nucléaire (Du Colomb et al, 2013). Dans ce sens, l'identification du moment optimal pour la fécondation des ovocytes matures dans le liquide folliculaire pourrait améliorer la production et la qualité de blastocyste.

Considérant que les changements nucléaires majeurs se produisent lors de la maturation ovocytaire, l'évaluation du taux de la maturation nucléaire est un outil utile pour évaluer la compétence de l'ovocyte (Pereira et al, 2010; Prentice et al, 2011). Chez les chevaux, Dell'Aquila et al (1997) et Bøgh et al (2002), en utilisant 100% de liquide folliculaire, ont trouvé des taux de maturation nucléaire de 68,5 et 79%, respectivement. Des résultats contradictoires d'une autre étude qui a été réalisée sur l'ovocyte bovin qui a conclu que des taux inférieurs allant de 43 à 65%, semblable aux rapports de Avery et al. (2003) et Coleman et al. (2007), qui décrivent les taux de maturation nucléaire de 41 et 44%, respectivement, chez les bovins.

Même si le retard de la maturation cytoplasmique promu par le liquide folliculaire pourrait être bénéfique pour les ovocytes, une précédente étude suggère que la maturation cytoplasmique retardée est responsable des anomalies observées lors de la fécondation in vitro et le développement, qui souvent impliqué la migration et la dispersion des cellules granuleuses (Damiani et al., 1996).

Avery et al (2003) et Coleman et al (2007) ont observé une interaction du temps de maturation avec la concentration du liquide folliculaire sur le taux de maturation nucléaire. Les taux de maturation nucléaires réalisés à 28 h maturation dans des milieux contenant des concentrations élevées de liquide folliculaire (75 ou 100%) étaient supérieures à celles observées dans les autres temps de maturation, peut-être à cause du retard de la progression de la méiose causé par le liquide folliculaire, qui prévoit un délai supplémentaire pour les ovocytes d'acquérir des compétences (Pereira et al, 2010; Prentice et al, 2011; Gottardi et al, 2012). Selon Aguilar et al (2001), le ralentissement de la maturation nucléaire fournit plus de temps à l'ovocyte pour synthétiser, de modifier et de stocker de nouvelles protéines et ribonucléoprotéines, et donc améliore sa compétence.

Une étude récente a révélé que le liquide folliculaire favorise la maturation ovocytaire cytoplasmique lors de l'IVM et suggéré que son rôle majeur est de fournir une protection contre le stress oxydatif (Gruppen et Armstrong, 2010).

Helena et al, 2014 ont conclu que l'addition du liquide folliculaire à des concentrations élevées au milieu de culture réduit le développement embryonnaire bien que les

concentrations inférieures ralentissent la méiose, la progression et la migration des granules corticaux, ce qui contribue à l'augmentation du nombre des cellules dans la masse cellulaire interne. Ainsi, le liquide folliculaire ajouté au milieu de maturation à des concentrations plus basses améliore le nombre total des cellules dans l'embryon bovin produit *in vitro*, en particulier les cellules internes de la masse cellulaire.

Avery et al (2003) ont obtenu des taux de clivage insatisfaisants (environ 9%) en utilisant le liquide folliculaire pur. Ces chercheurs ont attribué le faible taux de clivage à la capacité du liquide folliculaire pour provoquer l'adhérence de la matière solide aux cellules du cumulus, formant ainsi une barrière physique qui empêche la pénétration des spermatozoïdes. Cependant, Helena *et al.*, 2014 ont pu surmonter ce problème en utilisant de l'héparine avec du liquide folliculaire filtré ce qui a empêché l'accumulation du solide sur les COCs pour autoriser une fécondation adéquate.

Plusieurs composants du liquide folliculaire, y compris les acides aminés (Hong et Lee, 2007) et les activateurs du plasminogène et de la plasmine (Papanikolaou *et al.*, 2008) se sont avérés exercer des effets positifs sur la maturation cytoplasmique des ovocytes porcins *in vitro*.

1-4- Facteurs de croissance et autre additifs

Les facteurs d'enrichissement, tels que les facteurs de croissance augmentent d'une façon significative l'expansion du cumulus ainsi que les taux de clivage des jeunes embryons (Neufeld *et al.*, 1987).

Le processus de maturation méiotique et l'acquisition de compétences de développement détermine la capacité de l'ovocyte à subir une fécondation réussie, le clivage, et le développement embryonnaire. Ces étapes importantes dépendent d'une variété de facteurs qui conduisent à une bonne maturation nucléaire et cytoplasmique (Trounson *et al.*, 2001).

Le milieu de maturation doit être supplémenté avec des nutriments. Le pyruvate, le lactate, le glucose et des acides aminés sont ajoutés améliorant la compétence au développement de l'ovocyte bovin (Bruyere, 2002). Il faut néanmoins respecter les concentrations ou s'abstenir de supplémenter le milieu de maturation: des concentrations excessives sont néfastes à l'ovocyte (Hashimoto *et al.*, 2000).

Skinner (1990) a postulé que le sérum contenait un certain nombre de facteurs de croissance connus qui ont un rôle important dans la régulation de la maturation de l'ovocyte notamment via les cellules du cumulus.

Le glutathion est un composé sulfhydryle non protéique et joue un rôle important dans la protection des cellules de mammifères contre le stress oxydatif, et sa synthèse intracellulaire est très importante dans la maturation ovocytaire cytoplasmique (Gasparrini *et al.*, 2008).

Il a été montré que la synthèse adéquate de glutathion (GSH) dans la période de maturation est très importante pour le développement de l'embryon plus tard (DE Matos *et al.*, 2002).

Le glutathion (GSH) fonctionne de plusieurs façons, par exemple en maintenant l'état d'oxydoréduction dans les cellules, l'amélioration de la formation du pronucléus male, la synthèse des protéines et de l'ADN et la réduction des disulfures (Kim *et al.*, 2004). La teneur des ovocytes en GSH augmente pendant la maturation des ovocytes dans l'ovaire afin d'être utiliser pour la protection des cellules dans les étapes ultérieures (Beheshti *et al.*, 2011).

D'après DE Matos *et al* (2002), la synthèse adéquate de glutathion (GSH) dans la période de maturation est très importante pour le développement de l'embryon plus tard. Il a été signalé que ; en présence de bas poids moléculaire contenant des précurseurs de GSH, tels que la cystéamine et B mercaptoéthanol dans le milieu IVM, augmente la teneur en GSH des ovocytes après la maturation, ce qui a un effet bénéfique sur le développement de 6 à 8 cellules du stade embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste (Gasparrini *et al.*, 2003 – Beheshti *et al.*, 2011). Il a également été montré que la supplémentation de composés thiols, tels que la cystéamine et B mércaptoéthanol augmente la synthèse du GSH ovin et bovin au cours de l'IVM qui affecte le développement de la qualité de l'embryon (De Matos et Al, 2002).

Les oocytes des buffles sont capables de synthétiser les GSH in vitro (Gasparrini *et al.*, 2003).

Cependant, le nombre d'ovocytes présentant des formations pronuclées chez cette espèce augmente lorsque le milieu l'IVM a été complété par le B mércaptoéthanol (Songsasen et Apimeteetursong, 2002).

Les acides aminés peuvent servir comme des osmolytes, des substrats énergétiques, des régulateurs de pH et des chélateurs de métaux lourds et de précurseurs pour la synthèse des protéines (Gardner, 1994; Gardner *et al.*, 1996; Lee et Fukui, 1996).

La supplémentation en acides aminés dans les milieux de maturation ovocytaire est associée à des fréquences de développement accru, l'augmentation du nombre de cellules du blastocyste et ovocytes, et un taux élevé d'ARNm de la mère (Watson *et al.*, 2000).

Keskintepe et Brackett, 1996; Keskintepe *et al.*, 1995 ont observé un avantage important de l'addition de citrate dans le milieu SOFM. Le citrate peut agir en tant que régulateur de la synthèse des acides gras, la chélation d'ions et le transport de solutés, et son addition au SOFM

est bénéfique pour l'obtention des fréquences maximales de formation des blastocytes avec ce moyen (Keskintepe et Brackett, 1996; Keskintepe *et al.*, 1995).

L'EGF (epidermal growth factor) influe positivement sur la maturation ovocytaire dans un certain nombre d'espèces, y compris les bovins (Lonergan et al, 1996; Dardik et Schultz, 1991). Watson et al, (2000) ont montré que la supplémentation en EGF dans le milieu de maturation ovocytaire a entraîné une augmentation dépendante de la concentration dans le développement des blastocytes mais n'a pas eu d'influence sur le nombre total des cellules du blastocyste ou sur l'apoptose.

Il a été montré que l'EGF est naturellement présent dans le liquide folliculaire de plusieurs espèces (Lonergan *et al.*, 1996), et ont montré que l'effet positif du liquide folliculaire sur IVM des ovocytes de souris est en grande partie en raison de la présence d'EGF.

Par voie de signalisation, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) joue un rôle central dans la communication cellule-cellule chez les vertébrés et les invertébrés. Il participe également dans la spécification du destin des cellules et coordonne leur prolifération (Sadeesh *et al.*, 2014).

La liaison de l'EGFR avec son ligand, l'EGF (sur la surface cellulaire) déclenche la dimérisation du récepteur qui conduit à la transphosphorylation des multiples résidus de tyrosine, et le recrutement d'une multitude d'enzymes et de protéines adaptatrices essentielles pour la survie des cellules et leur prolifération (Sadeesh *et al.*, 2014). Parmi les différentes études des événements complexes qui préparent les ovocytes pour l'éventuelle fécondation, le facteur de croissance épidermique (EGF) est connu pour induire la reprise de la méiose dans les ovocytes de diverses espèces de mammifères, tels que les rats (Feng *et al.*, 1989), les souris (Das *et al.*, 1992), porcs (Sirotkin *et al.*, 2000), bovins (Nandi *et al.*, 2002), ovins (Guler *et al.*, 2000), buffles (Kumar et Purohit, 2004), chiens (Bolamba *et al.*, 2006) et chevaux (Lindbloom *et al.*, 2008).

Les mécanismes possibles de l'EGF sur la maturation des ovocytes sont soit la perturbation de la communication des ovocytes avec les cellules du cumulus ou la création d'un signal de maturation positif et une médiation de l'effet via un mécanisme intracellulaire dépendant de la tyrosine kinase (Deckel et Sherizly, 1985). Des résultats contradictoires ont également été signalés sur les effets de l'EGF sur la maturation ovocytaire in vitro chez plusieurs mammifères y compris les bovins, les humains, chiens, chats et les porcs (Sadeesh *et*

al., 2014). Les résultats contradictoires des effets de l'EGF sur l'IVM d'ovocyte peuvent être dus à des conditions IVM hétérogènes (Enchaparambil *et al.*, 2014).

Watson *et al* (2000) ont observé qu'en absence de sérum, la supplémentation du milieu en amino-acides et EGF permet d'augmenter les taux d'obtention de blastocyste. L'EGF a une action synergique avec les gonadotrophines à condition que leur concentration globale reste faible (à cause d'interaction sur les récepteurs), c'est à dire autour de 500 ng/ml (Harper et Brackett, 1993).

Le couple EGF (facteur de régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire ovarienne) et IGF-1 (facteur mitogène) semble être le plus efficace potentialisant l'effet des gonadotrophines (Lorenzo *et al.*, 1994; Weber et Sullivant, 2000), cette combinaison de facteurs de croissance accélère la maturation ovocytaire (expansion du cumulus et expulsion du globule polaire) sauf en présence de sérum (contenant des IGF-BP) (Sakagushi *et al.*, 2000).

L'addition de EGF + β ME au cours de la maturation des COCs bovins accrue l'expansion du cumulus, l'extrusion du globule polaire et la proportion des ovocytes qui ont atteint le stade la métaphase II. Ces résultats confirment également le fait que l'EGF et le β -ME agissent dans les COCs à stimuler le taux d'expansion du cumulus jusqu'à 94,4% et le taux de formation du corps polaire jusqu'à 82,5% (Sadeesh *et al.*, 2014).

Sadeesh *et al*, (2014) ont montré que lorsque les concentrations de l'EGF et de β -ME étaient optimales, il y'a un effet significatif sur la maturation de l'ovocyte et leur développement. A des concentrations élevées de EGF + β -ME (100 ng / mL + 500 uM), une diminution du taux d'expansion du cumulus et du taux de formation du globule polaire n'a pas été observée. Cela démontre que la dose plus élevée de EGF + β -ME inhibe partiellement le processus de maturation, alors qu'une faible dose de EGF + β -ME (10 ng / ml + 25 uM) provoque une inhibition de la maturation de l'ovocyte et le développement, en raison de la liaison de l'élément de milieu de culture à l'EGF + β -ME.

L'addition de β -ME au milieu de l'IVM bovine et ovine augmente la synthèse du glutathion, et améliore le développement et la qualité de l'embryon (DE MATOS *et al.*, 2002). Des rapports ont indiqués que l'addition de 100 uM de β -ME améliore la formation des blastocystes et le nombre de cellules dans ovocytes bovins (Kobayashi *et al.*, 2006).

DEA *et al* (2011) ont rapporté que l'addition de bas poids moléculaire des composés thiol par exemple cystéamine et β -ME, a conduit à une faible oxydation chez de nombreuses espèces.

Les facteurs de croissance tels que l'hormone de croissance (GH) et l'EGF peuvent être considérés comme des locaux régulateurs impliqués dans la coordination subtile de la prolifération et la différenciation cellulaire (Sadeesh *et al.*, 2014). À cet égard, l'EGF stimule les fonctions cellulaires distinctes, ce qui suggère un possible effet sur le développement précoce des embryons de mammifères (Teruel *et al.*, 2000).

(Sadeesh *et al.*, 2014) ont démontré que le facteur de croissance épidermique améliore l'expansion du cumulus des complexes ovocyte cumulus du buffle.

De nombreux chercheurs ont signalé que l'EGF contribue à la promotion de la maturation ovocytaire (Downs, 1989; Sanbuissho *et al.*, 1991), de la rupture de la vésicule germinale (GVBD), la formation du corps polaire (Das *et al.*, 1992) et le clivage des ovocytes (Coskun *et al.*, 1991).

Mtango *et al.* (2003) ont rapporté que l'ajout de l'EGF dans le milieu de culture a entraîné un développement des capacités plus élevé que d'autres facteurs de croissance utilisés.

Geshi *et al.* (2000) ont complété le TCM199 avec du milieu Herpes, du PVA et du pyruvate de sodium, ce dernier semble stimuler la maturation des ovocytes dénudés et permettre un développement embryonnaire normal.

Chez les mammifères, les ovocytes et les cultures embryonnaires sont affectés négativement par le stress oxydatif car la concentration en oxygène *in vitro* est plus élevée que celle de l'environnement *in vivo* ce qui va conduire à l'augmentation du niveau des espèces réactives à l'oxygène (ROS), y compris les anions super-oxydés, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles qui provoquent la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire (Sadeesh *et al.*, 2014)

Les systèmes anti-oxydants, tels que la superoxydedismutase, la catalase, et les thiols, récupèrent les ROS (ReactiveOxygenSpecies) dans les cellules des mammifères (Beheshti *et al.*, 2011).

Roldán *et al.*, 2015 ont prouvé que l'addition exogène (l'urokinase) uPA ne modifie pas la maturation ovocytaire, l'inhibition spécifique de l'activité protéolytique de l'uPA par l'amiloride réduit la MIV d'ovocytes bovins et modifie l'expression des gènes liés à des jonctions cellulaires, le cycle cellulaire, le stress oxydatif et les sérines des cellules granuleuses (CG), ce qui indique que l'activité protéolytique de l'uPA est critique pour IVM des ovocytes bovins.

Ulloa *et al.* (2015) ont montré que la supplémentation en caféine avant IVM a retardé la reprise de la méiose et le développement de l'embryon concerné.

1-5- Antibiotiques:

Les antibiotiques sont souvent utilisés pour contrôler la croissance des contaminants bactériens et fongiques (Perlman D., 1979), cependant, leur utilisation routinière en culture cellulaire n'est pas recommandée car ils peuvent masquer les contaminations par les mycoplasmes et les bactéries résistantes (McGarrity G., 1976; Masters JetStacey G., 2007). D'une autre part, les antibiotiques peuvent aussi interférer avec le métabolisme de cellules sensibles (MeenakshiArora Ph. D., 2013).

2- Les condition de la mise en incubation et MIV

Il existe des différences claires concernant les développements embryonnaires, en particulier entre les ovocytes maturés in vitro et ceux qui ont subi la maturation in vivo (Choi et al, 1998). De nombreuses études ont montré que dans des conditions in vitro, la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique se produisent à des moments différents (Sirard *et al.*, 1995; Bevers *et al.*, 1997), ce qui pourrait être la cause de taux de blastocyste environ 35% observée pour la production in vitro d'embryons de bovins (Rizos *et al.*, 2002), et la qualité inférieure des embryons par rapport aux embryons produits in vivo (Gonçalves *et al.*, 2008).

Le système tampon utilisé pour la MIV est un système naturel où le gaz CO₂ équilibre le contenu en CO₃/HCO₃ du milieu de culture. Cependant, la cultures des COCs doit être maintenue à une atmosphère contenant 5% de CO₂ dans l'air, généralement obtenu grâce à l'utilisation d'un incubateur à CO₂. Ce système tampon naturel est généralement peu coûteux et non toxique (Rothblat et Cristofalo.,1972).

L'atmosphère de la culture joue un rôle essentiel au cours de la maturation des ovocytes et la culture de l'embryon. Une atmosphère de culture de 5% de CO₂ dans l'air est typiquement utilisé pour la maturation in vitro des ovocytes de mammifère. L'expansion des cellules Cumulus et l'attachement ont été nettement réduites dans les COC mûri sous une atmosphère de culture à O₂ réduit (Watson *et al.*, 2000).

Le développement de blastocystes a été réduit après la maturation ovocytaire sous 5% de CO₂, 7% O₂, 88% N₂ dans l'atmosphère de culture(Watson *et al.*, 2000).

Les ovocytes des ruminants et des porcs sont incubés à 38,5C° ou 39C° sous 5% de CO₂ dans l'air. Contrairement à ce qui a été démontré pour la culture d'embryons bovins, la réduction des taux d'oxygène de 20% (taux dans l'air) à 5% pendant la MIV n'a pas permis d'améliorer les

résultats (Watson *et al.*, 2000). Cependant, une faible pression partielle en oxygène dans le milieu est bénéfique avec une meilleure compétence au développement des ovocytes sous 5% d'O₂ (Hashimoto *et al.*, 2000).

Shi *et al* (1998) ont montré que l'IVM peut également être réalisée à des températures plus basses sans affecter développement embryonnaire.

L'osmolarité doit être aussi contrôlée, car; à partir de 315 m Osmoles/kg d'eau, il y'a mort des ovocytes bovins (Guyader, 1998).

La durée de MIV est de 24h (certains se limitent à 22h) chez les ruminants dans un environnement faiblement exposé à la lumière. L'utilisation inactinique permet de limiter le stress induit par l'exposition des cellules à la lumière (Bruyere, 2002).

Le volume du milieu de maturation varie selon les équipes, de 10ul (microgouttes sous huile minérale) à 1ml (plaque multi-puits) (Bruyere,2002).L'huile minérale (paraffine) évite l'évaporation et les modifications de la pression osmotique consécutive (Bruyere, 2002). Le nombre d'ovocyte par puits ou goutte varie de 1 (goutte de 10ul) à plusieurs dizaines (puits de 1ml) (Bruyere,2002).

4- Evaluation et classification des ovocytes après MIV:

Il existe plusieurs façons de déterminer la compétence du développement d'un ovocyte: l'expansion des cellules du cumulus, maturation cytoplasmique et nucléaire avec extrusion du globule polaire, la formation du blastocyste et le taux de clivage.

- Selon le degré d'expansion du cumulus

L'expansion du Cumulus a été classée en fonction de l'échelle 0-4 tel que décrit par Fagbohun et Downs (1990). En utilisant cette échelle, le score 0 indique l'absence d'expansion, caractérisé par le détachement des cellules du cumulus de l'ovocyte, d'assumer une monocouche aplatie d'aspect fibroblastique laissant une partie ou entièrement dénudée ovocyte. Un score de 1 indique l'absence d'expansion, mais les cellules du cumulus sphérique, compact restant autour de l'ovocyte. Pour un complexe score 2, seule la couche la plus externe les cellules du cumulus ont élargi, un complexe score 3 a toutes les couches en évidence élargies sauf la corona radiata et un score de 4 indique le degré maximum d'expansion y compris la corona radiata (cellules la plus proximale de l'ovocyte).

- Selon la maturation nucléaire

L'examen nucléaire des COC doit être évalué à 24 h de culture in vitro après élimination des cellules du cumulus environnantes et la zone pellucide, comme décrit par Shah *et al.* (2008).

La maturation méiotique ovocytaire est un processus complexe qui implique la décomposition de la vésicule germinale, la condensation des chromosomes et la formation de la ségrégation de la plaque métaphase, l'achèvement de la méiose I, extrusion du premier globule polaire et arrestation à la métaphase-II (Modina *et al.*, 2001).

- Selon la maturation cytoplasmique

Durant la maturation in vitro, les ovocytes vont subir une série de changements cytoplasmiques avant la reprise de la maturation nucléaire ce qui va conduire à une capacité variable de l'embryon qui en résulte (Hyttel *et al.*, 1997; Moor *et al.*, 2001).

- La fécondation in vitro

La fécondation in vitro est une étape fondamentale pour la production d'embryons viables in vitro, sa réussite confirme la fiabilité du milieu et des conditions de la MIV.

Introduction:

La réussite de la maturation des ovocytes bovins dépend de plusieurs paramètres : les conditions d'acheminement des ovaires, techniques de collecte des ovocytes, les milieux et les conditions utilisés lors de l'incubation. Cette étude a été réalisée afin d'adapter les bonnes techniques et adopter le protocole qui permet d'obtenir des résultats meilleurs.

Matériel et méthodes:

III. Matériel:

Notre étude a été réalisée par l'exploitation des matériels suivants:

1. Les ovaires: en nombre de 72, récoltés auprès des abattoirs d'El Harrach, Boufarik et Chiffa.

Il est à signaler que 4 ovaires ont été éliminés de l'expérimentation pour les motifs liés à: l'atrophie, à l'absence de follicules sur la surface et à la fibrose.

2. Gants d'examen et stériles
3. Paire de ciseaux
4. Boite en plastique
5. NaCl 9%
6. Seringues: 2.5ml, 5ml, 10ml et 50ml
7. Aiguilles 18G
8. Compresses stériles
9. Alcool 70°
10. Essuie tout
11. Eau de Javel
12. Boites de Pétri quadrillées
13. Boites multi-puits
14. Paillettes
15. Sacs plastique refrmables
16. Tubes secs
17. Tubes Eppendorf
18. Microscope inversé
19. Bain mari
20. Centrifugeuse
21. Bonbonne à CO2

22. PBS (*Phosphate Buffered Saline*)
23. Milieu de rinçage des ovocytes (*Oocytes Washing Media*) MOFA
24. Milieu de base TCM199
25. Milieu de transport et de maturation des ovocytes du MOFA (*SMM*) Shipping and Maturation Medium.

IV. Méthodes:

Les ovaires ont été prélevés à l'aide d'une paire de ciseaux préalablement lavés puis introduits dans de l'eau bouillante pendant quelques minutes, et transportés dans une boîte en plastique remplie avec une solution saline (NaCl 9%) seule à une température ambiante durant 1 à 2h après l'abattage des vaches. (figure)

Au laboratoire, le lieu de travail est désinfecté avant et après chaque manipulation à l'aide d'eau de javel pur appliqué sur la paillasse avec du papier (Essuie tout). (Figure 09)



Figure 08: Matériel et produits utilisés lors de la récolte et le transport des ovaires



Figure 09: Produits utilisés pour la désinfection la paillasse.

Afin d'éliminer toute trace de sang et les impuretés sur les ovaires, nous les avons rincé 2 à 3 fois avec une solution saline suivi par leur désinfection à l'aide d'une compresses imbibées d'alcool 70°. (figure10)



Figure 10: Matériel et produits utilisés pour la préparation des ovaires à la ponction.

Les ovaires ont fait l'objet, un à un, d'une ponction pour le prélèvement des ovocytes et du liquide folliculaire. (figure 11)



Figure11: Matériel et produits utilisés pour la ponction des follicules, la récolte du liquide folliculaire et la conservation et l'observation des ovocytes

Les follicules en surface ont été classés en 2 catégories:

- la première: d'un diamètre inférieur à 5mm, ont servit au prélèvement des COCs.
- la deuxième: d'un diamètre supérieur à 5mm, ont été consacré pour le prélèvement du liquide folliculaire.

Suivant les travaux de Bruyère., 2002 et Kumar *et al.*, 1997, la ponction a été faite à l'aide d'une aiguille 18G reliée à une seringue de 5ml ou 10ml remplie préalablement avec 0.5ml de PBS ou de milieu de rinçage des ovocytes MOFA. (figure12)



Figure 12: Ponction des follicules en surface

- Le liquide aspiré à partir du premier groupe est rassemblé dans 1 à 3 boîtes de Pétri quadrillées préalablement remplies à 1/4 avec du PBS ou milieu de rinçage des ovocytes MOFA. (Figure13)



Figure 13: Le liquide obtenu à partir de la ponction des follicules d'un diamètre inférieur à 5mm

- Le liquide aspiré à partir du deuxième groupe, à l'aide d'une seringue de 5ml ou 10ml vide est mis dans des tubes secs pour être centrifugé à 2000 tours pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé et re-centrifugé une deuxième fois de la même manière.(figure). Le deuxième surnageant est prélevé et placé dans des tubes Eppendorf indentifiés pour être soit utiliser pour la MIV, soit congeler à -20° pour une utilisation ultérieure. (Figure 13)

Le jour de l'utilisation du liquide folliculaire conservé, le tube est décongelé et maintenu au bain mari à 56° pendant 30 minutes (Karami Shabankareh *et al.*, 2011). (figure 14)



Figure14: Matériel nécessaire pour la préparation et la conservation du liquide folliculaire: **a)**seringue 10ml vide , **b)**tube sec **c)** centrifugeuse réglée à 2000 tours pendant 10 minutes, **d)** tube Eppendorf pour la conservation du liquide folliculaire à -20C° , **e)** bain mari réglé à 56C° pendant 30 minutes pour l'utilisation du liquide folliculaire décongelé.

Pendant ce temps, les boites de Pétri sont observées sous microscope inversé au grossissement 4.

Les COCs trouvés sont classés et triés en se basant sur leur morphologie en 4 classes d'après Kouamo et *al.*, 2014. (figure 15)

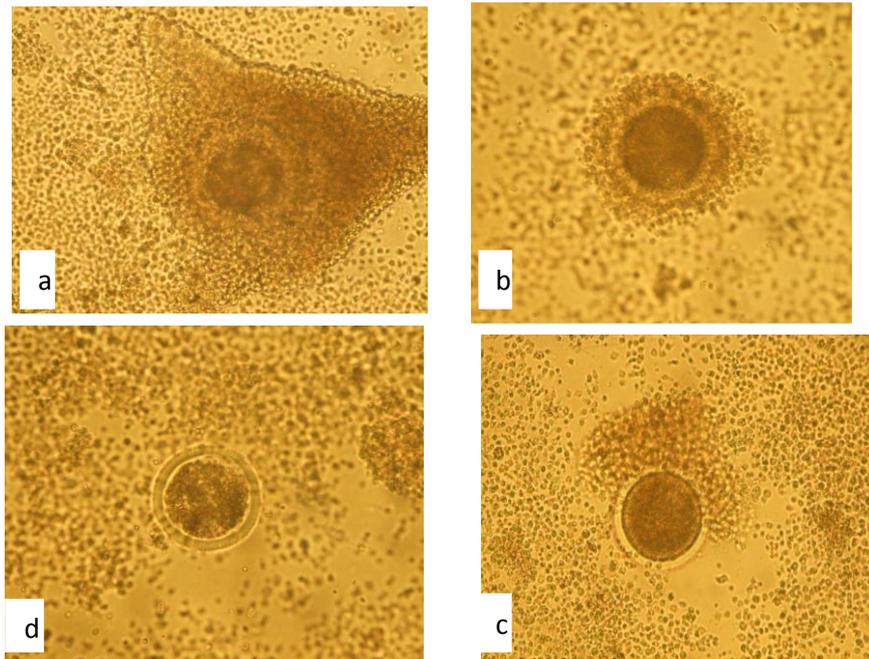


Figure 15: classification des COCs observés sous microscope inversé: **a)** Ovocyte classe I, **b)** ovocyte classe II, **c)** ovocyte classe III, **d)** ovocyte classe IV.

Seuls les COCs de la classe I et II qui sont prélevés de leur milieu à l'aide d'une paille attachée à une seringue de 2.5ml pour être rincer 3 fois dans 2 à 2.5ml de milieu de lavage des ovocytes MOFA ou de PBS comme a été pratiqué par Barceló-Fimbres *et al.*, 2015. (figure 16 et 17). Les COCs de la classe III et IV sont éliminé de l'étude.

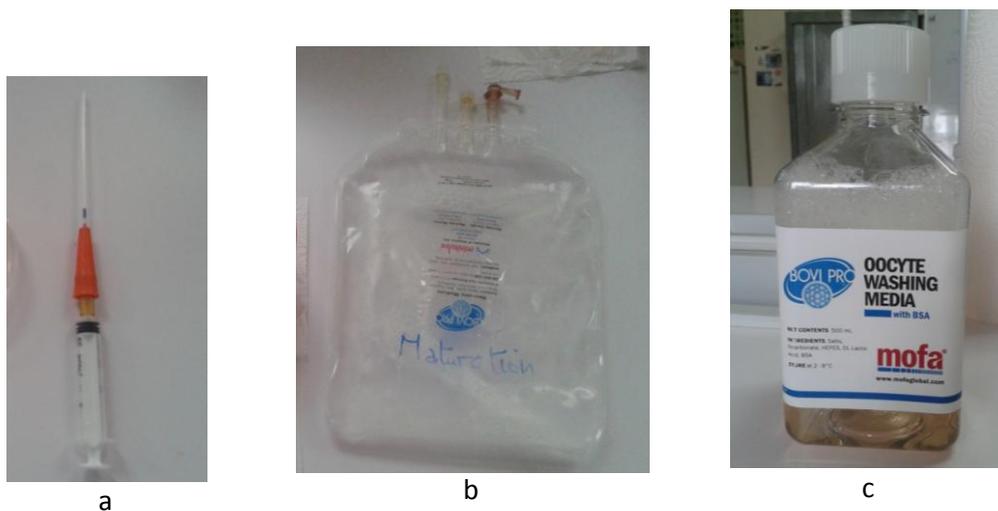


Figure 16: Matériel et produits utilisés pour le rinçage des COCs: **a)** paille attachée à une seringue 2.5ml, **b)** milieu de rinçage PBS, **c)** milieu de rinçage et ovocytes MOFA.

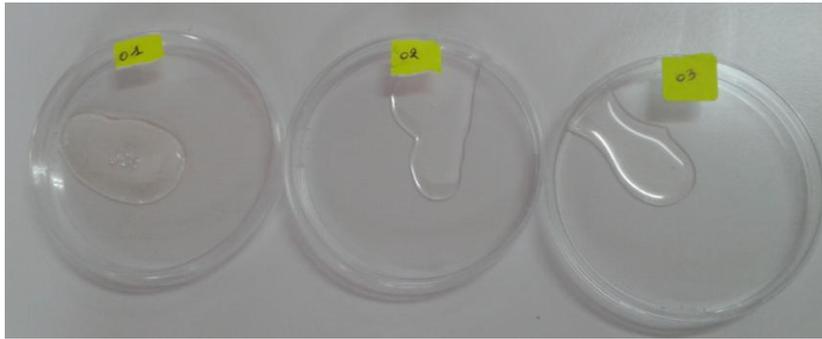


Figure17: Les 3 milieux de rinçage des COCs sélectionnés

Durant cette étape, un nombre important de COCs perdus et qui a été réduit par la suite, après amélioration de la technique par l'utilisation d'un matériel adapté (utilisation de la paille au lieu le cathéter pour prélever les COCs, remplacement de la boîte multi-puits par les boîtes de Pétri pour le rinçage des COCs).

Les milieux utilisés pour la MIV:

Milieu I: milieu de base TCM199 seul

Milieu II: milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire

Milieu III: milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire

Milieu IV: milieu de transport et de maturation des ovocytes (SMM) MOFA

La mise en culture des COCs:

Après le 3^{ème} rinçage (Barceló-Fimbres *et al.*, 2015), 163 COCs sont prélevés à l'aide d'une paille attachée à une seringue de 2.5ml et placés dans des puits contenant 0.5ml des 3 premiers différents milieux cités en dessus. (figure18) Chaque puits comporte 6 à 8 COCs.



Figure 18: a) boîte de 24 puits stérile, b) la boîte multi-puits prête pour la mise en culture des COCs

Ensuite, les boîtes multi-puits ont été introduites dans un sac en plastique refermable hermétiquement. Afin d'assurer une humidité suffisante dans le sac, une boîte de Pétri remplie de NaCl 9% est placée sur la boîte multi-puits. Ensuite, à l'aide d'un cathéter attaché à une seringue de 50ml, 5% de CO₂ a été prélevé de la bonbonne à CO₂ et insufflé dans le sac avant sa fermeture. C'est une technique appliquée par Bal Pénélope (2014). (figure 19). L'incubation a été réalisée à 38C° pendant 24h.



Figure 19: Préparation de l'atmosphère d'incubation: **a)** boîte multi-puits, sac en plastique refermable, seringue 50ml, boîte de Pétri remplie de NaCl 9%, **b)** bonbonne à CO₂, **c)** étuve réglée à 38C°, **d)** la mise en incubation des COCs pendant 24h.

Un nombre de 73 COCs est mis en culture dans le milieu de transport et de maturation des ovocytes (SMM) à raison de 7 à 9 COCs par tube. (figure 20)

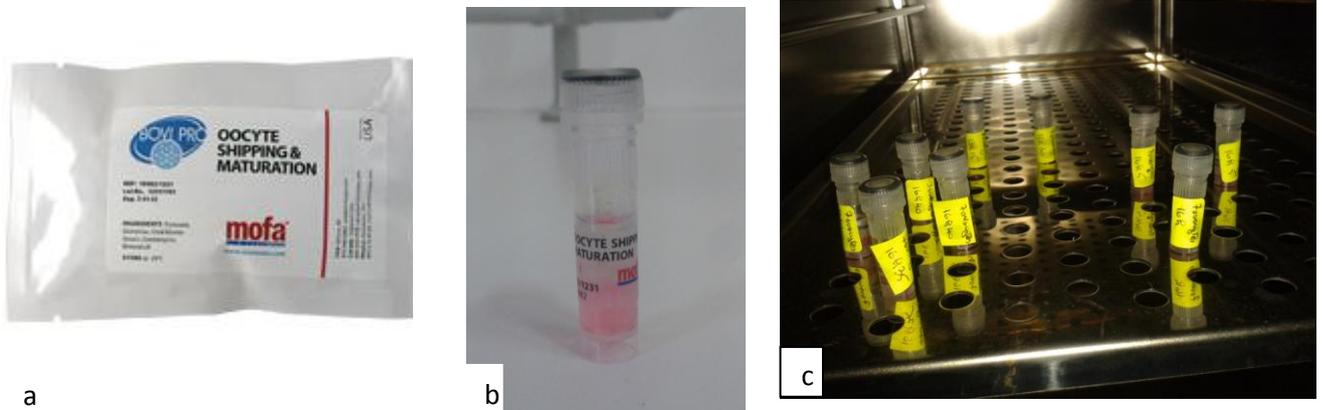


Figure 20: a) milieu de transport et de maturation des ovocytes MOFA emballé, b) tube du milieu de transport et de maturation des ovocytes MOFA, c) mise en incubation des COCs dans le système SMM.

Résultats:

Les résultats de notre étude sont présentés dans 04 tableaux différents. On a observé une expansion du cumulus sur 134 COCs parmi les 236 mis en culture, soit un taux de MIV de 56,77%.

1- Milieu 01:

Tableau 03: Résultats du premier milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
Milieu de base TCM199 seule	46	25	21	54,34%

Le milieu 1 constitué de milieu de base TCM199 seul, 46 COCs ont été mis en culture, nous avons observé une expansion du cumulus sur 25 COCs, soit un taux de 54,34%, 21 COCs sont restés immatures.

2- Milieu 02:

Tableau 04: Résultats du deuxième milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
TCM199 + 10% de FF	59	31	24	52,54%

Le milieu 2 constitué de milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire, 59 COCs ont été mis en culture dont 37 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de maturation de 52,54%, 24 COCs sont restés immatures.

3- Milieu 03:

Tableau 05: Résultats du troisième milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
TCM199 + 50% de FF	58	37	14	63,79%

Le milieu 3 représenté par le milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire, parmi les 58 COCs mis en culture, 37 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de 63,79%, 14 COCs sont restés immatures.

4- Milieu 04:

Tableau 06 Résultats du quatrième milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
SMM (MOFA)	73	41	18	56,16%

En dernier, le milieu 4 constitué de milieu de transport et de maturation des ovocytes MOFA, un total de 73 COCs ont été mis en culture, nous avons observé une expansion du cumulus sur 41 COCs, soit un taux de maturation de 56,16%, 18 COCs sont restés immatures.

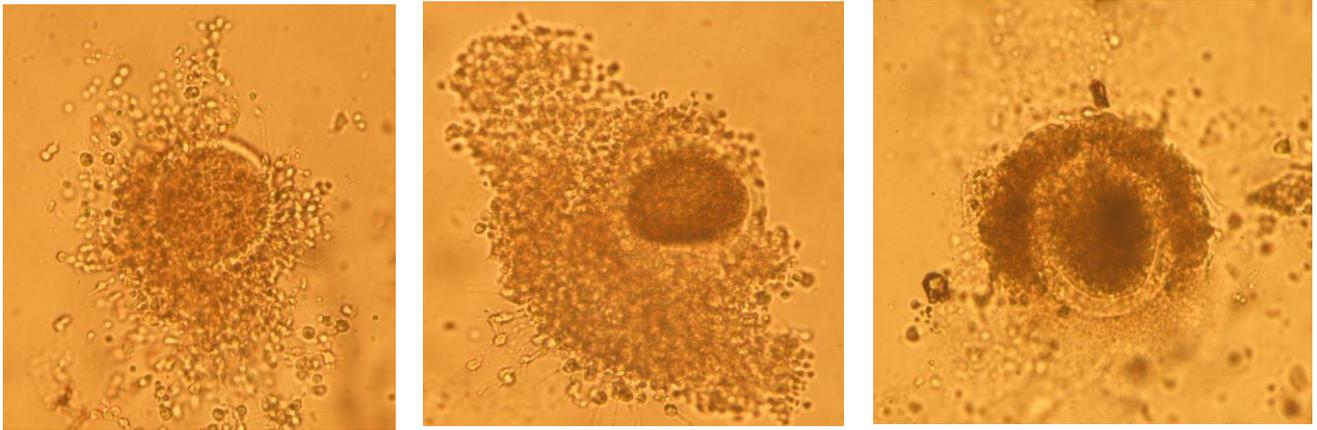


Figure 21: Les ovocytes expansés après maturation

Discussion:

Dans notre étude, un total de 72 ovaires ont été collectés de différents abattoirs et acheminés jusqu'au laboratoire à une température ambiante suivant Bruyère (2002) et Klumpp (2004) qui ont considéré la température optimale pour stocker les ovaires jusqu'à l'aspiration est la température ambiante, ce qui a été également prouvé par Rosenkranz (1993) qui a constaté une plus grande expansion du cumulus lorsque les ovaires étaient transportés à 20C° par rapport à 30 et 37C°.

Les Ovocytes utilisés sont issus des petits follicules dont est inférieur ou égal à 4mm suivant les résultats obtenus par Lonergan et al (1994). Notre choix de ce diamètre folliculaire a été également basé par rapport à l'étude réalisée par Hendriksen *et al* (2000) qui ont conclu que les ovocytes bovins acquièrent la capacité de développement après FIV à un diamètre folliculaire égal à 3mm.

Les COCs ont été obtenus après ponction et aspiration des follicules triés, cette technique pratiquée par Love *et al* (2003) est la technique la moins onéreuse.

Dans notre travail, 414 COCs ont été observé sous microscope inversé après la ponction de 848 follicules, soit un taux de récolte de 48,82% en utilisant la technique d'aspiration seule, un taux acceptable situé entre 30 et 60%, la fourche indiquée par Rivera *et al* (2000). Une moyenne de 5,75 encourageante, car selon Kumar *et al* (1997), le rendement avec cette technique est de 3,10 qui peut passer à 6,25 après tranchage des ovaires.

A partir de ces résultats nous avons constaté la nécessité d'utiliser d'autres méthodes tel que le tranchage et la digestion enzymatique des ovaires. DolaKasaria *et al* (2013) ont obtenu

un nombre d'ovocytes récoltés par la technique de tranchage significativement plus élevé par rapport à la technique d'aspiration. Fouladi *et al* (1998) ont obtenu plus de 200 ovocytes par ovaire après une heure de digestion du tissu ovarien par la trypsine.

Dans notre étude, les COCs récoltés ont été classés en 4 classes en se basant sur le degré d'expansion du cumulus et l'homogénéité du cytoplasme suivant la classification retenue par Kouamo *et al* (2014). Cependant, les COCs de la classe I représentent 34,78% des ovocytes récoltés, soit 144/414, les COCs de la classe II représentent 33,33% des ovocytes récoltés, soit 138/414. 46 COCs de ces deux classes ont été perdus lors des différentes manipulations. Les COCs de la classe III représentent 13,52% des ovocytes récoltés, soit 56/414, et en dernier, les COCs de la classe IV représentant un pourcentage de 18,35% des ovocytes récoltés, soit 76/414.

Cependant, cette classification reste limitée en terme d'appréciation de la qualité ovocytaire car, le remodelage de la chromatine peut être considéré comme un marqueur de la différenciation de l'ovocytes et de la compétence au développement, ce qui a été confirmé par Lodde *et al* (2007), faute d'indisponibilité des moyens et produits.

Dans notre travail, nous avons testé 4 milieux de culture différents. Le premier représenté par le milieu de base TCM199 seul, le deuxième; le milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire, le troisième représenté par le milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire et en dernier, nous avons utilisé le milieu de transport et de maturation des ovocytes (SMM) MOFA.

Sur la base de la procédure adoptée par Barceló-Fimbres *et al.*, 2015 et Satitmanwiwat *et al.*, 2015 les COCs sélectionnés ont fait l'objet de 3 rinçage.

Dans notre étude, le taux global de maturation des 4 milieux utilisés est de 56,77%, cependant, l'addition de différents éléments tel que les sérums, les hormones, les facteurs de croissance et les antibiotiques améliore ce taux (Sadeesh *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015).

Selon les auteurs, le taux de maturation peut être influencé par la température de transport des ovaires, cependant, Bohlooli *et al.*, 2015 ont obtenu un taux de maturation plus élevé à une température de 4°C par rapport à 25 et 38°C. Selon Chaves *et al.*, 2008, cette basse température réduit le métabolisme cellulaire, mais à 15°C, une température proche à la température ambiante, permet de réduire l'indice de l'apoptose (wang *et al.*, 2011).

La durée entre l'abattage des vaches et la ponction des follicules peut également influencer la qualité ovocytaire et leur maturation in vitro, dans ce cadre, Love *et al.*, 2003 ont

obtenu un taux égal à 72% lorsque les ovocytes ont été récoltés immédiatement après l'abattage des animaux, supérieur au taux obtenu dans notre travail où la durée était plus importante (2 à 3h), par contre, Shabpared *et al.*, 1993 n'ont indiqué aucune différence entre les groupes testés.

Les effets de l'ovaire (localisation, présence de corps jaune, taille et poids de l'ovaire) et les facteurs non ovariens (la race, l'âge, l'état corporel, la gestation) doivent être pris en compte pour augmenter le potentiel de l'ovaire pour le FIV, selon Kouamo *et al.* (2014), les jeunes vaches non gestantes, ayant un BSC = 03 et de grands ovaires présentent un grand nombre de follicules, et des ovocytes de qualité ($P < 0,05$) par rapport à d'autres animaux, ces critères n'ont pas été pris en considération dans notre étude ce qui a diminué le taux de maturation jusqu'à 56,77%.

Les résultats obtenus par Garcia *et al.*, 1988 et Hussain *et al.*, 2015 nous ont orienté vers l'utilisation du milieu TCM199 comme milieu de base. Ces auteurs ont marqué une plus grande expansion du cumulus en utilisant ce milieu de culture, par contre, d'autres chercheurs n'ont pas observé une différence significative entre les milieux de base (Lorenzo *et al.*, 1993, Baruma, 1995).

Dans notre expérimentation, nous avons obtenu un taux de maturation de 54,34% dans le premier milieu où on a utilisé le milieu de base seul, un taux supérieur à ceux obtenus par Satitmanwivat *et al.*, 2015 et Foote et Thibault., 1969 qui ont enrichi le même milieu de base avec 10 et 15% de SVF et ont obtenu des taux respectivement de 53,50% et 37,64%. Ce taux peut être augmenté significativement après un enrichissement du milieu de base.

Le deuxième milieu a donné lieu à un taux de maturation de 52,54% après addition de 10% de liquide folliculaire suivant plusieurs études réalisées par différents auteurs (Romero-Arredondo et Seidel, 1994; Elmileik *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1998; Avery *et al.*, 2003) qui ont montré que le liquide folliculaire peut être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation de la vache. Cependant, nos résultats après l'ajout de 10% de liquide folliculaire dans milieu sont contradictoires et légèrement plus bas que le précédent, cette baisse de taux a été également constaté par Ayoub et Hunter, 1993 du fait que le liquide folliculaire conduit à un retard de la maturation nucléaire (Du Colomb *et al.*, 2013) et inhibe cette dernière chez la vache (Gallardo et coll, 2001) et chez les porcins (Driancourt *et al.*, 1998). D'après Dostal *et al.*, 1996 et Choi *et al.*, 1998, le liquide folliculaire des grands follicules comme on a utilisé dans notre étude a un effet inhibiteur réduit sur la maturation ovocytaire par rapport

au liquide folliculaire récolté à partir de petites et moyennes follicules. D'autres études ont identifié plusieurs substances tel que les hormones dans le liquide folliculaire qui ont empêché la reprise de la méiose dans les ovocytes (Takahashi *et al.*, 1986), on peut surmonter ce problème en rajoutant le facteur de croissance épidermique (EGF) qui est conçu pour induire la reprise de la méiose dans les ovocytes bovins (Nandi *et al.*, 2002), des effets contradictoire de ce facteur ont été constatés par Sadeesh *et al.*, 2014. Gallardo et coll, 2001 ont montré que le liquide folliculaire bovin inhibe la maturation nucléaire mais il renforce la maturation cytoplasmique comme il est indiqué par la formation pronucléaire. D'après Aguilar *et al* (2001), le ralentissement de la maturation nucléaire fournit plus de temps à l'ovocyte pour synthétiser, de modifier et de stocker de nouveaux protéines et ribonucléoprotéines, et donc améliore sa compétence. Une étude récente a révélé que le liquide folliculaire favorise la maturation ovocytaire cytoplasmique lors de l'IVM et suggéré que son rôle majeur est de fournir une protection contre le stress oxydatif (Gruppen et Armstrong, 2010). D'après ces recherches, on peut conclure que l'ajout du liquide folliculaire au milieu est bénéfique pour avoir un taux de maturation satisfaisant et une compétence au développement.

Le troisième milieu que nous avons utilisé se compose de milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire, ce milieu a donné lieu à un taux de maturation égale à 63,79%, un taux inférieur à ceux obtenus par Cruz et al.,2014 et Gupta *et al.*, 2001 respectivement de 70.11% et 81,30% avec l'ajout de glutamine dans la deuxième culture. Par contre, le taux que nous avons obtenu est proche à 69%, celui obtenu par Choi *et al.*, 1998. D'après Watson *et al.*, 2000, l'addition de liquide folliculaire a donné un faible taux de maturation (52%) par rapport à l'enrichissement avec l'ECS (sérum de vache en chaleur) (78%), FBS (Sérum de Veau Fœtal) (79%) et le BAF (Fluide Amniotique Serum) (77%), ces résultats confirment la nécessité de présence des sérums dans le milieu de maturation.

En dernier, nous avons testé pour la première fois en Algérie le milieu de transport et de maturation des ovocytes (SMM) MOFA et nous avons obtenu un taux de maturation de 56,77%. D'après ces résultats, il n'y a pas de différence significative entre les différents milieux utilisés. Une étude récente réalisée par Barceló-Fimbres *et al.*,2015 qui ont testé ce milieu et n'ont remarqué aucune différence trouvée ($P > 0,1$) pour les taux de clivage au jour 2,5 lorsque le système SMM par rapport au témoin (83,1 contre 84,1% respectivement). Une autre étude menée par la California Polytechnic State University (CAL POLY) et MOFA a eu le même taux de

gestation pour les deux groupes (SMM et le témoin), mais un plus grand rendement d'embryons lorsque les ovocytes ont été maturés dans le milieu MOFA.

Conclusion:

Nous avons réalisé cette étude afin de pouvoir mettre en place un protocole de MIV des ovocytes bovins efficace, applicable au laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida. Nous nous sommes inspirés de plusieurs études bibliographiques pour préparer et tester nos milieux pour améliorer MIV.

Notre étude gagnerait en efficacité par l'enrichissement des milieux de culture avec différents sérums, hormones et facteurs de croissances présents au cours de la maturation in vivo et qui sont indispensables pour sa réussite in vitro d'une part, et de prendre en considération les qualités de l'animal avant l'abattage d'autre part. A ce titre, Kouamo *et al.*, 2014 ont signalé que les facteurs tels que l'âge, la gestation, BSC et la taille de l'ovaire doivent être pris en compte pour augmenter le potentiel de l'ovaire pour le FIV.

Notre travail qui consiste en la MIV des ovocytes bovins à valeur ajoutée, avec un fort impact sur le développement de la production in vitro pour obtenir des ovocytes matures et de qualité devant permettre une FIV réussie, assurant une culture d'embryons viables et transférables à des femelles receveuses.

Résultats:

Les résultats de notre étude sont présentés dans 04 tableaux différents. On a observé une expansion du cumulus sur 134 COCs parmi les 236 mis en culture, soit un taux de MIV de 56,77%.

1- Milieu 01:

Tableau 03: Résultats du premier milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
Milieu de base TCM199 seule	46	25	21	54,34%

Le milieu 1 constitué de milieu de base TCM199 seul, 46 COCs ont été mis en culture, nous avons observé une expansion du cumulus sur 25 COCs, soit un taux de 54,34%, 21 COCs sont restés immatures.

2- Milieu 02:

Tableau 04: Résultats du deuxième milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
TCM199 + 10% de FF	59	31	24	52,54%

Le milieu 2 constitué de milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire, 59 COCs ont été mis en culture dont 37 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de maturation de 52,54%, 24 COCs sont restés immatures.

3- Milieu 03:

Tableau 05: Résultats du troisième milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
TCM199 + 50% de FF	58	37	14	63,79%

Le milieu 3 représenté par le milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire, parmi les 58 COCs mis en culture, 37 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de 63,79%, 14 COCs sont restés immatures.

4- Milieu 04:

Tableau 06 Résultats du quatrième milieu après MIV

Composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
SMM (MOFA)	73	41	18	56,16%

En dernier, le milieu 4 constitué de milieu de transport et de maturation des ovocytes MOFA, un total de 73 COCs ont été mis en culture, nous avons observé une expansion du cumulus sur 41 COCs, soit un taux de maturation de 56,16%, 18 COCs sont restés immatures.

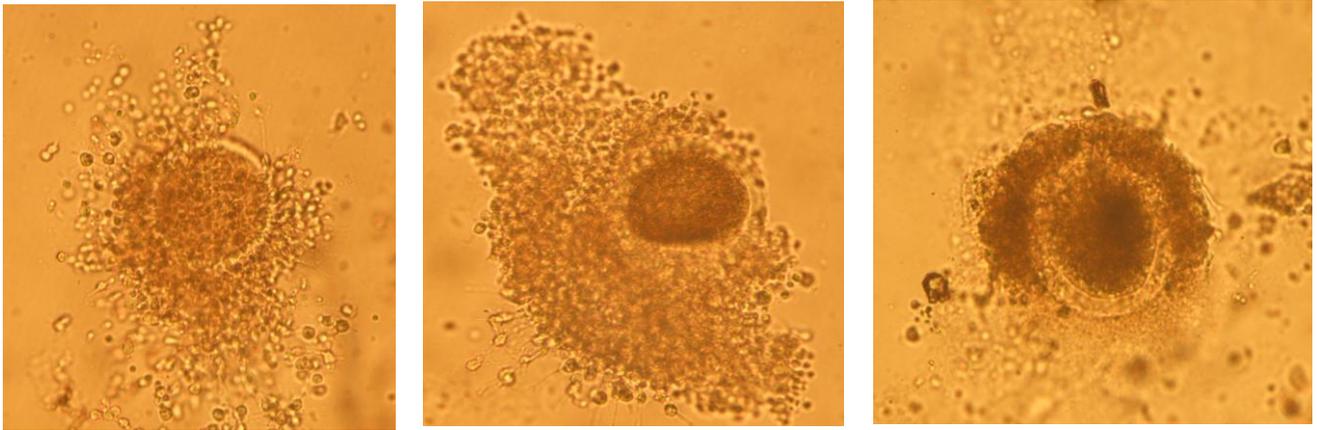


Figure 21: Les ovocytes expansés après maturation

Discussion:

Dans notre étude, un total de 72 ovaires ont été collectés de différents abattoirs et acheminés jusqu'au laboratoire à une température ambiante suivant Bruyère (2002) et Klumpp (2004) qui ont considéré la température optimale pour stocker les ovaires jusqu'à l'aspiration est la température ambiante, ce qui a été également prouvé par Rosenkranz (1993) qui a constaté une plus grande expansion du cumulus lorsque les ovaires étaient transportés à 20C° par rapport à 30 et 37C°.

Les Ovocytes utilisés sont issus des petits follicules dont est inférieur ou égal à 4mm suivant les résultats obtenus par Lonergan et al (1994). Notre choix de ce diamètre folliculaire a été également basé par rapport à l'étude réalisée par Hendriksen *et al* (2000) qui ont conclu que les ovocytes bovins acquièrent la capacité de développement après FIV à un diamètre folliculaire égal à 3mm.

Les COCs ont été obtenus après ponction et aspiration des follicules triés, cette technique pratiquée par Love *et al* (2003) est la technique la moins onéreuse.

Dans notre travail, 414 COCs ont été observé sous microscope inversé après la ponction de 848 follicules, soit un taux de récolte de 48,82% en utilisant la technique d'aspiration seule, un taux acceptable situé entre 30 et 60%, la fourche indiquée par Rivera *et al* (2000). Une moyenne de 5,75 encourageante, car selon Kumar *et al* (1997), le rendement avec cette technique est de 3,10 qui peut passer à 6,25 après tranchage des ovaires.

A partir de ces résultats nous avons constaté la nécessité d'utiliser d'autres méthodes tel que le tranchage et la digestion enzymatique des ovaires. DolaKasaria *et al* (2013) ont obtenu

un nombre d'ovocytes récoltés par la technique de tranchage significativement plus élevé par rapport à la technique d'aspiration. Fouladi *et al* (1998) ont obtenu plus de 200 ovocytes par ovaire après une heure de digestion du tissu ovarien par la trypsine.

Dans notre étude, les COCs récoltés ont été classés en 4 classes en se basant sur le degré d'expansion du cumulus et l'homogénéité du cytoplasme suivant la classification retenue par Kouamo *et al* (2014). Cependant, les COCs de la classe I représentent 34,78% des ovocytes récoltés, soit 144/414, les COCs de la classe II représentent 33,33% des ovocytes récoltés, soit 138/414. 46 COCs de ces deux classes ont été perdus lors des différentes manipulations. Les COCs de la classe III représentent 13,52% des ovocytes récoltés, soit 56/414, et en dernier, les COCs de la classe IV représentant un pourcentage de 18,35% des ovocytes récoltés, soit 76/414.

Cependant, cette classification reste limitée en terme d'appréciation de la qualité ovocytaire car, le remodelage de la chromatine peut être considéré comme un marqueur de la différenciation de l'ovocytes et de la compétence au développement, ce qui a été confirmé par Lodde *et al* (2007), faute d'indisponibilité des moyens et produits.

Dans notre travail, nous avons testé 4 milieux de culture différents. Le premier représenté par le milieu de base TCM199 seul, le deuxième; le milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire, le troisième représenté par le milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire et en dernier, nous avons utilisé le milieu de transport et de maturation des ovocytes (SMM) MOFA.

Sur la base de la procédure adoptée par Barceló-Fimbres *et al.*, 2015 et Satitmanwiwat *et al.*, 2015 les COCs sélectionnés ont fait l'objet de 3 rinçages.

Dans notre étude, le taux global de maturation des 4 milieux utilisés est de 56,77%, cependant, l'addition de différents éléments tel que les sérums, les hormones, les facteurs de croissance et les antibiotiques améliore ce taux (Sadeesh *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015).

Selon les auteurs, le taux de maturation peut être influencé par la température de transport des ovaires, cependant, Bohlooli *et al.*, 2015 ont obtenu un taux de maturation plus élevé à une température de 4°C par rapport à 25 et 38°C. Selon Chaves *et al.*, 2008, cette basse température réduit le métabolisme cellulaire, mais à 15°C, une température proche à la température ambiante, permet de réduire l'indice de l'apoptose (wang *et al.*, 2011).

La durée entre l'abattage des vaches et la ponction des follicules peut également influencer la qualité ovocytaire et leur maturation *in vitro*, dans ce cadre, Love *et al.*, 2003 ont

obtenu un taux égal à 72% lorsque les ovocytes ont été récoltés immédiatement après l'abattage des animaux, supérieur au taux obtenu dans notre travail où la durée était plus importante (2 à 3h), par contre, Shabpared *et al.*, 1993 n'ont indiqué aucune différence entre les groupes testés.

Les effets de l'ovaire (localisation, présence de corps jaune, taille et poids de l'ovaire) et les facteurs non ovariens (la race, l'âge, l'état corporel, la gestation) doivent être pris en compte pour augmenter le potentiel de l'ovaire pour le FIV, selon Kouamo *et al.* (2014), les jeunes vaches non gestantes, ayant un BSC = 03 et de grands ovaires présentent un grand nombre de follicules, et des ovocytes de qualité ($P < 0,05$) par rapport à d'autres animaux, ces critères n'ont pas été pris en considération dans notre étude ce qui a diminué le taux de maturation jusqu'à 56,77%.

Les résultats obtenus par Garcia *et al.*, 1988 et Hussain *et al.*, 2015 nous ont orienté vers l'utilisation du milieu TCM199 comme milieu de base. Ces auteurs ont marqué une plus grande expansion du cumulus en utilisant ce milieu de culture, par contre, d'autres chercheurs n'ont pas observé une différence significative entre les milieux de base (Lorenzo *et al.*, 1993, Baruma, 1995).

Dans notre expérimentation, nous avons obtenu un taux de maturation de 54,34% dans le premier milieu où on a utilisé le milieu de base seul, un taux supérieur à ceux obtenus par Satitmanwivat *et al.*, 2015 et Foote et Thibault., 1969 qui ont enrichi le même milieu de base avec 10 et 15% de SVF et ont obtenu des taux respectivement de 53,50% et 37,64%. Ce taux peut être augmenté significativement après un enrichissement du milieu de base.

Le deuxième milieu a donné lieu à un taux de maturation de 52,54% après addition de 10% de liquide folliculaire suivant plusieurs études réalisées par différents auteurs (Romero-Arredondo et Seidel, 1994; Elmileik *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1998; Avery *et al.*, 2003) qui ont montré que le liquide folliculaire peut être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation de la vache. Cependant, nos résultats après l'ajout de 10% de liquide folliculaire dans milieu sont contradictoires et légèrement plus bas que le précédent, cette baisse de taux a été également constaté par Ayoub et Hunter, 1993 du fait que le liquide folliculaire conduit à un retard de la maturation nucléaire (Du Colomb *et al.*, 2013) et inhibe cette dernière chez la vache (Gallardo et coll, 2001) et chez les porcins (Driancourt *et al.*, 1998). D'après Dostal *et al.*, 1996 et Choi *et al.*, 1998, le liquide folliculaire des grands follicules comme on a utilisé dans notre étude a un effet inhibiteur réduit sur la maturation ovocytaire par rapport

au liquide folliculaire récolté à partir de petites et moyennes follicules. D'autres études ont identifié plusieurs substances tel que les hormones dans le liquide folliculaire qui ont empêché la reprise de la méiose dans les ovocytes (Takahashi *et al.*, 1986), on peut surmonter ce problème en rajoutant le facteur de croissance épidermique (EGF) qui est conçu pour induire la reprise de la méiose dans les ovocytes bovins (Nandi *et al.*, 2002), des effets contradictoire de ce facteur ont été constatés par Sadeesh *et al.*, 2014. Gallardo et coll, 2001 ont montré que le liquide folliculaire bovin inhibe la maturation nucléaire mais il renforce la maturation cytoplasmique comme il est indiqué par la formation pronucléaire. D'après Aguilar *et al* (2001), le ralentissement de la maturation nucléaire fournit plus de temps à l'ovocyte pour synthétiser, de modifier et de stocker de nouveaux protéines et ribonucléoprotéines, et donc améliore sa compétence. Une étude récente a révélé que le liquide folliculaire favorise la maturation ovocytaire cytoplasmique lors de l'IVM et suggéré que son rôle majeur est de fournir une protection contre le stress oxydatif (Gruppen et Armstrong, 2010). D'après ces recherches, on peut conclure que l'ajout du liquide folliculaire au milieu est bénéfique pour avoir un taux de maturation satisfaisant et une compétence au développement.

Le troisième milieu que nous avons utilisé se compose de milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire, ce milieu a donné lieu à un taux de maturation égale à 63,79%, un taux inférieur à ceux obtenus par Cruz et al.,2014 et Gupta *et al.*, 2001 respectivement de 70.11% et 81,30% avec l'ajout de glutamine dans la deuxième culture. Par contre, le taux que nous avons obtenu est proche à 69%, celui obtenu par Choi *et al.*, 1998. D'après Watson *et al.*, 2000, l'addition de liquide folliculaire a donné un faible taux de maturation (52%) par rapport à l'enrichissement avec l'ECS (sérum de vache en chaleur) (78%), FBS (Sérum de Veau Fœtal) (79%) et le BAF (Fluide Amniotique Serum) (77%), ces résultats confirment la nécessité de présence des sérums dans le milieu de maturation.

En dernier, nous avons testé pour la première fois en Algérie le milieu de transport et de maturation des ovocytes (SMM) MOFA et nous avons obtenu un taux de maturation de 56,77%. D'après ces résultats, il n'y a pas de différence significative entre les différents milieux utilisés. Une étude récente réalisée par Barceló-Fimbres *et al.*,2015 qui ont testé ce milieu et n'ont remarqué aucune différence trouvée ($P > 0,1$) pour les taux de clivage au jour 2,5 lorsque le système SMM par rapport au témoin (83,1 contre 84,1% respectivement). Une autre étude menée par la California Polytechnic State University (CAL POLY) et MOFA a eu le même taux de

gestation pour les deux groupes (SMM et le témoin), mais un plus grand rendement d'embryons lorsque les ovocytes ont été maturés dans le milieu MOFA.

Conclusion:

Nous avons réalisé cette étude afin de pouvoir mettre en place un protocole de MIV des ovocytes bovins efficace, applicable au laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida. Nous nous sommes inspirés de plusieurs études bibliographiques pour préparer et tester nos milieux pour améliorer MIV.

Notre étude gagnerait en efficacité par l'enrichissement des milieux de culture avec différents sérums, hormones et facteurs de croissances présents au cours de la maturation in vivo et qui sont indispensables pour sa réussite in vitro d'une part, et de prendre en considération les qualités de l'animal avant l'abattage d'autre part. A ce titre, Kouamo *et al.*, 2014 ont signalé que les facteurs tels que l'âge, la gestation, BSC et la taille de l'ovaire doivent être pris en compte pour augmenter le potentiel de l'ovaire pour le FIV.

Notre travail qui consiste en la MIV des ovocytes bovins à valeur ajoutée, avec un fort impact sur le développement de la production in vitro pour obtenir des ovocytes matures et de qualité devant permettre une FIV réussie, assurant une culture d'embryons viables et transférables à des femelles receveuses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADEL.D, BOURADA.A, BOUCHAMA.N, NADJEMI.H (2009) Maturation ovocytaire in vitro chez la vache ITELV (Baba Ali) université saad saheb (Blida)
2. A.M. Luciano¹, F. Franciosi, C. Dieci, I. Tessaro, L. Terzaghi, S.C. Modena, V. Lodde (2014) Large-scale chromatin structure and function changes during oogenesis: the interplay between oocyte and companion cumulus cells, v.11, n.3, p.141-149
3. Andrew J. Watson^{2,4,5}, Paul De Sousa^{3,4,5}, Anita Caveney^{4,5}, Lisa C. Barcroft^{4,5}, David Natale^{4,5}, Jennifer Urquhart^{4,5} and Mark E. Westhusin⁶, 2000. Impact of Bovine Oocyte Maturation Media on Oocyte Transcript Levels, Blastocyst Development, Cell Number, and Apoptosis. 77843-4466
4. Angela Marie Klumpp B.S, (2001; 2004) THE EFFECT OF HOLDING BOVINE OOCYTES IN FOLLICULAR FLUID ON SUBSEQUENT FERTILIZATION AND EMBRYONIC DEVELOPMENT Louisiana State University
5. Anna R. Beker-van Woudenberg¹, Helena T.A. van Tol, Bernard A.J. Roelen, Ben Colenbrander and Mart M. Bevers² (2004) Estradiol and Its Membrane-Impermeable Conjugate (Estradiol-Bovine Serum Albumin) During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Effects on Nuclear and Cytoplasmic Maturation, Cytoskeleton, and Embryo Quality);70(5):1465-74.
6. Anonyme:http://www.mofaglobal.com/pdf/Oocyte_Shipping_Maturation_Medium.pdf, Consulté le 30/01/2017.
7. Bal Pénélope. 2014. Production in vitro d'embryon: Etude de faisabilité chez le chat. Thèse de docteur vétérinaire. Université Claude Bernard. Lyon I.
8. BETTERIDGE K.J., SMITH C., STUBBINGS R.B., XU K.P., KING W.A., 1989 Potential genetic improvement of cattle by fertilization of oocytes in vitro. J.Reprod.Fert.,1989, 38 Suppl., 87-98.
9. Brunet S., Maro B., 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. Reproduction, 130, 801-811.
10. CAHILL L.P.,1981. Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. J.Reprod.Fert,30 Suppl., 135-142.

11. Carabatsos M.J., Sellitto C., Goodenough D.A., Albertini D.F., (2000). Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.*, 226, 167-179.
12. Castrillon DH¹, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. (2003) Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. Jul 11;301(5630):215-8.
13. Danielle Monniaux, Alain Caraty, Frederique Clement, Rozenn Dalbiès-Tran, J. Dupont, Stéphane Fabre, N. Gérard, Pascal Mermillod, Philippe Monget, Svetlana Uzbekova (2009) Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères; *Inra Prod.Anim*, INRA, 22 (6), pp.59-76. <hal-00793623
14. Dekel N., 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 234, 19-25.
15. DRIANCOURT M.A., GOUGEON A., ROYERE D., THIBAUT C., 1991a La fonction ovarienne. In Thibault C, Levasseur MC. INRA (Edts), "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA ;, 273- 298.
16. Eppig J.J., Pendola F.L., Wigglesworth K., Pendola J.K., (2005). Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol. Reprod.*, 73, 351-357.
17. ERICKSON B.H., 1966b Developmental and senescence of the postnatal bovine ovary. *J.Anim.Sci.* 25, 800-805.
18. ERICKSON B.H., REYNOLDS R.A., MURPHEE R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cows. *Biol.Reprod.*,1976, 15, 555-560.
19. Fassi Fihri Aicha (2006) Collecte et maturation des ovocytes bovins : effet de l'état nutritionnel sur le rendement et la qualité des ovocytes, THÈSE Présentée pour obtenir le Diplôme de Doctorat d'Etat Es-Sciences Biologiques
20. Géraldine Bruyere (2002) thèse: Maturation ovocytaire in vitro chez la vache thèse de docteur vétérinaire
21. H. Karami Shabankareh, K. Sarsaifi, T. Mehrannia 2011; In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum, pp 531–537

22. H. Khatir, C. Carolan, P. Lonergan and P. Mermillod (1997) Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes, *Journal of Reproduction and Fertility* 111, 267-275
23. J.Kouamo - SM.Dawaye - AP.Zoli - GS.Bah (2014); Evaluation of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential for *in vitro* embryo production in the Adamawa plateau (Cameroon)]. 4(2):128-36. Epub
24. Marc-André Sirard and Karine Coenen (2006) *In Vitro* Maturation and Embryo Production in Cattle, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 348
25. Maria Helena Coelho Cruz¹, Naiara Zoccal Saraiva¹, Jurandir Ferreira da Cruz², Clara Slade Oliveira¹, Maite Del Collado¹, Hugo Fernandes³, Fernanda Cavallari de Castro³, Joaquim Mansano Garcia¹ (2014) Effect of follicular fluid supplementation during *in vitro* maturation on total cell number in bovine blastocysts produced *in vitro*, *R. Bras. Zootec.*, 43(3):120-126,
26. Masters J, Stacey G. Changing medium and passaging cell lines. *Nat Protoc.* 2007;2:2276-84 PMID 17853884
27. Mazerbourg S., Bondy C.A., Zhou J., Monget P., (2003). The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod. Domest. Anim.*, 38, 247-258.
28. McGarrity G.,1976 Spread and control of mycoplasmal infection of cell cultures. *In Vitro.*;12:643-8 PMID 1034618
29. McGee E.A., Hsueh A.J., (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. 21, 200-214.
30. Meenakshi Arora Ph. D., 2013 Milieu de culture: Une Revue, 2013;3:175
31. Mermillod P., Marchal R., 1999. Mammalian oocyte maturation. *Med. Sci. (Paris)*, 15, 148-156.
32. M. Barceló-Fimbres, L.F. Campos-Chillón, N.R. Mtango, J. Altermatt, L. Bonilla, R. Koppang, J.P. Verstegen; 2015; Improving *in vitro* maturation and pregnancy outcome in cattle using a novel oocyte shipping and maturation system not requiring a CO₂ gas phase. S0093-691X(15)00106-5
33. M. Hussain*, P. Chakravarty, S. Soren, S. Deori and S. S. Begum¹ (2015) Effect of recovery technique and culture media on *in vitro* maturation of indigenous cattle oocytes of Assam, National Research Centre on Yak, Dirang, West Kameng - 790 101, India. [10.5958/0976-0555.2015.00011.4](https://doi.org/10.5958/0976-0555.2015.00011.4)

34. M. Hussain*, P. Chakravarty, S. Soren, S. Deori and S. S. Begum¹ (2013) Effect of recovery technique and culture media on *in vitro* maturation of indigenous cattle oocytes of Assam, National Research Centre on Yak, Dirang, West Kameng - 790 101, India. 10.5958/0976-0555.2015.00011.4
35. M. Roldán-Olarte^{A B}, V. Mailló^A, M. J. Sánchez-Calabuig^A, A. Tío-Castro^A, P. Beltrán^A, D. C. Miceli^B, D. Rizos^A and A. Gutiérrez-Adán^A; 3 (2015) 199 EFFECT OF UROKINASE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR DURING IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES AND EARLY EMBRYO PRODUCTION. 28(2) 230-231
36. Nicosia S. 1975. Rabbit ovarian follicles I isolation technique and characterization at different stages of development. Biology of reproduction, 13, pp. 423 - 447.
37. Nilsson E.E., Skinner M.K.,(2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. Biol. Reprod., 69, 1265-1272.
38. Norris R.P., Freudzon M., Mehlmann L.M., Cowan A.E., Simon A.M., Paul D.L., Lampe P.D., Jaffe L.A., (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. Development, 135, 3229-3238.
39. Perlman D.,1979Use of antibiotics in cell culture media. Methods Enzymol.58:110-6 PMID 423753
40. PETERS H.,1976. The development and maturation of the ovary. Ann.Biol.Bioch.Biophys, 16, 271- 278
41. P. MERMIUOD (1), N. CROZET (2), Y. COGNIE (1) (1995) Production in vitro d'embryons bovins, ovins et caprins : le point et les perspectives, Renc. Rech. Ruminants 373 - 378
42. P.S.P Gupta, S. Nandi, B.M Ravindratha and B.V Sarma (2001) Effect of Buffalo Follicular Fluid Alone and in Combination with PMSG and M199 on in vitro Buffalo Oocyte Maturation, IVF Laboratory, National Institute and Physiology, Adugodi, Bangalore, India
43. P.V. DRION, J-F. BECKERS ,F.J. ECTORS, C. HANZEN, J-Y. HOUTAIN, P. LONERGAN (1996) LE POINT VETERINAIRE, vol. 28, numéro spécial "Reproduction des ruminants"
44. Reddy, D. V. ; Elanchezhian, N., (2008). Evaluation of tropical tree leaves as ruminant feedstuff based on cell contents, cell wall fractions and polyphenolic compounds. Livest. Res. Rural Dev., 20 (5): 77
45. RUSSE I.,1983. Oogenesis in cattle and sheep. Bibl.Anat, 24, 77-92.

46. Rothblat GH, Cristofalo VJ. 1972; Growth, Nutrition and Metabolism of cells in culture. New York: Academic Press.
47. Sadeesh E.M, F. Shah, A.K. Balhara, S.M.K. Thirumaran, S. Yadav, P.S. Yadav (2014) Effect of growth and antioxidant on in vitro maturation of oocytes and cleavage rates of in vitro produced Indian buffalo (*Bubalus bubatis*) embryos *VETERINARSKI ARHIV* 84 (5), 459-474
48. Saranya Satitmanwiwat1*,Chinarat Changsangfah1, Tassanee Faisaikarm1, Kulnasan Saikhun1 and Kampon Kaeoket2, 2015. Effect of Different Charged Groups of Cow Follicular Fluid Proteins on *In Vitro* Oocyte Maturation
49. Satitmanwiwat1*,Chinarat Changsangfah1, Tassanee Faisaikarm1, Kulnasan Saikhun1 and Kampon Kaeoket2 (2015) Effect of Different Charged Groups of Cow Follicular Fluid Proteins on *In Vitro* Oocyte Maturation
50. Sh Bohlooli, Ş Bozoğlu, F Cedden (2015) HEPES buffer in ovary-transportation medium influences developmental competence of cattle oocytes
51. Shi DS, Avery B, Greve T.,1998. Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*;50:667-74.
52. Shimasaki S., Moore R.K., Otsuka F., Erickson G.F., (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, 25, 72-101.
53. S. M. B. Ulloa ^{A B}, J. Heinzmann ^A, D. Herrmann ^A, U. Baulain ^A, K.-G. Haderler ^A, P. Aldag ^A, A. Lucas-Hahn ^A and H. Niemann ^A ; 3 (2015) 197 EFFECTS OF PRE-*IN VITRO* MATURATION WITH CAFFEINE ON BOVINE OOCYTE DEVELOPMENTAL CAPACITY. 28(2) 229-230
54. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A., 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 414-424.
55. Terret M.E., Wassmann K., 2008. Meiotic weakness: the first division. *Med. Sci. (Paris)*, 24, 197-203.
56. Visser et Themmen (2005) Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. 29;234(1-2):81-6.
57. V. GAYRARD (2007) *PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DES MAMMIFERES*,

58. Y.Fukui and H.Ono (1989) effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes / doi 10.15.30/ jrf: 00860501

59. http://www.mofaglobal.com/pdf/Oocyte_Shipping_Maturation_Medium.pdf

[Tapez le titre du document]

Annexe II:

Tableau 02: Tableau synthétique des milieux et des conditions de la maturation ovocytaire in vitro.

Etude	Milieu de base	Hormones	Supplémentation en protéines/énergie	Antibiotiques	Conditions et durée d'incubation	Taux de MIV
Hussain et al., 2015	TCM 199	FSH porcine (0.05ug/ml)	- Pyruvate de sodium (0.0009g/ml) - L-glutamine (0.0001g/ml) - FF (1ml/10ml) - HIOCS (1ml/10ml)	Gentamycine (50ug/ml)	- 5% Co2 - 38.5 C° -Pendant 24h	86.90%
	Ham's F-10					36.66%
	Ham's F-12					68.33%
Satitmanwivat et al., 2015	TCM 199	pFSH (10mg/ml) LH (5mg/ml) Oestradiol (1ng/ml)	SVF (10%)		- 5% Co2 - 38 C° -Pendant 24h	79,80%
			SVF (10%)			53,50%
			SVF (10%) FF brut (10%)			78,80%
			SVF (10%) Fraction basique du FF (10%)			66,30%
			SVF (10%) Fraction acide du FF (10%)			79,30%
Sadeesh et al., 2014	TCM 199	-PMSG (20UI/ml) -hCG (10UI/ml)	- FBS (10%) - Pyruvate de sodium (0.80 mM) - L-glutamine (2mM)	Gentamycine (50pg/ml)	- 5% Co2 - 38.5 C° -Pendant 24h	65.7% (Expansion) 57.5% (1 ^{er} GP)
			-ECG (10ng/ml) - B-mercaptoéthanol (25uM)			81.5% (Expansion) 67.5% (1 ^{er} GP)
			-EGF (20ng/ml) - B-mercaptoéthanol (100uM)			94.4% (Expansion) 83.5% (1 ^{er} GP)
			-EGF (100ng/ml) - B-mercaptoéthanol (500uM)			79.6% (Expansion) 62.5% (1 ^{er} GP)
Hussain et al., 2013	TCM 199	FSH porcine (0.05ug/ml)	- Pyruvate de sodium (0.0009g/ml) - L-glutamine (0.0001g/ml) - FF (1ml/10ml) - HIOCS (1ml/10ml)	Gentamycine (50ug/ml)	- 5% Co2 - 38.5 C° -Pendant 24h	84.52%
	Ham's F-10					28.33%
	Ham's F-12					58.33%
Adel et al., 2007	TCM 199		- SVF (10%) - Glutamine (2%)	- Pénicilline -Streptomycine (200ul)	-5% Co2 -100% humidité - 38.5 C° - Pendant 24h	54.92%
	MEM					50%
	MEM					hCG (40UI)
Fassi., 2006	199 Hepes (8.5ml)	-E2 17B (10ul) - FSH/LH (100ul)	- SVF (1.5ml) - Cellules de la granulosa (6×10 ⁶ /ml)	Gentamycine (100ul)	- 5% Co2 - 39 C° -Pendant 24 à 26h	20.74%
/	/	/	/ 70 -SVF (2ml) - Faible [FF]	/	/	/

[Tapez le titre du document]

Bruyere., 2002	TCM 199 (18ml)	(20ug) - FSH (200ug)	- Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes	- Antibiotique - Antifongique (200ul)	- 5% Co2 - Air saturé en eau - 38.5 C° - Pendant 24h	22.22%	
		- Œstradiol (20ug) - FSH (200ug) - LH (40ug)	- EGF (100ng) - Faible [FF] - Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			87.5%	
		- FSH (200ug) - LH (40ug)	- SVF (2ml) - EGF (100ng) - Faible [FF] - Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			83.87%	
		- FSH (200ug) - LH (100ug)	- SVF (2ml) - EGF (200ng) - Glutamine (4mg) - Cystéine (0.6mg) - Glycine (6mg) - Taurine (4mg) - Hypotaurine (4mg) - Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			76.66%	
		- FSH (200ug) - LH (100ug)	- BSA (4.7g/l) - EGF (200ng) - Glutamine (4mg) - Cystéine (0.6mg) - Glycine (6mg) - Taurine (4mg) - Hypotaurine (4mg) - Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			66.66%	
Gupta et al., 2001	TCM 199	/	- Seteer sérum (10% v/v) - Glutamine (100ug/ml) - Huile minérale (50ul)	Gentamycine (50ug/ml)	-5% Co2 - 39 C° - Pendant 24h	34.7%	
		PMSG (40UI/ml)				82.3%	
		/	- FF de buffle (10% v/v) - Huile minérale (50ul) - Glutamine (100ug/ml)			64.3%	
		PMSG (40UI/ml)				92.4%	
		/	- FF de buffle (50% v/v) - Huile minérale (50ul) - Glutamine (100ug/ml)			81.3%	
		PMSG (40UI/ml)				97.3%	
	/	- FF de buffle (100% v/v) - Huile minérale (50ul) - Glutamine (100ug/ml)	90.8%				
/		92.4%					
Foote et Thibault., 1969	TCM 199	/	- Sérum de veau (15%)	Streptomycine (100ug/ml)	- 5% Co2 - Pendant 30h	37.64%	
		/	- Sérum de veau (15%) - Insuline (5ug/ml)			- Pendant 29 à 30h	41.75%
		- FSH (10ug/ml) - LH (2ug/ml)	- Sérum de veau ou de poulin (15%)			- Pendant 20 à 30h	40.38%
		/	- FF			- Pendant 26h	0%

Annexe I:

Tableau 01: Tableau synthétique des techniques de ponctions des ovaires, des milieux et des conditions de leur transport.

Etude	Milieux de transport des ovaires	Température et durée de transport	Techniques de ponction des follicules	Milieux de base pour MIV	Taux de MIV
Bohlooli et al., 2015	K Simplex Optimization Médium (KSOM)	- 4C° - 2 à 3h	Tranchage	TCM199	80.2% (MIV) 43.2% (embryons clivés)
	Pijako-Ziomek Bavister (CZB)				41.1% (embryons clivés)
	Charles Rosenkrans 1 (CR1)				80.5% (MIV) 43.6% (embryons clivés)
Hussain et al., 2013	- Solution saline normale - Pénicilline G (0.06g/100ml)	- 26 à 37C° - 2 à 3h	Aspiration	TCM199	86.90%
			Dissection		90.24%
			Aspiration	Ham's F-12	68.33%
			Dissection		77.58%
			Aspiration	Ham's F-10	36.66%
			Dissection		40.00%
Adel et al., 2007	/	-30 à 35C° - 2h	Aspiration	TCM199	55.55%
				MEM	50%