

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Blida 1
Institut des Sciences Vétérinaires



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

Essai de maturation d'ovocyte bovin in vitro

Présenté par

Belaïd Abdeslem et Bentaleb Lydia

Membres de jury :

Président(e) :	KAIDI.R	Professeur	ISV Blida
Examineur :	YAHIMI.A	MCB	ISV Blida
Examineur :	KALEM.A	MCB	ISV Blida
Promoteur :	ADEL.DJ	MAA	ISV Blida

Année universitaire : 2017/2018

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Blida 1
Institut des Sciences Vétérinaires



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

Essai de maturation d'ovocyte bovin in vitro

Présenté par

Belaïd Abdeslem et Bentaleb Lydia

Membres de jury :

Président(e) :	KAIDI.R	Professeur	ISV Blida
Examineur :	YAHIMI.A	MCB	ISV Blida
Examineur :	KALEM.A	MCB	ISV Blida
Promoteur :	ADEL.DJ	MAA	ISV Blida

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Il est primordial de remercier « ALLAH » le Tout-Puissant de tout ce qu'il nous apporte dans la vie et de nous avoir donné la force, le courage, la volonté et la patience et nous'a fourni l'énergie nécessaire pour réaliser ce travail.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur, M. ADEL. D. pour son savoir-faire, sa compétence, sa patience, et ses conseils bien avisés, pour ses remarques constructives qui ont contribué à l'amélioration de ce mémoire.

Au professeur KAIDI. R

Nous sommes Très honoré de Vous avoir comme président du jury de notre thèse.

Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçus en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance.

Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous.

Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

Veillez, cher Maître, trouvé dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

À monsieur YAHIMI. A

C'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger dans notre jury. Nous tenons à vous remercier docteur, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire, mais également pour votre précieuse aide ainsi que votre disponibilité à notre égard tout au long de notre parcours.

À monsieur KALEM.A

C'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger dans notre jury. Nous vous sommes très reconnaissants de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger notre travail. Veuillez trouver, chère Maître, le témoignage de notre grande Reconnaissance et de notre profond respect.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation ainsi qu'à tout le personnel du département vétérinaire.

Nous tenons enfin à exprimer notre reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail ainsi qu'à toute personne qui fera l'effort de lire ce document.

Résumé

L'objectif de notre travail est de choisir un milieu favorable pour la maturation in vitro des ovocytes bovins. La récolte des ovocytes a été faite après ponction des ovaires d'abattoir, ces derniers ont été acheminés dans une solution saline seule (NaCl à 0.9%) à une température comprise entre 20 à 25°C. Nous avons testé 03 milieux de maturation in vitro des ovocytes bovins. Cependant nous avons choisi le milieu TCM199 comme milieu de base.

D'après nos résultats, le taux global de maturation est de 36.66%. Dans le premier milieu, nous avons testé le milieu de base seul (TCM199) et a donné un taux de maturation égal à 40%. Dans le deuxième milieu, nous avons enrichit le milieu de base avec 10% de liquide folliculaire, ce qui a donné un taux de maturation de 56.52% plus élevé par apport au précédent. Dans le troisième milieu, on a rajouté 50% de liquide folliculaire au milieu de base qui a donné un taux de maturation de 20.83%.

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

The objective of our work is to compare the in vitro maturation rates of bovine oocytes obtained by media enriched by follicular fluid at different proportions.

Oocyte harvesting was done after puncture of the slaughterhouse ovaries, which were fed in saline alone (NaCl) at 20-25 ° C. We tested 03 in vitro maturation media of bovine oocytes.

We chose the TCM199 medium as the base medium.

Based on our results, the overall maturation rate is 36.66%. In the first medium, we tested the basal medium alone (TCM199) and gave a maturation rate of 40%. In the second medium, we enriched the basal medium with 10% follicular fluid, which gave a maturation rate of 56.52% higher by contribution to the previous one. In the third medium, 50% follicular fluid was added to the basal medium which gave a maturation rate of 20.83%.

From these results, we have noted the need to develop certain techniques of manipulation and enrichment of the basic medium in order to improve the oocyte quality and increase the maturation rates in vitro.

Key words: Maturation, oocytes, cattle, environment, techniques, enrichments.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو مقارنة نسب النضوج المخبري للبويضات البقرية في الوسط القاعدي المثرى بمختلف نسب السائل الجريبي.

تم استرجاع البويضات عن طريق شفطها من الجريبات المتواجدة على سطح المبايض التي تم الحصول عليها هي الاخير من المذبج و التي تم نقلها الى المختبر في محلول ملحي في درجة حرارة بين 25 و 20 درجة مئوية .

قمنا بتجربة 03 اوساط نضوج مخبري للبويضات البقرية في المختبر.

بناء على نتائجنا, فان معدل النضوج الاجمالي قدر ب 36.66 بالمئة, في وسط النضوج الاول المتكون من المحلول القاعدي وحده تحصلنا على معدل نضوج مقدر ب 40 بالمئة اما بالنسبة للوسط الثاني المتكون من الوسط القاعدي مدعوم ب 10 بالمئة من السائل الجريبي تحصلنا على نسبة نضوج قدرت ب 56.52 بالمئة اما بالنسبة للوسط الثالث المتكون من الوسط القاعدي مدعوم ب 50 بالمئة من السائل الجريبي فأعطى نسبة ضئيلة قدرت ب 20.83 بالمئة .

من النتائج المتحصل عليها وجدنا ان هناك ضرورة في التطوير في بعض التقنيات المستعملة و اثناء وسط النضوج القاعدي للتحسين من جودة البويضات والزيادة في معدلات النضوج المخبري.

الكلمات المفتاحية : النضوج ,بويضة ,بقرى , الوسط , تقنية , اثناء

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I: Physiologie de la reproduction

1- Anatomie de l'ovaire	2
2- physiologie d'ovaire	2
2-1- L'ovogenèse	3
2-2- folliculogenèse	3
a. Phase de multiplication	3
b. Phase de croissance	4
c. Phase de maturation	7
2-2-1- La folliculogenèse basale (gonadotrophine indépendante)	9
2-2-2- La folliculogenèse terminale (Phase gonadotrope-dépendante)	10
2-3- Régulation endocrinienne du cycle ovarien	14
2-3-1- Contrôle de la sécrétion de la GnRH	14
2-3-2- Contrôle de la sécrétion de LH et de FSH	15

Chapitre II: Maturation ovocytaire in vitro

1- collecte des ovocytes	17
1-1- Collecte des ovocytes à partir des ovaires prélevés des animaux abattus	17
1-1-2- Techniques de récolte des ovocytes	18
1-2- Collecte des ovocytes bovins in vivo (OPU)	20
2-Milieu de collecte des ovocytes	21
3- Evaluation de la qualité des ovocytes	21
3-1- Selon le diamètre des follicules	22
3-2- Selon les caractéristiques morphologiques du COCs	22
3-3- Selon l'aspect de la chromatine de la VG	23
4- Choix des ovocytes pour la maturation et la fécondation in vitro.....	25
5- Milieux de maturation	25
a. Milieux de base	25
b. Supplémentassions	26
6- Liquide folliculaire	29
6-1- Caractéristiques physique	29

6-2- Composition	29
6-3- Rôle	32
7- Conditions de la mise en incubation et MIV	32
8- Evaluation et classification des ovocytes après MIV	35
8-1- Selon le degré d'expansion du cumulus	35
8-2- Selon la maturation nucléaire	35
8-3- Selon la maturation cytoplasmique	35
9- Fécondation in vitro	36

Partie expérimentale

I. Matériel	37
II. Méthodes	37
II.1. collecte et acheminement des ovaires	37
II.2. Ponction des ovaires	39
II.3. Préparation du liquide folliculaire.....	41
II.4. Observation	41
II.5. Classification des COCs.....	42
II.6. Les milieux utilisés pour la MIV.....	43
II.7. La mise en culture des COCs	43
II.8. Résultats	45
III. Discussion	47
IV. Conclusion et recommandations	48
Références bibliographiques.....	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : Milieux et des conditions de transport des ovaires	18
Tableau 2 : Taux de maturation obtenu dans différent milieux de maturation	34
Tableau 3 : Taux de récupérations des COCs dans les 03 expérimentations	45
Tableau 4 : Pourcentages des COCs selon leurs classes.....	45
Tableau 5 : Résultats obtenus après MIV dans différentes milieux	45

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'évolution d'un follicule (D'après Secchi) (Drion et Beckers., 1996)	7
Figure 2 : Phases de la folliculogenèse.....	11
Figure 3: Vagues de croissance folliculaires au cours du cycle œstral de la vache (Gayrard,2007)	12
Figure 4 : Schéma récapitulatif du contrôle hormonal du cycle ovarien chez la vache (Peters et Ball, 1994)	16
Figure 5 : Ponction Des follicules par la technique d'aspiration (Satrapa et al., 2010)	19
Figure 6 : Technique de ponction écho-guidé chez le bovin (Hanzen., 2016)	21
Figure 7 : Classification des ovocytes bovins après récolte selon Hanzen (2016) A: Ovocyte classe 01, B: Ovocyte classe 02, C: Ovocyte classe 03, D: Ovocyte classe 04	23
Figure 8 : Changements dynamiques de la configuration de la chromatine dans la vésicule germinale du stade GV0 au stade GV3 d'après Luciano et al., 2012	24
Figure 9 : Prélèvements des ovaires par section de ligament large à l'aide de lame de bistouri ou ciseau	38
Figure 10 : Verrière contenant les ovaires Figure 11 : Sac isotherme	38
Figure 12 : Produits utilisés pour la désinfection la paille	39
Figure 13 : Préparation des ovaires à la ponction	39
Figure 14 : Ponction des follicules en surface	40
Figure 15 : Liquide obtenu à partir de la ponction des follicules d'un diamètre inférieur à 08mm	40
Figure 16 : Liquide obtenu à partir de la ponction des follicules d'un diamètre supérieur à 8mm	41
Figure 17 : Matériel nécessaire pour la préparation et la conservation du liquide folliculaire	41
Figure 18 : observation et prélèvement des COCs à l'aide d'une paillette attaché à une seringue d'insuline pour être rincer 3 fois	42
Figure 19 : COCs classe 01 Figure 20 : COCs classe 02	43
Figure 21 : COCs classe 03 Figure 22 : COCs classe 04	43
Figure 23 : Boîte multi-puits, sac en plastique fermé hermétiquement	44
Figure 24 : Etuve réglée à 38C°	44
Figure 25 : Ovocytes expansés après maturation	46

Liste des abréviations

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

BFF : bovin fluide folliculaire

CCO : co-culture complexes

COCs: complexes oocyte cumulus

CR1: Charles Rosenkrans 1

CSF: *Cerebrospinal fluid*

cSOFMaa: stands for cultured in synthetic oviduct fluid medium + citrate and amino acids

CZB: Pijako-Ziomek Bavister

DIV : développement in vitro

E2: oestradiol

eCG: Equine chorionic gonadotropin

EGF: epidermal growth factor ou facteur de croissance épidermique

EGF: *Epidermal growth factor*

FBS: Fetal bovine serum

FIV: Fécondation in vitro

FSH: l'hormone folliculo-stimulante

GH: growth hormones

GnRH: gonadotrophin releasing hormone ou gonadolibérine

GSH: glutathion

Ham's: Nutrient Medium

hCG: *human chorionic gonadotropin*

HEPES: hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer

HIOCS: hydrophobic ionogenic organic compounds

Hmg: Heavy machine gun

IGF: insulin-like growth factor

IGFBPs: Insulin-like growth factor-binding protein

IGFs: insulin-like growth factor

IL: Interleukin

KSOM: K Simplex Optimization Médium

LH: l'hormone lutéinisante

LIF: Leukemia inhibitory factor

MCT: mono-carboxylate transporteurs

MIS: Meiosis Inducing Substance

MIS Meiotic Inducing Substance

MIV: la maturation in vitro

MPF, Meiotic Promoting Factor

OMI: Oocyte Meiosis Inhibitor

OPU: Ovum Pick Up

PBS: Phosphate Buffered Saline

PBS: phosphate-buffered saline

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PIV: production d'embryon in vitro

SMM: Shipping and Maturation Medium

SVF: *sérum de veau fœtal*

TCM-199: Tissue Culture Medium 199

TGF: *Transforming growth factor*

TNF α : *Tumor necrosis factor*

TNF-alpha: *tumor necrosis factor*

VEGF: vascular endothelial growth factor

VG: vésicule germinale

ZP: zone protéine

Introduction générale

En Algérie, le cheptel bovin est un indicateur assez important dans l'économie, car il constitue une source qui couvre une partie des besoins nationaux en protéines animales (viande, lait) et valorise la main-d'œuvre employée en milieu rural.

La baisse de la fertilité des vaches de haute qualité génétique a poussé la recherche à trouver des alternatives de sélection génétique afin de résoudre cette problématique. Au cours des dernières années, les technologies comme le transfert des embryons, la production embryonnaire *in vitro* et la cryo-préservation embryonnaire se sont développées pour améliorer l'efficacité des programmes de sélection génétique et les résultats de l'insémination artificielle.

Il est classique de distinguer trois générations de biotechnologies de l'embryon. La première génération a permis de produire des embryons *in utero* après stimulation hormonale des femelles donneuses (super ovulation). Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation. La deuxième génération s'appuie sur la production d'embryons en culture, après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant ou après abattage

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 est très importante, car elle détermine la qualité des cellules pour l'obtention d'embryons transférables après fécondation *in vitro*. En effet, elles permettent à l'ovocyte d'être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, d'assurer la formation simultanée des pronucléus et leur développement ultérieur jusqu'au stade morula ou blastocyste (Dieleman *et al.*, 1983 ; Mermillod, 2001). En outre, la maturation *in vitro* joue un rôle important pour le clonage. Elle permet l'obtention d'une source d'ovocytes «donneuse » (en métaphase II) à coût réduit et en grand nombre (Heymanet *al.*, 1990).

L'objectif de ce type de biotechnologie est d'éviter dans un premier temps le gaspillage programmé de la réserve folliculaire ovarienne imposée par le phénomène d'atrésie, augmenter le potentiel reproducteur des femelles d'élite, réduire, ainsi, l'intervalle entre générations. Puis faciliter les échanges commerciaux avec le développement de la cryoconservation.

Introduction

Chez tous les mammifères, l'appareil génital femelle présente au cours de la période d'activité génitale, des modifications morphologiques et physiologiques se produisant toujours dans le même ordre et revenant à intervalles périodiques, suivant un rythme bien défini pour chaque espèce.

Ces modifications, constituant le cycle œstral, commencent à la puberté, se poursuivent tout au long de la vie génitale et ne sont interrompues que par la gestation. Elles dépendent de l'activité cyclique de l'ovaire, régulée par ses propres sécrétions hormonales, elles-mêmes sous dépendance étroite des hormones gonadotropes hypothalamo-hypophysaires.

1- Anatomie de l'ovaire

Les ovaires sont en nombre paires de forme d'une amande (Cuq et Agba, 1975); ils ont souvent une forme ovoïde ou sub-ovoïde .Leur surface est plus ou moins régulière selon la période dans le cycle de reproduction : lisses hors période de reproduction et globuleux sinon elle est bosselée par des structures telles que les follicules à différents stades de croissance et le corps jaune.

Ils sont constitués d'une médulla occupe la partie centrale de l'ovaire et est composée de tissu conjonctif lâche, contenant des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs et d'un cortex périphérique qui est le siège de l'activité folliculaire (Marieb, 1999), au sein duquel on distingue des "organites ovariens" de taille variable : follicules, corps jaune, corps atrétiques (produits de dégénérescence des follicules et des corps jaunes).

Ils sont suspendus au bord antérieur du ligament large et situé en avant du bord antérieur du pubis.

2- physiologie d'ovaire

La fonction de l'ovaire est de produire à chaque ovulation un ou plusieurs ovocytes fécondables et de créer un environnement hormonal propice au démarrage éventuel d'une gestation. 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. Ces processus, initiés pendant la vie fœtale, se poursuivent pendant toute la vie de la femelle

(jusqu'au ménopausée) et sont étroitement contrôlés à chacune de leurs étapes par de nombreux facteurs hormonaux et environnementaux. (Monniaux *et al.*, 2009).

2-1- L'ovogenèse

L'ovogenèse est définie comme étant l'ensemble des processus conduisant à la formation et au développement des gamètes femelles et les rendant aptes à être fécondés par les spermatozoïdes. (Derivaux et Ectors, 1986).

2-2- folliculogenèse

La folliculogenèse est l'ensemble des phénomènes qui caractérisent l'apparition, la croissance, et la maturation des follicules. C'est encore la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de la réserve jusqu'à l'ovulation, où au cas le plus fréquent dont 99% les follicules sont voués à l'atrésie (Driancourt *et al.*, 2001a). Elles sont indissociables du développement de l'ovocyte qu'ils renferment.

a. Phase de multiplication

Les cellules germinales souches se multiplient entre le 60e et le 170e jour de gestation (Erickson, 1966a ; Russe, 1983 ; Wandji *et al.*, 1992). Se forme ainsi pendant la gestation un stock de 2 millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase I . L'induction de la méiose serait contrôlée par un facteur d'origine mésonéphrotique appelé MIS (Meiosis Inducing Substance), synthétisé par les cellules mésenchymateuses de l'ovaire (Westergaard *et al.*, 1985). Le contact des ovogonies avec les cellules d'origine mésonéphrotique est donc indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires (Byskov, 1979). A cette même période, quelques cellules endothéliformes et une membrane conjonctive dite basale, future membrane de Slavjanski, viennent entourer l'ovocyte primaire formant ainsi les follicules primordiaux qui représentent la réserve des cellules germinales d'où s'échapperont les follicules destinés à se développer et dont quelques-uns seulement arriveront à maturité. Cette phase de multiplication est, chez la plupart des mammifères, terminée avant ou peu après la naissance. (Gerard *et al.*, 1953).

L'importance du stock folliculaire ainsi 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).

b. Phase de croissance

Cette phase de croissance ne concerne que 10 % du stock folliculaire. Comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et celui de l'ovulation, elle est particulièrement longue et variable selon les espèces. Chez la ratte, elle a été estimée à 21 jours soit 17 jours pour atteindre le stade cavitaire et 4 à 5 jours pour atteindre le stade ovulatoire (Hirshfield et Midgley, 1978). Chez la brebis, elle serait de 6 mois soit 130 jours pour atteindre le stade antral puis 50 jours jusqu'à l'ovulation (Cahill et Mauleon, 1980).

Cette phase se caractérise par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme. Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordial, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaire et de DeGraaf représentant les follicules antraux (Monniaux et *al.*, 1983 ; Lussier et *al.*, 1987 ; Hulshof et *al.*, 1994) .

❖ les follicules préantraux

Le follicule primordial, centré par l'ovocyte I, est entouré de quelques cellules folliculaires endothéliformes. Son diamètre moyen est entre 30-40 μm (Drion et *al.*, 1996). Habituellement localisé en périphérie de l'ovaire, il représente le stade folliculaire quiescent. L'ovocyte, de diamètre compris entre 20 et 35 μm , se trouve bloqué au stade diplotène de la prophase de sa première division méiotique (ovocytes primaires) (Sirard et *al.*, 1989) par un polypeptide produit par la granuleuse des follicules primaires et secondaires: l'OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor).

Le follicule primaire se caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par l'agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise et sécrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse: la zone pellucide. D'une épaisseur d'une dizaine de microns, elle est constituée à 95 % de trois glycoprotéines, organisées en longs filaments interconnectés,

appelées ZP1, ZP2, ZP3. La ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par la ZP1. Seule la glycoprotéine ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (Yanagimachi, 1994). La ZP2 intervient lors de la fécondation en fixant transitoirement la tête du spermatozoïde pendant que celui-ci traverse la zone pellucide. La ZP1, composant le moins abondant (10 %), assure la stabilité de la zone pellucide jusqu'au stade blastocytaire. Le diamètre du follicule primaire est compris entre 60 et 80 μm et celui de l'ovocyte qu'il renferme entre 30 et 40 μm .

Au stade de follicule secondaire, l'ovocyte a atteint son volume maximal. Il s'est entouré d'une zone pellucide bien différenciée et de deux ou trois couches de cellules cubiques formant la granulosa. L'ensemble est limité extérieurement par la membrane basale qui s'est transformée en membrane de Slavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de protéohéparanesulfate. Le diamètre du follicule secondaire est compris entre 200 et 400 μm . Celui de l'ovocyte est d'environ 60 μm .

❖ Les follicules antraux

-Le follicule tertiaire est dit cavitaire ou antral en raison de l'apparition au sein des couches de cellules folliculaires de petites cavités résultant de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de la sécrétion des cellules de la granulosa. Ces cavités finissent par confluer pour former l'antrum. Le follicule atteint à ce moment la taille de 3 à 4 mm et l'ovocyte un diamètre compris entre 100 et 130 μm . Le développement progressif de l'antrum entraîne la séparation des cellules de la granulosa en cellules du cumulus. Celles-ci se différencient en corona radiata, couche cellulaire entourant directement l'ovocyte. Ces cellules du cumulus et de la corona présentent de nombreuses zones jonctionnelles (GAP Junction) qui constituent autant de moyens de communication entre l'ovocyte et la cavité folliculaire (Gayraud., 2007).

Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante compris entre 25 et 50. Il dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules qui s'atrophient (Armstrong, 1993). Le volume de l'ovocyte demeure inchangé mais les cellules qui l'entourent se disposent de manière radiale, d'où le nom de corona radiata donné à cette couche cellulaire péri-ovocytaire en continuité avec la granulosa par le cumulus oophorus. A ce stade, et chez tous les mammifères, le follicule cavitaire s'entoure, en dehors de la membrane de Slavjanski, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riches en ARN et en enzymes nécessaires à la stéroïdogenèse, et par la thèque externe formée d'un tassement de tissu

conjonctif du stroma ovarien. Des vaisseaux sanguins colonisent les deux thèques, mais ne traversent pas la membrane basale, laissant la granulosa avascularisée (Gayraud, 2007).

Le follicule mûr ou follicule de DeGraaf représente la phase terminale du développement folliculaire. Cette phase ne concerne qu'un follicule sur 1000 entré en croissance (Saumande, 1991).

Le follicule mûr se caractérise par une taille maximale de 10 mm chez la brebis et la truie et de 25 mm chez la vache, par un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse. Gonflé de liquide, le follicule affleure en surface de l'ovaire. L'ovocyte demeure enfermée dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et des cumulus oophorus. Les thèques interne et externe sont bien différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne. La thèque interne est une glande à part entière. La thèque externe est de nature fibreuse. Une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et de la membrane basale. La taille du follicule cavitaire passe en 45 jours de 0,2-0,4 mm à 6-8 mm chez la brebis et à 16 mm chez la femme (Driancourt et *al.*, 1991a). Chez la vache, il faut respectivement 30 et 42 jours pour qu'un follicule de 0,13 mm atteigne une taille de 2 à 3 mm rendant possible son diagnostic échographique et la taille préovulatoire (Lussier et *al.*, 1987). L'augmentation progressive de la taille du follicule résulte davantage de la formation de l'antrum et de l'accumulation du liquide antral que d'une multiplication cellulaire. En effet, l'activité mitotique se réduit progressivement pour céder la place à une différenciation cellulaire plus importante (Turnbull et *al.*, 1977 ; Lussier et *al.*, 1987). Mesurée par l'index mitotique des cellules de la granuleuse, la vitesse de croissance du follicule évolue en fonction de son diamètre. Ainsi, chez la brebis, l'index mitotique est 4 fois moins élevé pour les follicules de 1,1 mm que pour ceux de 0,4 ou de 3,5 mm (Driancourt et *al.*, 1991a). L'index mitotique, le nombre et la distribution des follicules en croissance selon leur taille est par ailleurs très variable selon les individus (Saumande, 1991).

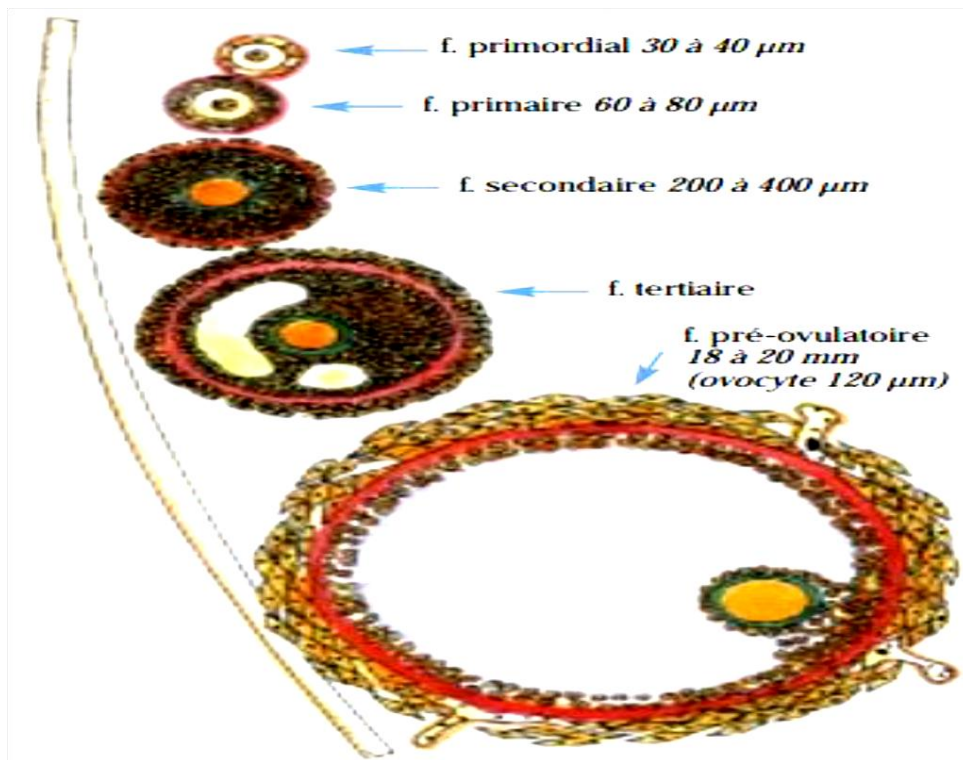


Figure 1 : Représentation schématique de l'évolution d'un follicule (D'après Secchi) (Drion et Beckers., 1996)

c. Phase de maturation

Elle concerne surtout l'ovocyte. Cette phase représente l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte de l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, à assurer la formation des pronucléus paternel et maternel et à permettre, grâce à ses réserves (ARNm, ribosomes, protéines élaborés pendant la phase de croissance) le début du développement embryonnaire (Hanezn et *al.*, 2000). Elle implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte.

Lorsque l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa maturation nucléaire proprement dite, c'est-à-dire la reprise de la méiose. Celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire : l'ovocyte I se transforme en ovocyte II. Lors du cycle sexuel, la maturation nucléaire ne survient qu'après la décharge ovulante. Elle prend fin juste avant l'ovulation lors de l'émission du premier globule polaire dans l'espace périvitellin ovocytaire (Hanezn et *al.*, 2000).

La reprise de la division méiotique n'a pas lieu tant que l'ovocyte reste en contact avec les cellules de la granuleuse. Ce fait laisse supposer l'intervention de facteurs inhibiteurs de la méiose tels l'AMPc cyclique, le ou les OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor) et les nucléosides

puriques: hypoxanthine et adénosine. Il semblerait néanmoins que, plus que de l'action de facteurs inhibiteurs, cette reprise de la méiose soit sous le contrôle d'un facteur inducteur appelé MPF (Meiotic Promoting Factor) ou encore MIS (Meiotic Inducing Substance). Ces facteurs atteindraient l'ovocyte notamment par l'intermédiaire de jonctions cellulaires (GAP-junctions) dont le nombre augmente sous l'influence de l'oestradiol et de l'AMPc. L'activation des récepteurs à la LH des cellules de la granuleuse induite lors de la décharge ovulante permet non seulement à l'ovocyte de reprendre sa méiose (maturation nucléaire), mais également de réaliser sa maturation cytoplasmique, préalable essentiel au succès de la fécondation (Hanezn et al., 2000).

La maturation cytoplasmique de l'ovocyte se caractérise par la multiplication des mitochondries, par l'apparition d'un appareil de Golgi bien développé et par la migration des granules corticaux vers la périphérie de l'ovocyte, juste sous la membrane plasmique. Ces granules contiennent une ovopéroxydase qui, lors de la fécondation, a pour effet d'empêcher la pénétration de spermatozoïdes supplémentaires et dès lors de prévenir la polyspermie. Le cytoplasme est également le siège d'importantes protéosynthèses préparant l'ovocyte à une éventuelle fécondation et contribuant au développement précoce de l'embryon (Hanezn et al., 2000).

La maturation membranaire comprend l'ensemble des processus permettant la reconnaissance spécifique de l'ovocyte par le spermatozoïde. La membrane pellucide synthétisée pendant la croissance ovocytaire joue un rôle important lors de la fertilisation. Elle doit notamment ne laisser pénétrer dans l'ovocyte que le spermatozoïde fécondant, favoriser et préparer la fusion spermatozoïde-ovule et protéger l'ovocyte contre la polyspermie (Hanezn et al., 2000).

Arrivé à ce stade de maturation nucléaire, cytoplasmique et membranaire l'ovocyte est susceptible d'être fécondé s'il est mis en présence de spermatozoïdes ayant eux-mêmes subi la capacitation et la réaction acrosomique. Parmi tous les facteurs présents dans le fluide folliculaire, certains sont corrélés à la capacité des ovocytes qu'ils contiennent d'être fécondés, voire à leur capacité à permettre un développement embryonnaire à terme et témoignent ainsi d'une maturation complète (Hanezn et al., 2000).

Ainsi une relation positive a-t-elle été établie entre les concentrations élevées des hormones gonadotropes FSH et LH, d' α 1-trypsine, d'insuline, de prostaglandines et la probabilité d'une gestation. A l'inverse, les ovocytes de moindre qualité renferment moins de fibrinogène et de glycosaminoglycans que les autres.

2-2-1- 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 μm , et que l'ovocyte acquiert la compétence méiotique, c'est-à-dire la capacité à reprendre la méiose 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, 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).

Régulation de la folliculogénèse basale

Chez les mammifères, les facteurs déclenchant l'entrée en croissance des follicules primordiaux restent mal connus. Chez la brebis, l'hypophysectomie n'empêche pas les follicules de croître jusqu'à atteindre une taille de 2 mm (Dufour *et al.*, 1979). Chez la vache, l'inhibition de la libération de l'hormone FSH (Folliculo Stimulating Hormone) par l'administration à long terme d'agonistes de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), n'empêche pas l'identification de follicules de diamètre compris entre 6 et 7 mm (Webb *et al.*, 1994). Ces deux observations confirment l'absence de rôle essentiel des hormones gonadotropes pendant les premières étapes du développement folliculaire. A ce stade, elles agiraient probablement davantage sur la régulation des capacités de synthèse et de maturation des cellules de la granuleuse que sur la croissance folliculaire proprement dite (Driancourt *et al.*, 1991a). Cette phase de développement folliculaire serait en fait essentiellement assurée par des facteurs de croissance produits localement par les follicules (Bendell et Dorrington 1990) et agissant de manière paracrine. Parmi ceux-ci, l'activine serait un candidat potentiel.

Formée de l'association de deux sous-unités beta non glycosylées de l'inhibine, elle est synthétisée par les cellules de la granuleuse dont elle assure la différenciation de manière

autocrine. Elle serait responsable de l'acquisition par ces cellules de récepteurs à la FSH (Xiao et *al.*, 1992), ce qui en fait un élément régulateur essentiel du passage des follicules d'un stade gonadotrope-indépendant au stade gonadotrope-dépendant d'autant qu'à la différence de l'IGF-1, elle peut exercer cet effet en l'absence de FSH (Adashi et *al.*, 1988). En présence de FSH, elle est capable de promouvoir la synthèse d'œstradiol, l'acquisition de récepteurs à la LH par le follicule et la production d'inhibine et de follistatine (Hutchinson et *al.*, 1987, Findlay 1993). Par ailleurs, elle empêcherait la lutéinisation précoce du follicule ce qui permettrait à ce dernier de poursuivre sa croissance (Findlay 1993).

2-2-2- La folliculogenèse terminale (Phase gonadotrope-dépendante)

Cette phase, également qualifiée de folliculogenèse tonique par opposition à la précédente appelée folliculogenèse basale (Driancourt *et al.*, 1991a), commence chez la vache (Moser et *al.*, 1989) lorsque les follicules ont atteint une taille limite caractéristique de l'espèce (4mm chez la vache). L'acquisition de cette taille correspond à diverses modifications histologiques et hormonales du follicule : il acquiert une thèque vascularisée qui autorise davantage d'échanges avec l'environnement ovarien du follicule ; sa capacité stéroïdogène augmente et se traduit par une augmentation de la synthèse d'œstradiol ; la vitesse de multiplication des cellules de la granulosa s'accroît puis se réduit lorsque le follicule atteint le stade préovulatoire.

Ces divers mécanismes résultent des interactions synergiques et/ou antagonistes entre d'une part les hormones gonadotropes d'origine hypophysaire FSH puis LH et, d'autre part, des substances polypeptidiques, les unes exerçant une action stimulatrice (IGFs, œstradiol, activine, TGF-beta) et les autres une action inhibitrice (follistatine, inhibine, interleukine-6, TNF-alpha) (Monniaux et Monget 1997). L'effet de ces substances est à la fois indirecte - elles exercent une rétroaction négative au niveau hypophysaire - et directe, de type paracrine, au niveau ovarien (Law et *al.*, 1992, Larson *et al.*, 1991). Le rôle des diverses hormones impliquées est cependant plus complexe. Il s'exerce en effet d'une part sur les mécanismes impliqués dans le nombre de vagues de croissance folliculaire au cours du cycle et d'autre part sur les divers aspects d'une vague de croissance folliculaire à savoir le recrutement, la sélection et la dominance.

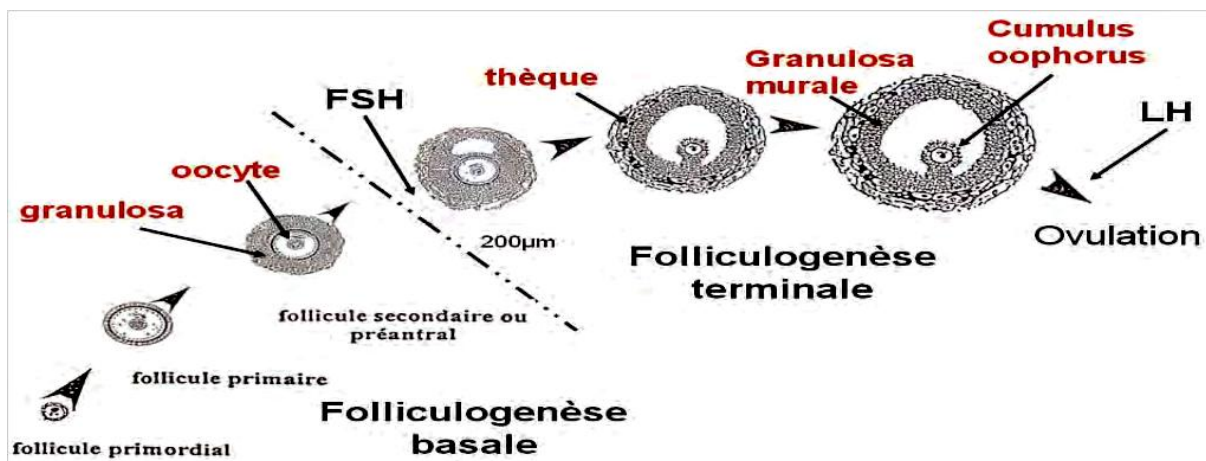


Figure 2 : Phases de la folliculogénèse

2-2-2-1- 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 (phase lutéale du cycle ou gestation). Selon les espèces, une seule (femme, rongeurs, truie) ou plusieurs (brebis, vache, jument) vagues de développement folliculaire terminal sont observables au cours du cycle sexuel (Driancourt *et al* 2001).

Le déterminisme du nombre de vagues par cycle est à ce jour encore peu connu. Des influences génétiques, nutritionnelles ou environnementales propres au follicule sont impliquées dans ce phénomène (Fortune *et al.*, 1991).

Dans toutes les espèces, la vague de 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. La jument présente la particularité de pouvoir ovuler également pendant la phase lutéale du cycle.

La maturation qui suit la croissance folliculaire, et qui ne concerne que quelques centaines de follicules pour toute la période de la vie génitale, est communément décrite par les concepts de recrutement, sélection et dominance. Elle est sous l'influence des gonadotrophines puis de l'émergence d'un ou de plusieurs follicules ovulatoires.

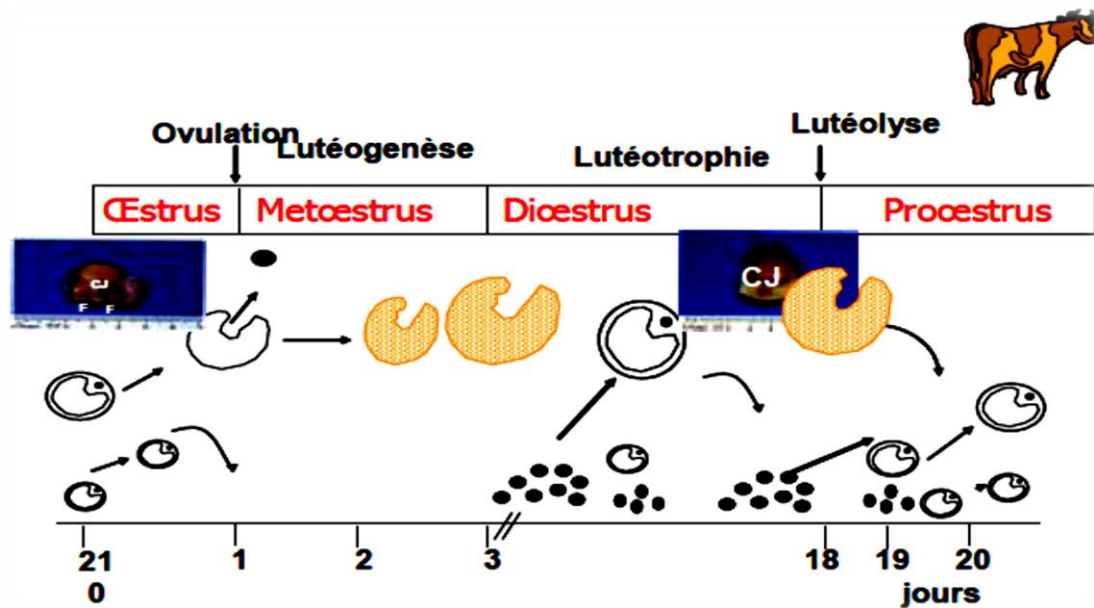


Figure 3: Vagues de croissance folliculaires au cours du cycle œstral de la vache (Gayrard,2007)

2-2-2-2- Atrésie et ovulation

-L'atrésie folliculaire

Est un phénomène important pendant la période pré pubertaire et au cours de la première période de la vie sexuelle.

Tout débute par une perte de l'activité aromatase des cellules de la granulosa (et donc de la production d'œstradiol) liée à la perte de la capacité d'expression des récepteurs à LH des cellules de la granulosa et à la diminution de celle des récepteurs à FSH, suivie de l'apparition de grains de pycnose au sein de ces mêmes cellules (Komar CM et *al.*, 2001).

On parle de follicules dominants œstrogène-inactifs avec un ratio œstrogène sur androsténédione inférieur à 1 (Gotoh et *al.*,1995 ; Nagai Tet *al.*, 2001). Dès lors, l'index mitotique au sein de la granulosa chute et on observe un découplage des récepteurs avec les mécanismes intracellulaires (diminution des fonctions perméables). Les signes de pycnose augmentent (atteinte des cellules du cumulus) et les récepteurs hormonaux disparaissent, suivis d'un arrêt de la stéroïdogénèse thécale.

Finalement, l'atrésie atteint l'ovocyte et on assiste au comblement de l'antrum (Driancourt MA et *al.*, 1999).Une des hypothèses formulées sur l'origine de l'atrésie serait basée sur le poids métabolique du follicule antral sur les couches avasculaires de cellules de la

granulosa , hypothèse controversée par la possibilité d'élargissement de la surface d'échange de la membrane basal et par le fait que la croissance folliculaire chez certaines espèces animales se prolonge au-delà du pic d'atrésie d'autres espèces (Fortune JE et *al.*, 1994) .

Histologiquement, les follicules atrétiques se distinguent selon des critères vasculaires, de transparence et par la présence de particules libres, critères observés lors de l'étude microscopique individuelle de follicules antraux de 2 à 20 mm (Fouladi Nashta AA et *al.*, 1999) .

Ces critères macroscopiques sont associés à des critères plus strictement histologiques tels que la présence de cellules ou corps atrétiques dans la granulosa ou dans l'antrum, l'absence de mitose au sein de la granulosa, son organisation et ses épaisseurs et la discontinuité de la lame basale du follicule. Ces critères macroscopiques et histologiques de l'atrésie sont corrélés à 95.5% et 93.3 %,respectivement, à l'atrésie ou non des follicules antraux. les critères de l'atrésie sont hautement corrélés à la fonctionnalité (chute des taux d'oestradiol, de testostérone et augmentation des taux de progestérone, de follistatine et l'inhibine) (Guilbault LA et *al.* , 1993) et à la micromorphologie des follicules (Kruip TAM et *al.*, 1982) .

-L'ovulation

Est la conséquence de la décharge préovulatoire de gonadotrophine (due à la chute du taux de progestérone et à l'augmentation de celui d'oestradiol : rétrocontrôle positif), virage hormonal entre la phase folliculaire et lutéale à l'origine de la maturation ovocytaire. Ce pic est difficile à prévoir vue la variabilité de la durée des cycles œstraux chez les ruminants. Il provoque la chute des productions d'oestradiol (8-10 h avant ovulation) par la diminution des transcriptions des aromatasés (Komar CM et *al.*, 2001).

La décharge pré-ovulatoire entraîne des modifications des propriétés histologiques, cytologiques et biochimiques de la granulosa murale. Le flux sanguin périfolliculaire augmente ainsi que les activités plasmine et collagénase du follicule contribuant à la préparation à la formation du corps jaune. on a montré en effet que l'eCG associée à l'hCG (stimulant le pic gonadotrope) provoque la diminution des taux cellulaires de VEGF (vascular endothelial growth factor , inducteur de l'angiogénèse) au niveau de la granulosa et du fluide folliculaire de la truie , puis la rupture du follicule (Barboni B et *al.* ; 2000) . Des hydrolases sécrétées par les cellules épithéliales dégénérées de cette zone fragilisent l'apex du follicule et la contraction du follicule achève la maturation de ce dernier.

Les follicules présents sur l'ovaire au moment de l'ovulation sont caractérisés par une hétérogénéité morphologique et biochimique : concentrations folliculaires en stéroïdes, nombre de cellules de la granulosa, nombre de récepteurs à la LH, et cela sur des follicules de tailles similaires. Pourtant certaines relations ont été établies entre concentrations du fluide folliculaire en stéroïde et taille folliculaire, proportionnelles avec les taux de prolactine (inhibant la production de progestérone par les cellules de la thèque et d'œstradiol, inversement proportionnelles avec ceux de testostérone) (Henderson KM et *al.*, 1982).

Le follicule dominant peut, quant à lui, être distingué par la concentration folliculaire d'œstradiol comparé à celles de progestérone. En effet, le follicule dominant montre un taux d'œstradiol supérieur à celui de progestérone tandis que les follicules subordonnés en voie de régression montrent un schéma stéroïdien inverse (Ali et *al.*, 2001). Le ratio entre œstradiol folliculaire et progestérone folliculaire est corrélé à la distinction follicule en croissance et follicule atrophique tout comme la concentration plasmatique en FSH : ils augmentent pendant la sélection et chute avant une nouvelle vague de croissance (Sunderland SJ et *al.*, 1994).

Des expériences de cautérisation du follicule dominant ont montré que ces follicules subordonnés peuvent, jusqu'à un certain point de non-retour dans la régression, avoir une persistance ovarienne accrue. La vague folliculaire suivante sera alors plus précoce, notamment en fin de cycle (Ko JCH et *al.*, 1991).

2-3- Régulation endocrinienne du cycle ovarien

2-3-1- Contrôle de la sécrétion de la GnRH

Chez les mammifères, l'initiateur et le régulateur fondamental de la fonction reproductrice est la GnRH (gonadotrophin releasing hormone ou gonadolibérine), qui est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus. La GnRH se lie aux récepteurs spécifiques situés sur les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse ce qui provoque la synthèse et la libération des gonadotropines, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH).

La FSH, à son tour agit spécifiquement sur les petits follicules ovariens pour stimuler leur croissance, tandis que la LH agit sur le follicule dominant mûr pour provoquer la maturation finale et l'ovulation qui en résulte (Drion et *al.*, 1996).

La GnRH est sécrétée par l'hypothalamus sous forme de décharges ou de manière épisodique, chaque décharge de GnRH provoquant la décharge de LH par l'antéhypophyse. La caractéristique fondamentale de la sécrétion des hormones hypothalamo-hypophysaires (GnRH, FSH, LH) est la pulsativité; en d'autres termes, leur sécrétion n'est pas continue mais passe par un maximum très bref, pulsation ou « pulse », à la suite duquel la concentration plasmatique décroît progressivement jusqu'à une valeur minimale où elle stagne jusqu'à la prochaine élévation brève. L'amplitude des pulsations est constante alors que leur fréquence varie, son augmentation provoquant alors un accroissement de la concentration de l'hormone dans le sang (Marie, 1996).

La sécrétion de GnRH est régulée par des facteurs internes et externes :

Facteurs internes: Les principaux facteurs internes qui régulent la sécrétion de GnRH sont les hormones stéroïdes ovariennes, la progestérone et l'œstradiol. La progestérone agit sur les neurones de la GnRH pour diminuer la sécrétion de GnRH en abaissant la fréquence des décharges de GnRH, tandis que les effets de l'œstradiol sur la femelle dépendent de la présence ou de l'absence de concentrations de progestérone durant la phase lutéinique. Lors de la phase lutéinique où les concentrations de progestérone sont élevées, l'œstradiol agit en synergie avec la progestérone pour diminuer la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, c'est-à-dire qu'il y a une rétroaction négative sur la GnRH (Archbald *et al.*, 1993). Lors de la phase folliculaire, en l'absence de progestérone et en présence de fortes concentrations de GnRH, l'œstradiol sécrété par le follicule pré ovulatoire a une rétroaction positive sur la GnRH, ce qui provoque la prolongation d'une sécrétion élevée responsable des pics pré-ovulatoires de LH et de FSH (Drion *et al.*, 1996).

Facteurs externes : les principaux facteurs externes qui affectent la sécrétion de GnRH sont : le statut nutritionnel de la vache (Armstrong *et al.*, 2002) et le stimulus d'allaitement chez la vache allaitante. Le mécanisme selon lequel l'alimentation affecte la sécrétion de GnRH n'est pas éclairci mais le programme d'alimentation et l'état corporel réel de l'animal sont tous deux importants.

2-3-2- Contrôle de la sécrétion de LH et de FSH

L'action de la GnRH sur l'antéhypophyse peut également être influencée par des hormones spécifiques produites par le follicule. La plus intéressante de toutes est l'inhibine.

Cette hormone supprime sélectivement la libération de FSH par l'antéhypophyse sans affecter la sécrétion de LH (Mermillod et Marchal, 1999b).

L'activine stimule aussi la synthèse de FSH et l'équilibre entre ces deux facteurs peut déterminer le niveau de sécrétion de FSH.

La libération différentielle de LH et de FSH par la même cellule gonadotrope requiert des mécanismes de contrôle intracellulaires différents.

Les gonadotropines synthétisées sont stockées dans des granules sécrétoires à l'intérieur du cytoplasme, et sont secrétées par action différentielle par exocytose (Mermillod et Marchal, 1999.) Il apparaît que le stockage de LH se prolonge durant le cycle œstral, mais le stockage de FSH est de courte durée.

Durant le cycle oestral de la brebis, jusqu'à 50% de FSH est libérée chaque jour, tandis que seulement 1 à 5% de LH est libérée. Par contre jusqu'à 70% de la LH totale est libérée durant la montée préovulatoire. Il est à présent évident que la LH est étroitement régulée par la GnRH (Gazal et al., 1998), mais aussi par un contrôle local via les interactions de l'inhibine et de l'activine (Mermillod et Marchal, 1999b).

Chez la vache, les facteurs qui diminuent la fréquence des décharges de LH et empêchent par conséquent l'ovulation sont : le déficit énergétique en post partum ou pendant les périodes de sécheresse (Beam et Butler, 1999), une mauvaise nutrition, mauvais état corporel, perte supérieure à 10% du poids corporel après le vêlage et une durée d'allaitement supérieure à 6 semaines après le vêlage.

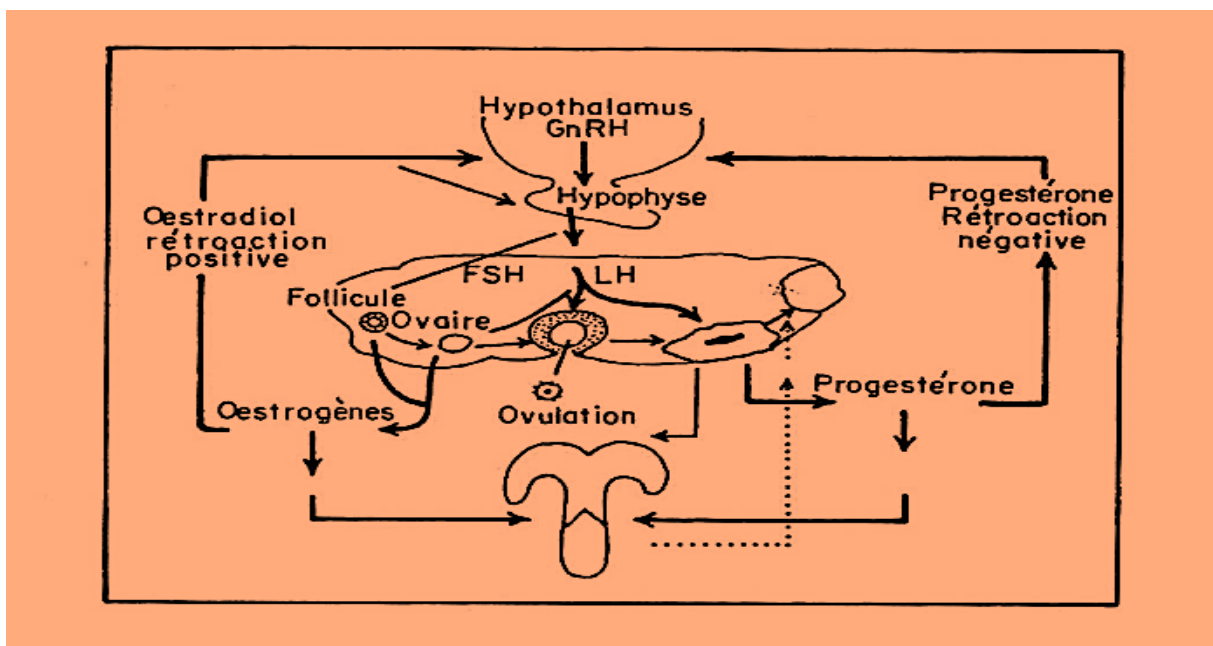


Figure 4 : Schéma récapitulatif du contrôle hormonal du cycle ovarien chez la vache (Peters et Ball, 1994)

Introduction

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

1- collecte des ovocytes

Les ovocytes peuvent être collectés soit sur des ovaires d'animaux abattus, soit sur des animaux vivants.

1-1- Collecte des ovocytes à partir des ovaires prélevés des animaux abattus

Les ovocytes peuvent être récoltés à moindre coût pour la production *in vitro* d'embryons (Agrawal *et al.*, 1995) à partir d'ovaires des vaches collectés après abattage (Natumanya *et al.*, 2008). Les ovocytes collectés représentent une population très hétérogène et souffrent entre autre, d'un manque d'informations concernant l'âge, phase du cycle et l'état gestatif des vaches collectés.

1-1-1- Manipulation et transport des ovaires prélevés à l'abattoir

Différents milieux et conditions de transport ont été explorés. Parmi les milieux de transport utilisés, on retrouve un milieu complet de culture cellulaire (TCM-199) et du PBS (phosphate-buffered saline), des solutions commerciales destinées au flush d'embryons (Alm et Torner, 1994 ; Del Campo *et al.*, 1995 ; Franz *et al.*, 2003 ; Preis *et al.*, 2004).

Le délai et la température à laquelle sont conservés les ovaires pendant leur transport a également fait l'objet d'études. Selon (Shabpareh *et al.*, 1993 ; Del Campo *et al.*, 1995) Le délai de transport des ovaires jusqu'au laboratoire n'affecte pas la compétence méiotique des ovocytes s'il reste inférieur à 15 heures. Une étude qui a évalué la morphologie du COCset l'apoptose des cellules de la granulosa suggère que les ovaires ne devraient pas être conservés plus de 3 heures entre 20 et 30°C afin d'éviter l'apoptose des cellules de la granulosa et pas

plus de 2 heures à 35-37°C pour éviter les modifications morphologiques du *cumulus oophorus* (Pedersen *et al.*, 2004). Une étude a montré que les taux de MIV étaient supérieurs pour des ovocytes collectés immédiatement à l'arrivée des ovaires au laboratoire que pour des ovocytes collectés après conservation des ovaires pendant 15 à 18 h à température ambiante ou à 4°C.

Certains auteurs suggèrent qu'une température de 20°C serait plus appropriée d'autant plus que la durée de transport est longue (jusqu'à 24h). 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.

Tableau 1 : Milieux et des conditions de transport des ovaires

Etude	Milieux de transport des Ovaires	Température et durée de transport
Belarouci et tafet, 2017	-une solution saline (NaCl 9%) seule	-Température ambiante -1 à 2h
Bohlooli et al., 2015	K Simplex Optimization Médium (KSOM)	- 4°C
	Pijako-Ziomek Bavister (CZB)	- 2 à 3h
	Charles Rosenkrans 1 (CR1)	
Hussain et al., 2013	- Solution saline normale -Pénicilline (0.06g/100ml)	- 26 à 37°C - 2 à 3h
Adel et al., 2007	- Solution saline normale -Pénicilline (0.06g/100ml)	-30 à 35°C - 2h

1-1-2- Techniques de récolte des ovocytes

Il existe plusieurs techniques de récolte des ovocytes :

1-1-2-1- Aspiration des ovocytes

Dans cette technique, les follicules pré-antraux non pré-ovulatoire visibles sur l'ovaire sont aspirés (qui est utilisée chez plusieurs espèces notamment chez la vache) à l'aide d'une aiguille 18G (Gauge) ou 12/10ème liée à un système d'aspiration (une seringue de 5 ou 10 ml) ou d'une pompe à vide (Satrapa *et al.*, 2010). La ponction se fait sur les follicules de diamètre de 2 à 8 mm (Kumar *et al.*, 1997) (les follicules de diamètre supérieure sont exclus parce qu'ils sont en début d'atresie ou de maturation). 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 5 : Ponction Des follicules par la technique d'aspiration (Satrapa *et al.*, 2010)

1-1-2-2- Ponction des follicules

les follicules sont sélectionnés selon leurs diamètres mesurés en 03 catégories: les petits (dont le diamètre est inférieur à 3mm), les moyens (entre 3mm et 8mm de diamètre) et les grands (dont le diamètre est supérieur à 8mm)(Kouamo *et al.*, 2014). L'ovaire est tenu par une pince, sont submergés dans une solution physiologique (PBS) contenue dans une boîte de pétri, puis les follicules visibles sont ponctionnés par une aiguille de 18-G et le fluide folliculaire est récupéré (Wang *et al.*, 2007).

1-1-2-3-Découpe de l'ovaire en tranches (slicing ovary)

Cette technique, les ovaires sont placés dans une boîte de pétri contenant du *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Des sections multiples sont faites sur la surface ovarienne (La dissection des follicules antraux peut être pratiquée sur des follicules intacts ou partiels ainsi que

d'exclure les follicules atrétiques) avec une lame de bistouri (Wang *et al.*, 2007). Cette technique permet de récupérer les ovocytes présents dans tous les follicules quelle que soit leur localisation au niveau du cortex ovarien (Hochi *et al.*, 1993 , Ward *et al.*, 2001; Annemarie *et al.*, 2003) , augmentant ainsi le rendement en ovocytes .Le taux de récolte peut augmenter jusqu'à 100% après dissection de l'ovaire L'inconvénient de cette méthode est la difficulté dans la recherche des ovocytes à cause des débris tissulaires (Wani *et al.*, 1999).

1-1-2-4- Digestion enzymatique

Cette technique est basée sur la digestion trypsique de tissu ovarien dans 1 heure. Les ovocytes obtenus par cette technique sont de bonne qualité avec un rendement maximal (200 COCs par ovaire) (Fouladi Nasha AA *et al.*, 1994). Ainsi que la collagénase, issue de *Clostridium histolyticum*, à l'état physiologique, 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. le cortex ovarien doit être découpé en plusieurs fragments d'environ 0,1 mm² qui seront par la suite mis en incubation durant 20 minutes dans une solution contenant 150 UI 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 COCs et leur qualité par la suite.

1-2- Collecte des ovocytes bovins *in vivo*(OPU)

Cette technique consiste à la ponction des ovocytes à partir des vaches vivantes par voie transvaginale à l'aide d'un pistolet muni d'une sonde à ultrasons et d'une aiguille rétractable reliée à un système d'aspiration. L'avantage de cette méthode est l'utilisation des animaux identifiés en plus la capacité de répéter deux fois par semaine les collectes sur la même vache pendant plusieurs mois sans affecter apparemment la fertilité ultérieure des animaux. Son inconvénient est le rendement en ovocyte est faible.

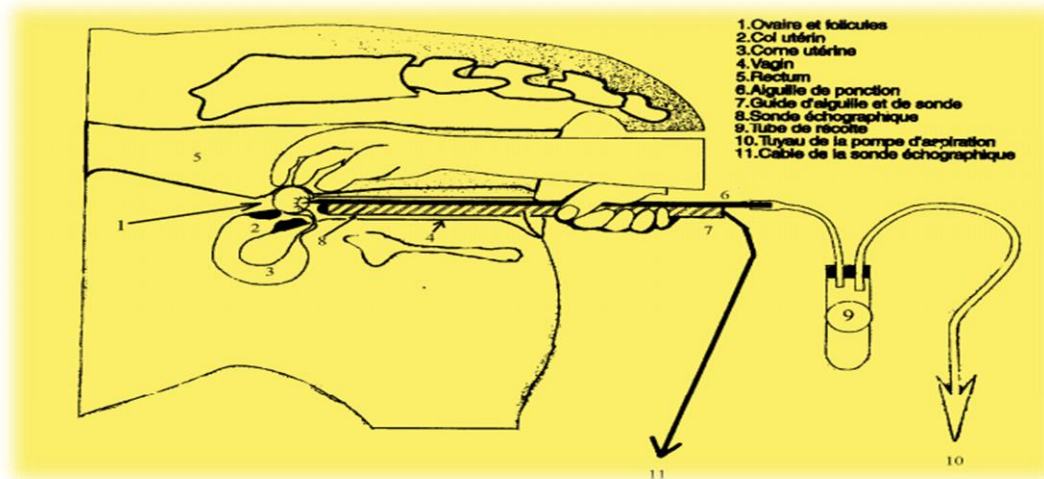


Figure 6 : Technique de ponction écho-guidé chez le bovin (Hanzen., 2016)

2-Milieu de collecte des ovocytes

C'est un milieu tamponné au phosphate (PBS) pouvant ou non contenir du sérum fœtal ou des antibiotiques. L'addition d'héparine (2 à 5 UI/ml) contribue à limiter la coagulation dans les tubulures et le tube de récolte (Kruip *et al.*, 1994).

3- Evaluation de la qualité des ovocytes

La qualité fonctionnelle des ovocytes est définie selon cinq niveaux (Sirard *et al.*, 2006).

L'aptitude à :

- Reprendre la méiose
- Diviser après la fécondation
- Développe jusqu'au stade blastocyste
- Induire une gestation jusqu'à son terme
- Développer l'embryon à terme et en bonne santé

L'évaluation de la qualité fonctionnelle d'ovocyte est toutefois difficile à déterminer au moment de collecte. Des méthodes plus simples comme le diamètre folliculaire et la morphologie des COCs ont été utilisées comme critères de sélection des ovocytes de bonne qualité.

3-1- Selon le diamètre des follicules

Le diamètre folliculaire est utilisé comme un paramètre de sélection des ovocytes. Des études ont établi une relation entre la taille du follicule et la compétence au développement de l'ovocyte. La ponction des follicules antraux non pré-ovulatoire est utilisée chez plusieurs espèces notamment chez la vache à partir des follicules de diamètre compris entre 2 à 8 mm (Kumar *et al.*, 1997) ; 3 et 8 mm (Abraham *et al.*, 2012). En effet, les follicules en dessous de 2mm de diamètre donnent un faible pourcentage d'ovocytes aptes à acquérir la compétence méiotique. De même, la dégénérescence des ovocytes suite à l'atrésie des follicules est plus fréquente dans les follicules de diamètre inférieur à 3 mm et supérieure à 6 mm (Anguita *et al.*, 2007).

3-2- Selon les caractéristiques morphologiques du COCs

Après collecte, les ovocytes peuvent être découverts de cellules de la *corona radiata* et du *cumulus oophorus* mais ils sont généralement entourés d'une quantité plus ou moins abondante. Les couches cellulaires les plus internes présentent des projections qui traversent la zone pellucide pour établir un contact direct avec la membrane de l'ovocyte (Grondahl *et al.*, 1995). Ces jonctions communicantes permettant l'inter-échange des molécules et nutriments entre ces cellules (Norris *et al.*, 2008). Les COCs peuvent être caractérisés en fonction de leur degré d'expansion (Goudet *et al.*, 1997a ; Hinrichs et Williams, 1997) et celui-ci est directement relié au degré de maturation nucléaire de l'ovocyte (Zhang *et al.*, 1989 ; Gable et Woods, 2001). Les ovocytes immatures sont associés à des COCs compacts. Les COCs expansés sont associés à des follicules en cours d'atrésie.

- Méthode :

Les COCs sont recherchés sous une loupe binoculaire et jugés selon leur aspect morphologique puis classés selon la méthode de (De-Loos *et al.*, 1989) et (J-Kouamo *et al.*, 2014) en 4 catégories. En tenant compte de l'homogénéité du cytoplasme ovocytaire évalué sur la base de l'aspect des noyaux et la densité et l'uniforme des couches qui entourent la granulosa.

- Classe 1 (A) : Cumulus pluristratifié (plus de trois couches) compacté et un cytoplasme homogène.

- Classe 2 (B) : Cumulus compacté à une ou deux couches et un cytoplasme moins homogène.
- Classe 3 (C) : couche des cellules irrégulières avec un peu du cumulus oophorus moins compacté et un cytoplasme moins régulier avec des zones sombres.
- Classe 4 (D) : absence de cumulus oophorus ou expansé, cytoplasme irrégulier avec des zones sombres.

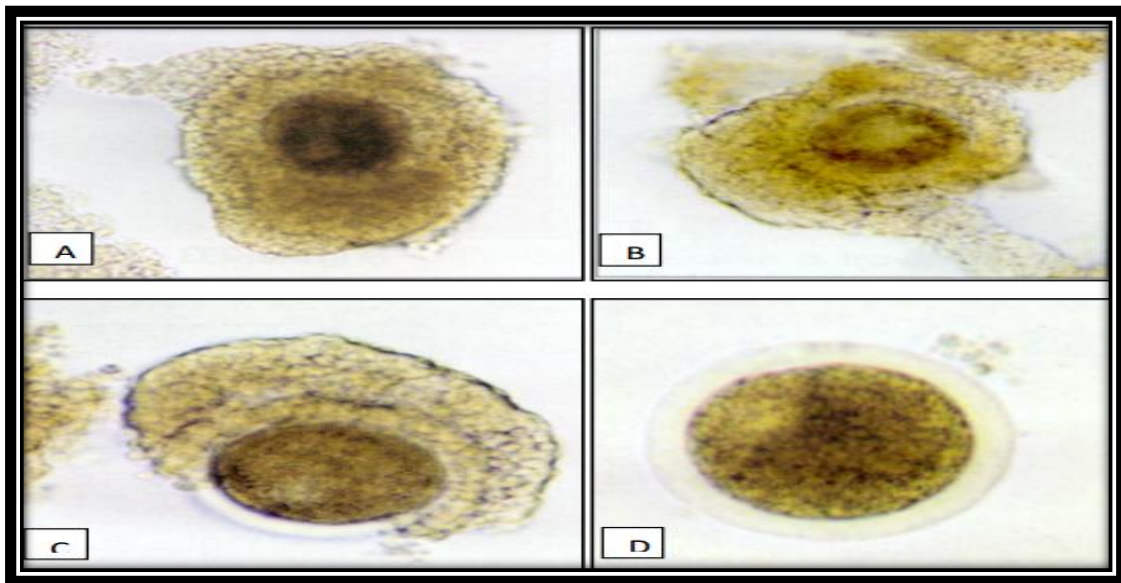


Figure 7 : Classification des ovocytes bovins après récolte selon Hanzen (2016) A: Ovocyte classe 01, B: Ovocyte classe 02, C: Ovocyte classe 03, D: Ovocyte classe 04

3-3-Selon l'aspect de la chromatine de la VG

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 (Luciano *et al.*, 2014).

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 (Loddeet *al.*, 2007).

- Stade GV0 : chromatine filamenteuse et diffuse dans toute la zone nucléaire (capacité très limitée de reprendre la méiose I complète après maturation in vitro(Loddeet et *al.*,2007).
- 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 (pu atteindre le stade Métaphase II avec pourcentage limité d'atteint le stade blastocyte, après la fécondation in vitro(Loddeet *al.*,2007).
- Stade GV2 : intermédiaires du remodelage de la chromatine, avec formation d'amas distincts de la chromatine condensée dans les ovocytes (pu atteindre le stade Métaphase II avec potentiel élevé de développement embryonnaire(Loddeet *al.*,2007).
- Stade GV3 : est le stade où le plus haut niveau de condensation est atteint avec la chromatine organisée en un seul bouquet (pu atteindre le stade Métaphase II avec potentiel élevé de développement embryonnaire(Loddeet *al.*,2007).

Les résultats montre pare Loddeet et al (2007) confirment quelamodification de la chromatinepeut être considéré comme un marqueur de la différenciation de l'ovocyte et de la compétence au développement.

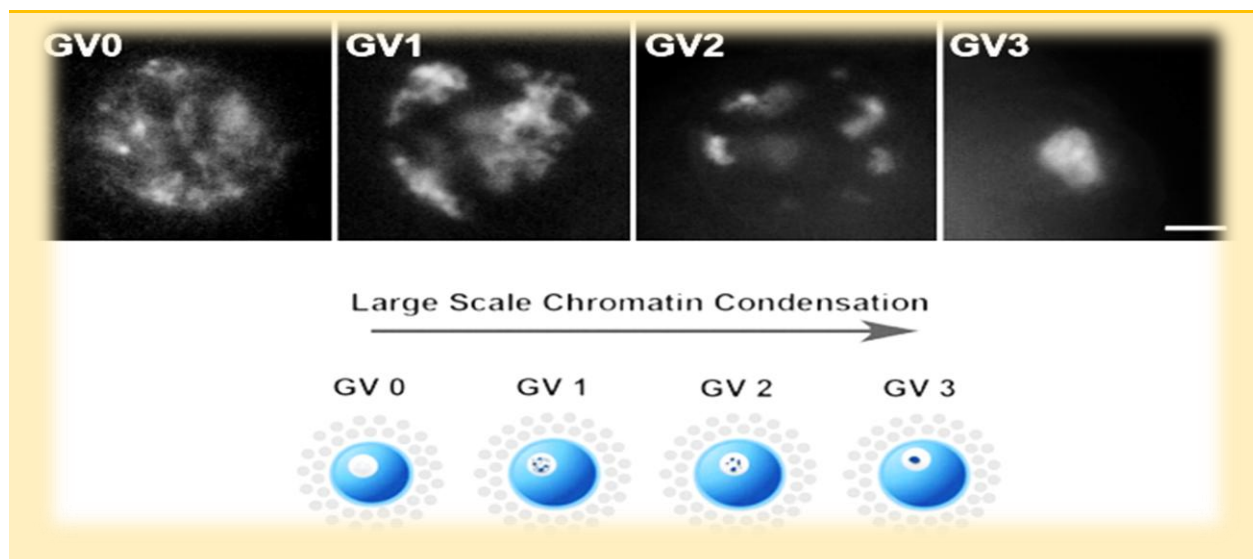


Figure 8 : Changements dynamiques de la configuration de la chromatine dans la vésicule germinale du stade GV0 au stade GV3 d'après Luciano et *al.*, 2012

4- Choix des ovocytes pour la maturation et la fécondation *in vitro*

Les ovocytes et le cumulus oophorus sont reliés par des jonctions communicantes permettant l'inter-échange des molécules et nutriments entre ces cellules (Norris *et al.*, 2008). L'efficacité de PIV est influencée significativement par la qualité des ovocytes. Les COCs utilisés pour la PIV sont les COCs de qualité 1 et 2, c'est-à-dire entourés d'un cumulus compact (composé de 3 à 4 couches de cellules couvrant la zone pellucide) et ayant un cytoplasme homogène (Wang *et al.*, 2007). De nombreuses études ont montré que la compétence au développement est proportionnelle à la qualité du complexe cumulus oophorus ovocyte avec une différence des taux de développement significatif entre les COCs des classes 1 et 2 acceptables d'une part et d'autre part les COCs de classes 3 et 4 (Cetica *et al.*, 1999).

5-Milieux de maturation

Le milieu de culture généralement utilisé pour la maturation des ovocytes est un milieu "classique" souvent additionné d'hormones gonadotropes (FSH et LH), de stéroïdes (œstradiol), de sérum (sérum de femelle en œstrus ou de veau fatal), de fluide folliculaire ou de cellules de granulosa (ovins et caprins).

a. Milieux de base

Il s'agit de milieux de synthèse créé afin de soutenir des cultures tissulaires ou cellulaires divers, et dont la pression osmotique, le PH, l'équilibre ionique sont adaptés au plus près des conditions biologique (Ham's, MEN, TMC199, SOFa). Ces milieux sont dits de base car ils assurent seulement la survie des cellules *in vitro*. 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).

b. Supplémentations

Ces milieux sont supplémentés avec d'autres composants pour calquer la composition de milieu étudié *in vivo*. Comme l'adjonction de protéines qui, dans les publications anciennes, étaient apportées surtout par du sérum de veau fœtal (Barnes FL et *al.*, 1996 ; Trounson A et *al.*, 1994) du liquide folliculaire provenant de follicules matures (Cha KY et *al.*, 1991) ou du sérum de cordon fœtal (Veeck LL et *al.*, 1983 ; Cha KY et *al.*, 1991). La supplémentation en sérum donne en effet de meilleurs résultats en termes de maturation, de chances de production d'embryon et de taux d'implantations par rapport à la simple adjonction d'albumine sérique (Mikkelsen AL et *al.*, 2001). Si les créateurs de la MIV n'ont pas utilisé d'autres additifs que le sérum (Veeck LL et *al.*, 1983 ; Cha KY et *al.*, 1991), dans la plupart des études ultérieures des gonadotrophines ont été ajoutées au milieu de maturation. En effet, une étude comparative déjà ancienne avait montré des taux de maturations et de fécondations nettement améliorés en présence d'hMG dans le milieu de culture (73,5 % et 64 % respectivement, contre 35,6 % et 36,4 % en l'absence d'hMG). Des résultats similaires, y compris sur le taux de clivages, ont été obtenus en présence d'hMG par d'autres (Zhang X et *al.*, 1993). Plus récemment, la FSH recombinante à forte concentration s'est avérée capable d'augmenter les taux de maturations et de fécondations d'ovocytes immatures cultivés *in vitro*, par rapport à ceux cultivés en absence de gonadotrophines. Cependant, seuls les ovocytes cultivés en présence à la fois de FSH et de LH recombinante ont donné lieu à des embryons évoluant jusqu'au stade de blastocyste (Anderiesz C et *al.*, 2000). Cette étude a montré également que les ovocytes cultivés en l'absence de gonadotrophines présentaient une teneur en protéines très diminuée. Actuellement, la plupart des auteurs supplémentent leur milieu avec de FSH et d'hCG.

Certains ont tenté d'élaborer des milieux définis, sans sérum, en ajoutant différents facteurs de croissance, tels que l'EGF (Yang SH et *al.*, 2005) ou l'IGF-I (Wynn P et *al.*, 1998), avec des résultats très encourageants. 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.

Il a été montré que le pourcentage d'ovocytes avec des cellules du cumulus expansées varierait considérablement entre les différents milieux utilisés (Ham's, MEN, TMC199, SOFa) 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 ; Walker et *al.*, 1986).

L'incidence des ovocytes avec l'expansion des cellules du cumulus ainsi que les taux de métaphase 1 et 2a été jugée plus élevée dans le TCM-199 avec des additifs en pratiquant les techniques d'aspiration et de la dissection et plus basse en milieu de Ham F-10 utilisant les mêmes additifs et les mêmes techniques (Hussain et *al.*, 2015). Le milieu cSOFMaa est un milieu de base efficace pour la culture 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). Un milieu de transport et de maturation complet HEPES (FBS, hormones et antibiotiques) n'exige pas l'équilibrage du CO₂ lors de transport COCs, les COCs immatures peuvent être transportés et maturés dans un flacon emballé dans des conditions stériles. C'est un support complet prêt à l'emploi, pratique pour les conditions OPU de terrain (maturation complète des ovocytes à 38,5 ° C après 24 heures d'incubation). Ce système appelé SMM (Shipping and Maturation Medium) (Barceló-Fimbres et *al.*, 2015).

Loneragan et *al.*, ont testé séparément l'effet de ces additifs dans l'espèce bovin, les meilleurs résultats sont obtenus avec le milieu additionné de sérum seul (M199+FCS). Le milieu de base (M199) à lui seul un taux de développement non négligeable. L'expansion des cellules du cumulus n'ayant pas lieu dans ce milieu, celle-ci ne semble pas strictement corrélée à la maturation ovocytaire ni il l'acquisition de la compétence au développement. Le mélange hormonal utilisé lors de la maturation diminue la compétence des ovocytes traités mais le sérum contrebalance cet effet (non représenté). Des doses croissantes de p-FSH (10-1000ng/ml) et de p-LH (50-5000ng/ml) ont été testées séparément sans résultats positifs sur la qualité de la maturation (Loneragan et *al.*, 1996).

Des facteurs de croissance pourraient être impliqués dans cet effet positif du sérum et du fluide folliculaire. Les facteurs de la famille de l'insuline (insuline, insulin-like growth factor I et 11 : IGF-I et IGF-11) pourraient jouer un rôle dans la régulation intra-ovarienne de la folliculogénèse et donc dans la maturation ovocytaire. Ils ont été testés *in vitro* à différentes concentrations sans succès (Carolan et *al.*, 1997). D'un autre côté, l'EGF (epidermal growth factor ou facteur de croissance épidermique) a montré un effet similaire à celui du sérum (Loneragan et *al.*, 1995), dès la concentration minimale testée (1ng/ml).

Des études similaires ont été menées parallèlement chez les ovins, la FSH (o-FSH, 100ng/ml) et l'EGF (100ng/ml) améliorent le taux de développement par rapport au milieu seul mais à un niveau moindre que le fluide folliculaire (BFF, 10 %).

Il s'avère donc que, nous disposons maintenant d'un milieu synthétique contenant une protéine murine (EGF) donnant des résultats de maturation comparables ceux obtenus avec des milieux complexes contenant du sérum. En plus d'avantages sanitaires évidents, ce milieu offrira la possibilité d'étudier plus finement les communications moléculaires entre les cellules somatiques du follicule en fin de croissance et l'ovocyte en reconstituant et en analysant des systèmes de co-culture complexes (CCO + cellules de granulosa et /ou de thèque) en milieu défini et d'en tirer parti pour améliorer encore la compétence des ovocytes après maturation.

Le liquide folliculaire a été montré pour être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation. Certaines études ont démontré que milieu de maturation complété avec le FF fournit un environnement approprié au développement de l'ovocyte.

D'après DuColomb *et al* (2013), le liquide folliculaire conduit à un retard de la maturation nucléaire et inhibe cette dernière chez la vache (Gallardo et coll., 2001) et chez les porcins (Driancourt *et al.*, 1997). D'après Choi *et al* (1991), 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. 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). 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 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 MIV 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.

6- Liquide folliculaire

Le liquide folliculaire est un fluide extracellulaire complexe, semi-visqueux, de couleur jaune qui s'accumule dans l'antrum des follicules ovariens au cours de leur croissance.

C'est un mélange entre plasma sanguin qui traverse la barrière folliculaire avec les sécrétions des cellules de la granulosa et de la thèque, constitue le microenvironnement dans lequel l'oocyte se développe (Fortune JE et *al.*, 1994).

Le but de cette étude est de présenter les connaissances actuelles sur la composition et les rôles de ce fluide biologique.

6-1- Caractéristiques physique

Le volume du liquide folliculaire est très différent d'une espèce à l'autre (quelques mm³ chez les rongeurs, 2 à 10 ml chez la femme, vache et la truie, 60 ml chez la jument). Le liquide folliculaire ressemble au plasma sanguin par sa viscosité, son osmolarité (280-320 milliosmoles/kg) et sa composition en électrolytes. La pression partielle en oxygène varie d'un facteur 1 à 9 dans l'espèce humaine avec une moyenne de 54 mm Hg .la pression partielle en CO₂ est moins variable (35 mm Hg en moyenne pour le liquide folliculaire humain). Elle permet de contrôler le pH (7.3-7.4) (Ménézo et *al.*, 2001).

6-2- Composition

Le liquide folliculaire baigne l'ovocyte jusqu'au moment de l'ovulation et il est donc nécessaire d'en connaître la composition pour aborder in vitro l'étude de la maturation ovocytaire mais également de la fécondation dans la mesure où, chez les bovins, le volume de liquide émis par le follicule au moment de l'ovulation est très important (y.MENEZO et *al.*, 1975).

- Protéines

Un degré considérable de similitude existe entre les protéines dans le liquide folliculaire et le sérum (Caravaglios et *al.*, 1957) mais il existe des différences dans la teneur totale en protéines et dans la concentration relative des fractions protéique. La plupart des évaluations reconnaissent que la concentration de protéine est inférieure dans le liquide folliculaire que dans le sérum. Les mesures ont été faites en utilisant *biuret et Lowry* teste et a montré que la

concentration dans le liquide humain était approximativement 50 % de cela dans le sérum (Manarang-Pangan et *al.*, 1971) ,75 % dans la vache (Stancioiu et Lunca, 1971). La concentration de protéine dans le liquide folliculaire humain été évaluée récemment comme semblable dans le sérum (Shalgi *et al.*, 1972).

L'albumine, l'alpha1-glycoprotéine, les IgG, la B1-globuline, la transferrine, l'haptoglobine, la céruloplasmine, le fibrinogène sont présents dans le liquide folliculaire de toutes les espèces à des concentrations représentant 40 à 60% de celles du sérum .la concentration relative des protéines par rapport à leurs homologues sériques dépend de leur poids moléculaire ;leur concentration décroît avec leur poids moléculaire .l'infiltration des protéines sériques de poids moléculaire élevé augmente avec la taille du follicule (Johnson,,2004).

- Acides aminés

Les aminogrammes de liquides folliculaires de plusieurs espèces ont été décrits(Guérin et *al.*, 1995) . Glutamine et glycine sont particulièrement abondantes dans le liquide folliculaire. Les concentrations en taurine sont toujours inférieures à celles du sérum .les concentrations en hypotaurine sont par contre 2 à 3 fois plus élevées que dans le sérum.L'hypotaurine doit être considérée comme l'un des antiradicaux libres efficace. Il est évident qu'à cette période deux types de composés doivent être nécessairement protégés : les lipides, pour permettre la fusion des membranes au moment de la fécondation et le matériel nucléaire pour protéger le patrimoine génétique. les gonadotrophines modifient le métabolisme des aminoacides du complexe cumulo-ovocytaire : elles peuvent augmenter le transport de la glycine, de la cystéine et de la glutamine, qui sont présentes dans le liquide folliculaire, afin d'élever le niveau de glutathion (GSH) dans l'ovocyte (Issel et *al.*, 1988).Ce glutathion essentiellement synthétisé après le pic de LH, servira à la décondensation du matériel nucléaire du spermatozoïde, au moment de la formation des pronucléus. In vitro, l'adjonction de cystéamine, présente dans le liquide folliculaire, induit une élévation du taux de GSH intracellulaire. L'addition d'acides aminés lors de la maturation in vitro permet de réduire la vitesse du turnover de certains transcrits(Waston AJ*et al.*, 2000).

- Carbohydrates

Le glucose représente 75% des carbohydrates du liquide folliculaire. Il est présent à concentration moindre (2.2mM) que dans le sérum, chez la vache. Cependant sa concentration

augmente pendant l'œstrus. Le fructose est trouvé en faibles quantités. Le taux de lactate est d'environ 9mM. L'ovocyte comporte des transporteurs communs au lactate et au pyruvate (MCT : mon-ocarboxylate transporteurs) .Les acides mono-carboxyliques interfèrent avec la régulation du pH interne. Sont présents également tous les précurseurs nécessaires à la synthèse stéroïdienne dont les intermédiaires en C2 nécessaires à la synthèse du cholestérol (Ménézo *et al.*, 2001).

- Lipides

La teneur en lipides du liquide folliculaire pré ovulatoire est, chez la femme, inférieure à celle du sérum. Cependant les différentes classes de lipides ne sont pas représentées de la même façon, probablement du fait de l'importance quantitative de la chaîne de synthèse du cholestérol. le ratio des acides gras estérifiant les différentes classes de lipides est très similaire à celui observé dans le sérum (Ménézo *et al.*, 2001).

- Hormones et vitamines

Dans l'espèce humaine, œstradiol (E2) et progestérone (P4) folliculaires sont globalement le reflet des concentrations sériques. Au moment de l'ovulation la concentration en E2 dans le liquide folliculaire est 250 fois plus élevée que dans le sang périphérique. Des hormones peptidiques sont présentes, notamment la prolactine,FSH et bien sur l'inhibine. NO est présent et sa teneur semble corrélée à la FSH (bovins). L'acide ascorbique est présent dans le liquide folliculaire à une concentration 16 fois plus importante que dans le sérum. cet agent fortement réducteur évite l'apparition de radicaux libre oxygénés, il faut noter que le liquide folliculaire induit le relargage d'hypotaurine par l'épithélium tubaire contribuant à la capture des radicaux libres(Guérin P *et al.*, 1995).

- Enzymes

Elles sont nombreuses dans le liquide folliculaire ; peptidases, protéases, activateur des plasminogène , phosphatases acide et alcaline , hyaluronidase , alanine et aspartate amino-transférases , kallikréine , nucléotidase, thromboplastine, collagénase , plasmine ATPase . leurs fonctions connues concernent plutôt le follicule que l'ovocyte (Ménézo*et al.*, 2001).

- Facteurs de croissance

Ils sont présents dans l'ovaire et dans le follicule. Le liquide folliculaire prélevés en même temps que les ovocytes destinés à la fécondation in vitro ont permis de mettre en évidence de nombreux facteurs de croissance et cytokines dans les follicules prêts à ovuler . GH, TGF α et β , PDGF-A ,PDGF-B et parfois EGF sont présents. IGF1 et 2 et leurs protéines de transport (IGF-BP) ont été également décrits. Parmi les cytokines, les interférons α et γ , le TNF α , les IL2,IL6, le LIF, le CSF sont présents dans le liquide folliculaire pré ovulatoire . La détection d'IL1 β est liée à la présence de macrophages dans le liquide folliculaire pré ovulatoire ; le protooncogène c-kit et son ligand SCF, éléments régulateurs de la survie et de la prolifération des cellules germinales (chez les rongeurs) sont présents dans le liquide folliculaire et l'ovocyte humain (Tanikawa M et *al.*,1998).

Les expérimentation sur la maturation in vitro , n'ont pas permis de définir clairement un rôle pour les cytokines et les facteurs de croissance . Un rôle dans l'adénylation des ARN messagers est possible (Ménézo et *al.*, 2001).

6-3- Rôle

Le liquide folliculaire participe aux étapes finales de la maturation de l'ovocyte.Il contrôle, avant l'ovulation, les dernières modifications transcriptionnelles et post tanscriptionnelles qui permettront à l'embryon d'effectuer ses synthèses protéiques au cours des premières divisions de segmentation .Le liquide folliculaire pourrait également protéger l'ensemble ovocyte-cumulus contre les enzymes protéolytiques qui attaque la couche de collagène de la paroi du follicule au moment de l'ovulation. Son rôle réel est finalement peu connu. Il est présent sur le site de la fécondation. Il a en outre un rôle dans le transport de l'ovocyte de l'ovaire à l'oviducte lors de l'ovulation. Ce rôle est évidemment plus important chez les espèces où le liquide folliculaire est abondant (Ménézo et *al.*, 2001).

7- Conditions de la mise en incubation et MIV

Choi et al, 1998 ont montré qu'il existe des différences claires concernant les développements embryonnaires, en particulier entre les ovocytes maturés in vivo et ceux qui ont subi la maturation in vitro. De nombreuses études ont montré que dans des conditions in vitro, la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique se produisent à des moments

différents (Bever et *al.*, 1997), ce qui pourrait être la cause de taux de blastocyste observés pour la production *in vitro* d'embryons de bovins et la qualité inférieure des embryons par rapport aux embryons produits *in vivo*.

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 utilisée 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).

La culture 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). Les ovocytes des ruminants et des porcs sont incubés à 38,5°C ou 39°C sous 5% de CO₂ dans l'air (Watson et *al.*, 2000). La MIV peut également être réalisée à des températures plus basses sans affecter le développement embryonnaire (Shi et *al.*, 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 de 1ml (plaque multi-puits) (Bruyere, 2002) à 10µl sous huile minérale (L'huile minérale (paraffine) évite l'évaporation et les modifications de la pression osmotique consécutive).

La densité des ovocytes aurait une influence sur le taux de reprise de méiose *in vitro*. En effet, le taux de métaphase II est significativement plus important en cultivant 10 ovocytes que 5 ovocytes dans 100 µl de milieu (Otoi et *al.*, 2002).

Tableau 2 : Taux de maturation obtenu dans différents milieux de maturation

Etude	Milieu de base	Hormones	Supplémentation en protéines/énergie	Antibiotiques	Conditions et durée d'incubation	Taux de MIV
Belarouci et al 2017	TCM199		10% FF		-5% Co2 - 100% humidité - 38.5 C° - - Pendant 24h	54,34%
			50% FF			52,54%
						63,79%
	SMM					56,16%
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%
Satitmanwiwat et al., 2014	TCM199	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	TCM199	-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% (1er GP)
			-ECG (10ng/ml) - B- mercaptoéthanol (25uM)			81.5% (Expansion) 67.5% (1er GP)
			EGF (100ng/ml) - B- mercaptoéthanol (500uM)			94.4% (Expansion) 83.5% (1er GP)
			- Pyruvate de sodium (0.0009g/ml) - L- glutamine (0.0001g/ml) - FF (1ml/10ml) - HIOCS (1ml/10ml)			79.6% (Expansion) 62.5% (1er 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)
Belaid et bentaleb 2018	TCM199				- 38.5 C° -Pendant 24h	40%
			-10% FF			56.52%
			-50% FF			20.83%
Bruyere., 2002	TCM199	- FSH (200ug) - LH (40ug)	- SVF (2ml) - EGF (100ng) - Faible [FF] - Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes	- Antibiotique -Antifongique (200ul)	- 5% Co2 - Air saturé en eau - 38.5 C° - Pendant 24h	83.87%

8- Evaluation et classification des ovocytes après MIV

L'évaluation de la qualité de la MIV comporte deux volets : la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique.

Une première évaluation de la qualité de la MIV se fait immédiatement après par simple observation des COCs : ils doivent présenter une expansion du cumulus, un globule polaire et le noyau ovocytaire doit être en métaphase II.

8-1- Selon le degré d'expansion du cumulus

Fagbohun et Downs (1990) ont classé le degré d'expansion en fonction de l'échelle 0 -4. 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.

8-2- Selon la maturation nucléaire

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, expulsion du premier globule polaire et blocage à la métaphase-II (Mazerbourg et al., 2003).

8-3- 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.

9- Fécondation *in vitro*

La fécondation des ovocytes matures s'effectue avec des spermatozoïdes qui ont subi au préalable la capacitation. Il s'agit de l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte permettant l'incorporation du contenu nucléaire mâle dans le gamète femelle. La fécondation *in vitro* est réalisée en puits (20 à 30 ovocytes) ou en microgouttes (20UI) en présence de 10^6 spermatozoïdes par ml. L'incubation dure 18 à 24 heures dans une atmosphère modifiée contenant 5% de CO₂ à 38.8° C (Abraham *et al.*, 2012).

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.

La maturation ovocytaire c'est la première étape de la fécondation *in vitro*, actuellement en pleine essor. Sa réussite 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.

I. Objectifs :

Le but de notre travail est de choisir un milieu favorable pour la maturation des ovocytes *in vitro* par la comparaison de leurs comportements dans trois milieux différents.

II. Matériel

- Les ovaires: au nombre de 90, ils ont été récoltés au niveau des abattoirs d'El Harrach et Boufarik. Il est à signaler que 10 ovaires ont été éliminés de l'expérimentation pour les motifs liés à: l'atrophie, l'absence de follicules sur la surface et à la fibrose et les ovaires kystiques et que 22 parmi les 90 sont utilisée pour la maturation *in vitro*.
- Gants, ciseaux (Lame de bistouri), récipient en verre, Compresses stériles, Alcool 70°et Na Cl 0.9% sont utilisé pour la récolte, le transport des ovaires et leur préparations pour la ponction.
- Seringues: 2.5ml, 5ml, 10ml et 50ml, Aiguilles 18G, Boites de Pétri quadrillées, Paillettes, Microscope inversé et PBS (Phosphate Buffered Saline) sont utilisés pour la ponction des ovocytes et leur classification.
- Boites multi-puits, Milieu de base TCM199, FF et l'incubateur sont utilisés pour la maturation ovocytaire.
- Centrifugeuse et Tubes secs sont utilisés pour la préparation de FF.

III. Méthodes

III.1 Collecte et acheminement des ovaires

Après l'abattage de chaque vache, nous avons récupéré les ovaires par section du ligament large. Ensuite, les ovaires sont placés dans un récipient en verre contenant un soluté isotonique (NaCl, 0.9%). Après la collecte, les ovaires sont acheminés au laboratoire à une température de 20-25°C, durant les 2 heures qui suivaient l'abattage.



Figure 9 : Prélèvements des ovaires par section de ligament large à l'aide de lame de bistouri ou ciseau



Figure 10 : Verrière contenant les ovaires



Figure 11 : Sac isotherme



Figure 12 : Produit utilisé pour la désinfection

Un rinçage a été appliqué sur les ovaires un par un 2 à 3 fois avec une solution saline suivi par une désinfection à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool 70° afin d'éliminer toute trace de sang et les impuretés sur les ovaires.

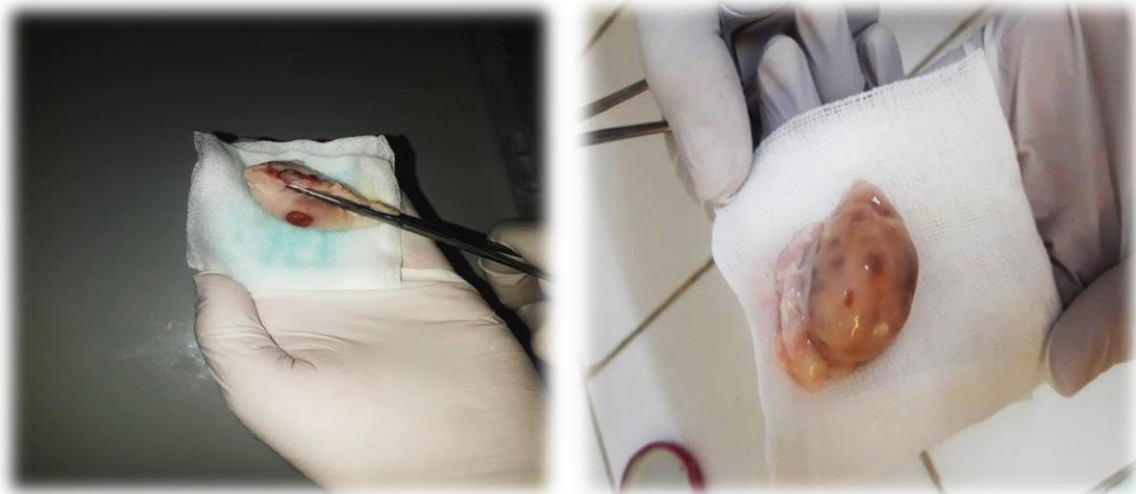


Figure 13 : Préparation des ovaires à la ponction

III.2. Ponction des ovaires

Les follicules qui se trouvent sur la surface des ovaires collectés sont ponctionnés afin de récolter les ovocytes et le liquide folliculaire.

Les follicules ponctionnés sont classés en 02 catégories:

- ❖ Les follicules de 2 à 8 mm de diamètre en position superficielle, visible ont été comptés puis aspirés à l'aide d'un assemblage aiguille 18 G-seringue 10 ou 05 mL. Cette étape a servi au prélèvement des COCs (Kumar *et al.*, 1997).



Figure 14 : Ponction des follicules en surface

Nous avons rassemblés le liquide aspiré dans des boites de Pétri quadrillées auparavant remplies à 1/4 avec du PBS à fin d'éviter le stress thermique et osmotique.

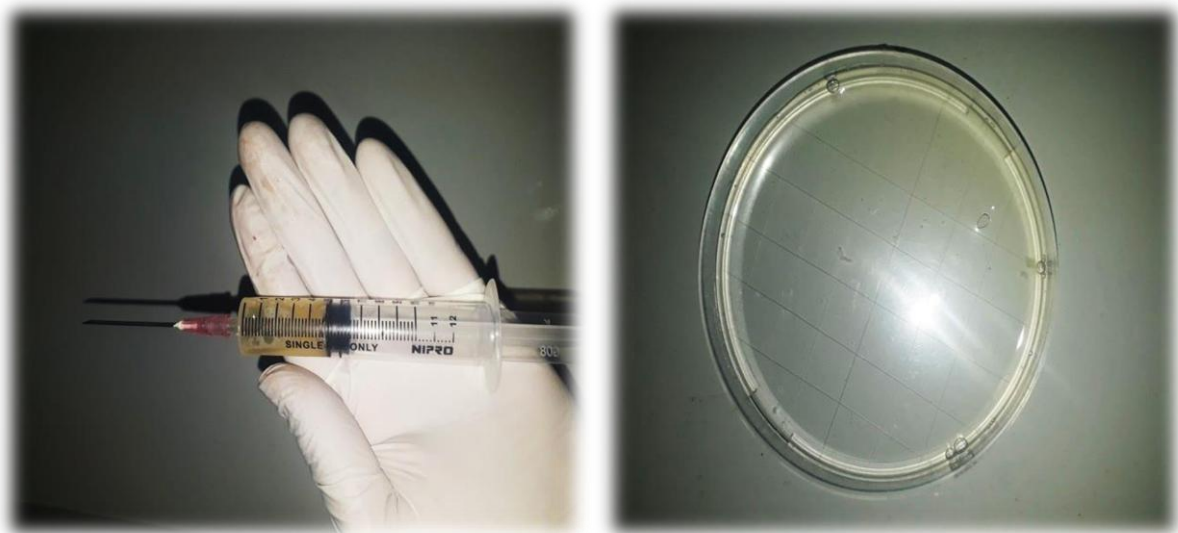


Figure 15 : Liquide obtenu à partir de la ponction des follicules d'un diamètre inférieur à 08mm

- ❖ Les follicules ayant un diamètre supérieur à 8mm sont consacrés pour la récupération du liquide folliculaire à l'aide d'une seringue de 5ml ou 10ml.



Figure 16 : Liquide obtenu à partir de la ponction des follicules d'un diamètre supérieur à 8mm

III.3. Préparation du liquide folliculaire

Le liquide aspiré a été mis dans des tubes secs pour être centrifugé à 2000 tours pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé et ré-centrifugé une deuxième fois de la même manière. Le deuxième surnageant est prélevé et placé dans des tubes secs identifiés pour être soit utilisé pour la MIV, soit congelé à -20C° pour une utilisation ultérieure.

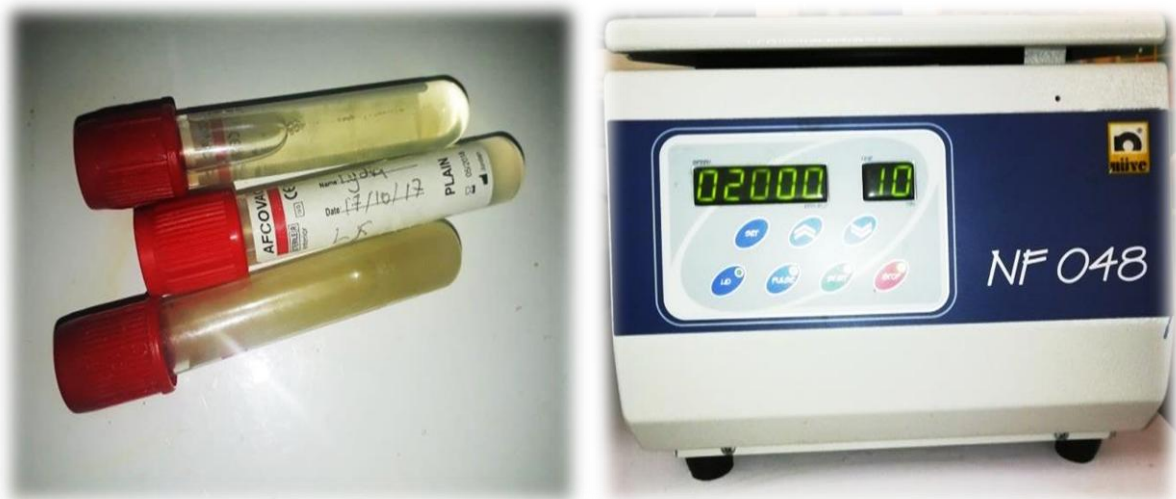


Figure 17 : Matériel nécessaire pour la préparation et la conservation du liquide folliculaire

III.4. Observation

Les boîtes de Pétri sont observées sous microscope inversé au grossissement 4 : on repère alors de nombreux débris tissulaires et quelques ovocytes sous formes de COCs. Ses derniers sont classés en suite prélevés de leur milieu à l'aide d'une paille attachée à une seringue d'insuline pour être rincés 3 fois dans 2 à 2.5ml de milieu de lavage des ovocytes PBS .

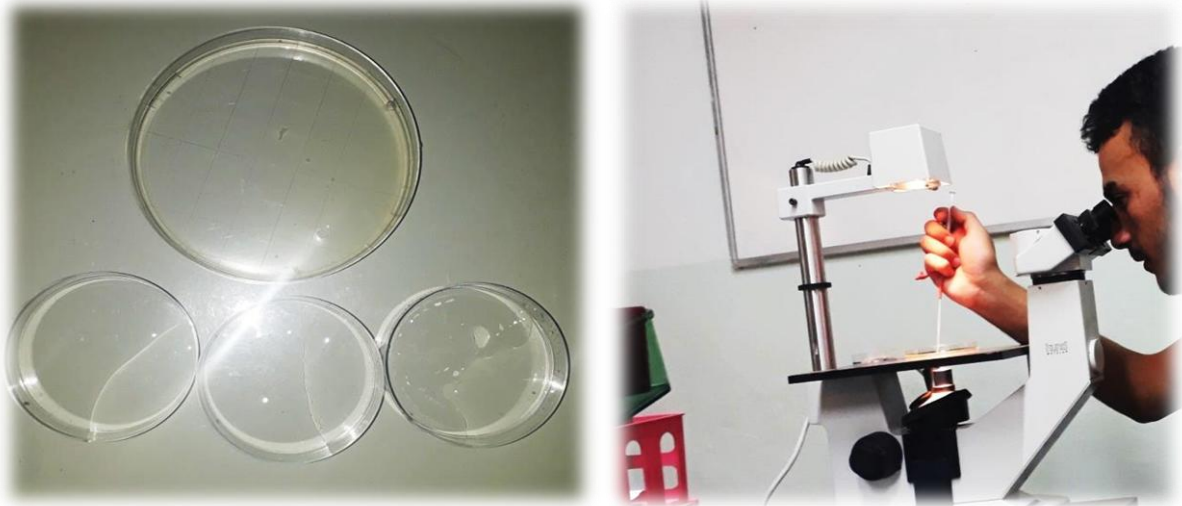


Figure 18 : Observation et prélèvement des COCs à l'aide d'une paille attaché à une seringue d'insuline pour être rincé 3 fois

III.5. Classification des COCs

Tous les COCs observés dans la boîte de pétri sont triés et classés selon leur aspect morphologique (De-Loos *et al.*, 1989), en tenant compte de l'homogénéité du cytoplasme et des couches de la granulosa.

- ❖ Qualité 1 (Q1) : Cumulus pluristratifié (plus de trois couches) compacté et un cytoplasme homogène.
- ❖ Qualité 2 (Q2) : Cumulus compacté à une ou deux couches et un cytoplasme homogène.
- ❖ Qualité 3 (Q3) : Cumuls moins compacté et un cytoplasme moins régulier avec des zones sombres.
- ❖ Qualité 4 (Q4) (mauvaise qualité ou qualité anormale) : sans cumulus, avec un cytoplasme irrégulier.

Les études préconisent de ne conserver que les COCs de la classe I et II. Les COCs de la classe III et IV sont éliminés de l'étude.

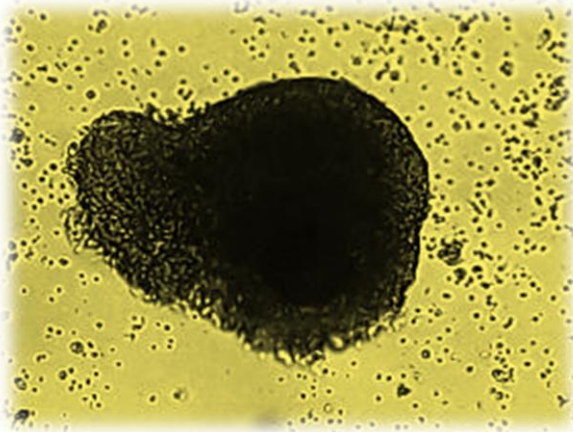


Figure 19 : COCs classe 01

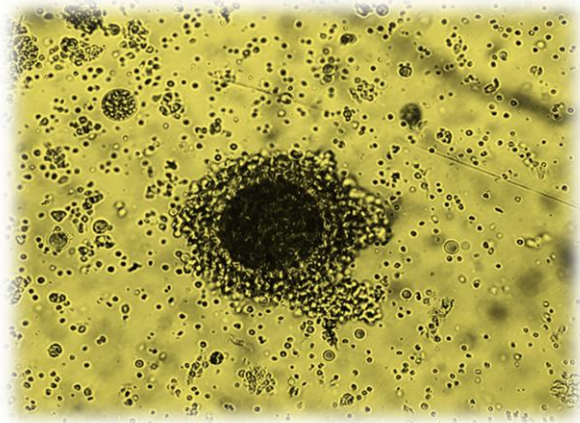


Figure 20 : COCs classe 02

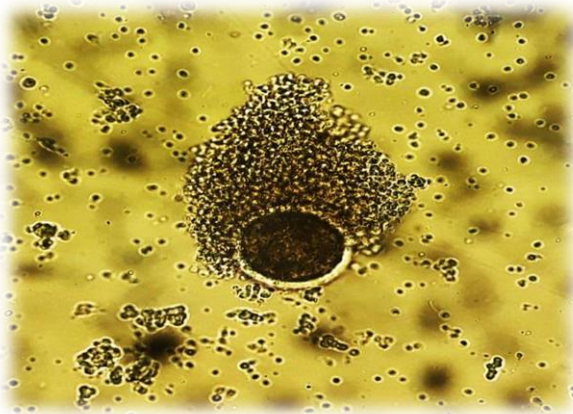


Figure 21 : COCs classe 03

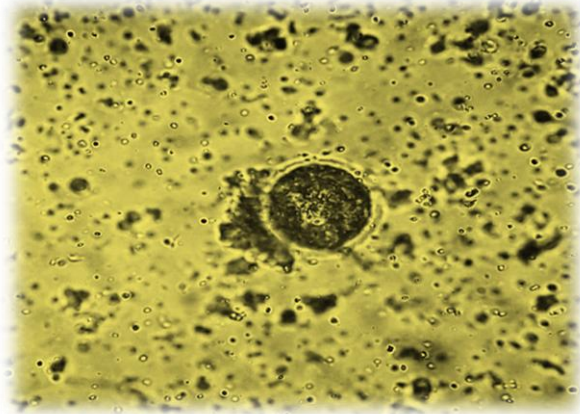


Figure 22 : COCs classe 04

III.6. Milieux utilisés pour la MIV

Nous avons teste 03 milieux de maturation :

- ❖ 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

III.7. Mise en culture des COCs

Après le 3ème rinçage, les COCs sont prélevés à l'aide d'une paillette attachée à une seringue d'insuline et placés dans des puits contenant 0.5ml des 03 milieux de maturations cités en dessus. Chaque puits comporte 04 à 05 COCs. Ensuite, les boîtes multi-puits ont été introduites dans un sac en plastique fermé hermétiquement et placées dans une étuve.



Figure 23 : Boite multi-puits, sac en plastique fermé hermétiquement



Figure 24 : Etuve réglée à 38C°

Après 24h de mise en maturation a une température de 38 C°, les COCs sont observés dans leurs puits à l'aide d'un microscope inversé.

On considère comme maturés les COCs avec un cumulus expansé clair et un ovocyte central légèrement plus foncé, relativement flou mais homogène. Dans les autres cas, les COCs sont considérés comme immatures voir comme atritiques (cumulus noirâtre, cytoplasme ovocytaire hétérogène).

IV. Résultats

Tableau 3 : Taux de récupérations des COCs dans les 03 expérimentations

Nbre d'ovaires	Nbre de follicules	Nbre d'ovocytes	Taux d'ovocytes récupéré
06	95	28	4.66
10	149	23	2.3
06	110	30	05
22	354	81	3.68

Après la collecte des ovocytes par la méthode de ponction et aspiration, nous avons obtenu un taux de récupération de 3.68 COCs par ovaire.

Tableau 4 : Pourcentages des COCs selon leurs classes

Nbre C	Nbre COCs Classe01	Nbre COCs Classe02	Nbre COCs Classe03	Nbre COCs Classe04	Nbre des COCs utilisée
28	16	04	04	02	20
23	12	04	04	03	16
30	20	04	03	03	24
81	48	12	11	08	60
100%	59.25%	14.81%	13.58%	09.87%	74.07%

Après la collecte des COCs, nous les avons classés en : classe 01 avec un taux de 59,25%, classe 02 avec un taux de 14,81%, classe 03 avec un taux du 13,58% et classe 04 avec un taux de 09.87%.

Les résultats de la MIV sont présentés dans le tableau05.

Tableau 5 : Résultats obtenus après MIV dans différents milieux

Composition De milieu	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes immatures	Taux de MIV
Milieu de base TCM199 seul	20	08	12	40%
TCM199 + 10% deBFF	16	09	07	56.52%
TCM199 + 50% de BFF	24	05	19	20.83%
Total	60	22	38	39.11%

On a observé une expansion du cumulus sur 22 COCs parmi les 60 mises en culture, soit un taux de MIV moyenne de 36,66%.

Le milieu I représenté par le milieu de base TCM199 seul, parmi les 20 COCs mis en culture, 08 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de 40%, 12 COCs sont restés immatures.

Le milieu II représenté par le milieu de base TCM199 enrichi avec 10% deBFF, parmi les 16 COCs mis en culture, 09 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de 56.52%, 07COCs sont restés immatures.

Le milieu III représenté par le milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de BFF, parmi les 24 COCs mis en culture, 05 ont subi une expansion du cumulus, soit un taux de 20.83%, 19 COCs sont restés immatures.

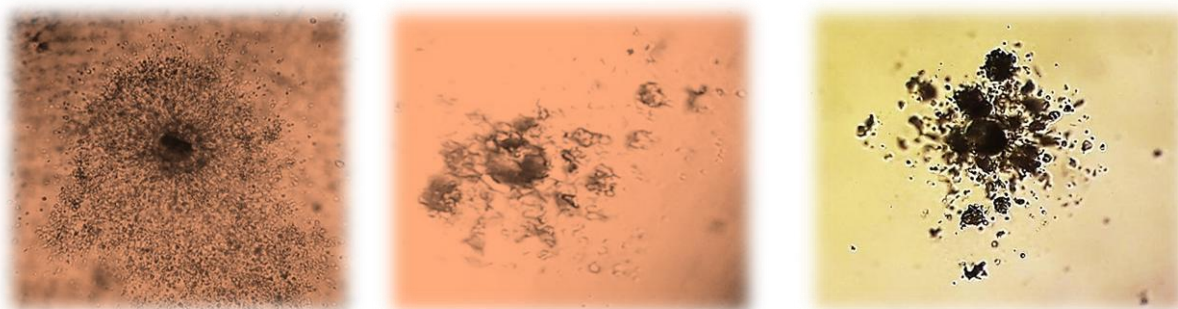


Figure 25 : Ovocytes expansés après maturation

V. Discussion

Nous avons travaillé sur un total de 22 ovaires, où nous avons ponctionné 354 follicules visible à leur surface à partir desquels nous avons récolté 81 COCs de différentes classes. Une moyenne de 3,68 ovocytes par ovaire a été obtenu, ce résultat est proche de celui de Kumar et al (1997) qui est 3,10 ; mais inférieur à celui de Belarouci et Tafet (2017) qui est de 5,75 COCs par ovaire malgré l'utilisation de la même technique de ponction. Cela peut être dû à des défauts de manipulation, notamment lors du transfert des ovocytes pour le rinçage dans les 03 milieux de PBS.

Nous avons utilisé 3 milieux de maturation avec différents taux d'incorporation de BFF (milieu 1, 2 et 3). Le taux de maturation global que nous avons obtenu est de 39,11% ce qui est inférieur à ceux obtenu par de Belarouci et Tafet (2017) qui est de 56,76%. Cela peut être dû aux mauvaises conditions de travail.

Dans notre travail nous avons obtenu un taux de maturation par milieu de 40%, 56.52%, 20.83% respectivement dans le milieu 1 (de base TCM199 seul), le milieu 2 (TCM199 + 10%BFF) milieu 3 (TCM 199 + 50%BFF).

L'étude de Belarouci et Tafet (2017) a démontré que le meilleur taux de maturation a été obtenu avec le milieu de base additionné de 50% de BFF (63,79%), dans notre étude ce même milieu nous a donné le taux le plus faible (20,83%). Cela peut être dû à un défaut de manipulation.

Le taux de maturation le plus élevé que nous avons obtenu est de 56,52% en utilisant le milieu 2 (10% de BFF), Satitmanwivat *et al* (2015) a obtenu de taux similaire en utilisant des milieux enrichis avec 10% de SVF. Adel et al (2007) a obtenu des taux proche en utilisant un milieu de base enrichi avec du SVF et de la glutamine. Cela montre que le liquide folliculaire peut être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation.

Hussain et al.(2015) a obtenu des taux de maturation nettement supérieurs aux nôtres en utilisant des milieux de bases (Ham's F12) enrichis aux hormones (FSHp) et des substrats énergétiques (pyruvate et glutamine) avec 84,52% d'ovocytes expansés. Par contre le même auteur a obtenu des taux assez faibles (36,66%) lorsqu'il a remplacé le milieu de base avec le TCM 199. Ce qui dénote d'une part l'importance des enrichissements, mais aussi la nature du milieu de base utilisé. Le même constat a été fait par Bruyere (2002) avec un taux de

maturation de 87,5% en enrichissant le milieu avec des gonadotropines (FSH et LH), des sérums (SVF, BFF) et des substrats énergétiques (Glutamine).

VI. Conclusion et recommandations

Dans notre étude, il était question d'évaluer l'efficacité d'enrichissement de milieu de culture TCM199 avec différents concentration de liquide folliculaire et la capacité de ces différents milieux que nous avons utilisés à induire la maturation *in vitro* d'ovocytes collecte a partir des ovaires récoltés à l'abattoir.

Les résultats de maturation que nous avons obtenus sont encourageants, indiquent que le milieu de base TCM199 enrichi avec de BFF constitue un milieu favorable pour la MIV. Mais il y a toujours une nécessité de l'enrichie avec d'autres supplémentation protéiques, hormonales.

Ce travail constitue une phase préliminaire de la 2^e génération des biotechnologies de l'embryon. Afin d'optimiser la réussite de ce travail, les études futures doivent tenir compte de certains facteurs qui influencent :

- ❖ Le rendement et la qualité des ovocytes à savoir : l'âge des vaches donneuses, la note d'état corporel, l'état physiologique, le poids et le volume des ovaires et la technique utilisé pour la récolte des COCs.
- ❖ La capacité des COCs de subir la MIV à savoir : la technique de MIV ainsi le milieu de maturation utilisé et les conditions de mise en maturation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. abraham, m.c., gustafsson h., ruete, a. and brandt, y.c., 2012. breed influences on in vitro development of abattoir-derived bovine oocytes. *acta veterinaria scandinavica* 54, 1-6.
2. adashi e.y., resnick c.e., hernandez e.r. insulin-like growth factor-1 as an amplifier of folliclestimulating hormone: action studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *endocrinology*, 1988 ; 122, 1583-1591.
3. adel.d, bourada.a, bouchama.n, nadjemi.h (2009) maturation ovocytaire in vitro chez la vache itelv (baba ali) université saad sahleb (blida)
4. agrawal, k.p., sharma, t., sexana, c. and sharma, n. 1995. chronology of first meiotic events of caprine oocytes matured in vitro. *indian j. anim. sci.* 65, 285-288.
5. ali a, lange a, gilles m, glatzel ps, morphological and fonctionnal characteristics of the dominant follicles and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function *theriogenology*, 2001, 56 569-579
6. alm h., torner h. in vitro maturation of horse oocytes. *theriogenology*, 1994, **42**, 345-349.
7. anderiesz c, ferraretti a, magli c, fiorentino a, fortini d, gianaroli l, jones gm, trouson ao. effect of recombinant human gonadotrophins on human bovine and murine oocyte meiosis fertilization and embryonic development in vitro. *hum reprod* 2000; 15: 1140-8.
8. 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.
9. anguita, b., vandaele, l., mateusen, b., maes, d. and soom, a.v. 2007. developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *theriogenology* 67, 537-549.
10. annemarie z., karin m., karen r. et katarina j. (2003). apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *theriogenology*, 59:1421-14
11. archbald l.f., sumrall d.p., tram t., klapstein e., risco c. et chavatt p. (1993).
12. armstrong d.t. recent advances in superovulation of cattle. *theriogenology*, 1993, 39, 7-24.
13. barboni b., turriani m, tiu l, smith pjs, keefe dl, vascular endothelialgrowth factor production pic antral follicles. *biol. reprod*, 2000, 63 858-864
14. barceló-fimbres, l.f. campos-chillón, n.r. mtango, j. altermatt, l. bonilla, r. koppang, j.p. verstepgen; 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
15. 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.
 16. barnes fl, kausche a, tiglias j, wood c, wilton l, trounson a. production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes. *fertil steril* 1996; 65: 1151-6.
 17. beam s.w. et butler w.r. (1999). energy balance effects on follicular development .
 18. bendell j.j., dorrington j.h.. epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *endocrinology*, 1990 ; 127, 533-540.
 19. betteridge k.j., smith c., stubbings r.b., xu k.p., king w.a. potential genetic improvement of cattle by fertilization of oocytes in vitro. *j.reprod.fert.*, 1989, 38 suppl., 87-98.
 20. bevers,anna r. beker-van (1997) 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
 21. bohlooli. sh, f cedden (2015) hepes buffer in ovary-transportation medium influences developmental competence of cattle oocytes.
 22. bruyere (2002) thèse: maturation ovocytaire in vitro chez la vache thèse de docteur vétérinaire.
 23. byskov ag. regulation of meiosis in mammals. *ann. biol. anim. biochem. biophys.*, 1979, 19, 1251-1261.
 24. cahill l.p. folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *j.reprod.fert.*,1981,30 suppl., 135-142.
 25. cahill l.p., mauleon p. influence of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *j.reprod.fert.*, 1980, 58, 321-328.
 26. caravaglios, r. & cilotti, r. (1957) a study of the proteins the follicular fluid of the cow. /. *endocr.*15, 273-278.
 27. caravaglios, r. & cilotti, r. j. (1957) a study of the proteins in the follicular fluid of the cow. *j.endocr.* 15, 273.
 28. carolan.c, 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

29. cetica, p.d., dalvit, g.c. and beconi, m.t. 1999. study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *biocell*. 23, 125-133.
30. cha ky, koo jj, ko jj, choi dh, han sy, yoon tk. pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *fertil steril* 1991; 55: 109-13.
31. cuq, p. et agba, k. c. 1975. les organes génitaux de la femelle zébu. *rev. elev. méd. vét pays trop*. 28, 331-403.
32. del campo m.r., donoso x., parrish j.j., ginther o.j. selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *theriogenology*, 1995, **43**, 1141-1153.
33. de-loos f., vanvlirt c., van mawik p. et kruip t.a.m. (1989). morphology of immature bovine oocytes. *gametes res*. **24**: 197-204.
34. derivaux j. et ectors f. (1986) la gamétogenèse in : decrivaux j. et ectors f (eds.). reproduction chez les animaux domestiques, 3ème édition, cabay, louvain-la-neuve, 349-361.
35. dieleman sj., macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *reprod nutr dévelop*, 1983, 22, 465-473
36. driancourt m.a., gougeon a., monniaux d., royère d. et thibault c. (2001).
37. driancourt m.a., gougeon a., royere d., thibault c. la fonction ovarienne. in thibault c, levasseur mc. inra (edts), "la reproduction chez les mammifères et l'homme". inra : 1991a, 273- 298.
38. driancourt m.a., thatcher w.w., terqui m., andrieu d. dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to pmsg. *dom.anim. endocrinol.*,1991b, 8, 209-221.
39. driancourt ma., gougeon a, folliculogénèse. ovogyte et embryon, de la physiologie à la pathologie, hamamah s, ménézo y., ellipses/ editions marketing, 1999, panis, 368p.
40. drion p.v., ectors p.j., hanzen c., houtain j.y., lonergan p. et beckers j-f., (1996).regulation de la croissance folliculaire et lutéale. *le point veterinaire*, vol. 28, numéro spécial «reproduction des ruminants».
41. drion.p.v, j-f. beckers ,f.j. ectors, c. hanzen, j-y. houtain, p. lonergan (1996) *le point veterinaire*, vol. 28, numéro spécial "reproduction des ruminants"

42. du colomb *et al.*,2013 ;gallardo et coll, 2001, takahashi *et al.*, 1986, nandi *et al.*, 2002, aguilar *et al* (2001),grupen et armstrong, 2010. pfe essais de maturation ovocytaire in vitro blida .
43. dufour j.j., cahill l.p., mauleon p., short p. long term effects hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *j.reprod.fert.*,1979 ;57,301-309.
44. elder k.; dale b.; assisted reproductive kumar a., solanki s.k., tripathi v.n. et jain g.c. (1997). oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *animal reproduction science*, 47: 189-195
45. erickson b.h. developmental and senescence of the postnatal bovine ovary. *j.anim.sci.*,1966b, 25, 800-805.
46. erickson b.h., reynolds r.a., murphee r.l. ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cows. *biol.reprod.*, 1976, 15, 555-560.
47. fagbohun et downs (1990) . collecte et maturation des ovocytes bovins 39p. projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaireprésenté par belarouci fatma zohra tafet naouel institut des sciences vétérinaires- blida.
48. findlay j.k. an update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *biol. reprod.*, 1993 ;48, 15-23.
49. fortune j.e. , sirois j., turzillo a.m., lavoit m. follicle selection in domestic ruminants. *j.reprod.fert.*,1991, suppl., 43, 187-198.
50. fortune j.e. ovarian follicular growth and development in mammals. *biol.reprod.*, 1994, 50, 225-232.
51. fouladi nasha aa., waddington d., campbell khs.,maintenance of bovins oocyte in meiotic arrest and subsequent developement in vitro :a comparative evaluation of antral follicule culture with other methods .*biol..reprod.*,1999. 56 255-262
52. fouladi nashta aa, waddington d, campbell khs, maintenance of bovine oocytes in 1994, 50 225-232 *ferti*, 1999, suppl. 54 439-448 meiotic arrest and subsequent developme n vitro a comparative evaluation of antral an follicular growth and development in mammals *biol. reprod*,
53. franz l.c., choi y.h., squires e.l., seidel g.e., jr., hinrichs k. effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *reproduction*, 2003, **125**, 693-700.

54. gable t.l., woods g.l. confocal microscopy of germinal vesicle-stage equine oocytes. *theriogenology*, 2001, **55**, 1417-1430.
55. gayrard (2007) physiologie de la reproduction des mammiferes.
56. gazal o.s., leshin l.s., stanko r.l., thomas m.g., keisler d.h., anderson l.l.et 1998.
57. géraldine bruyere (2002) thèse: maturation ovocytaire in vitro chez la vache thèse de docteur vétérinaire
58. gerard d, herlant m. sur la persistance de phénomènes d'oogenèse chez les lémuriens adultes. *arch. biol.*, 1953, 64, 97-111.
59. gotoh y., nishida e, activation mechanism and function of the map kinase cascade. *mol. reprod. dev*, 1995, 42 86-492
60. goudet g., bezard j., duchamp g., palmer e. transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to in vitro maturation in the mare? *equine vet. j. suppl.*, 1997b, **25**, 54-59.
61. grondahl c., hyttel p., grondahl m.l., eriksen t., gotfredsen p., greve t. structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *mol. reprod. dev.*, 1995, **42**, 94-105.
62. gu erin p, guillaud j, ménézo y « hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro » *hum reprod*, 1995,10,866-872..(livre la reproduction chez les mammif ere et l'homme.
63. guilbault la, rouillier p, matton p. glencross rg. beard aj, knight pg relationships between the level of atresia and inhibin contents (a subunit and a-  dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing development in cattle. *biol reprod*, 1993, 48 268-276 phases of development in cattle. *biolreprod*, 1993, 48 268-276.
64. 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, b angalore, india
65. hanzen.ch, lourtie.o, & p.v,d (2000). le development in cattle. *biolreprod*, 1993, 48 268-276.
66. henderson km, mac neilly as., swanston ia., gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size *j. reprod fertil.*, 1982, 65 467-473
67. heyman y., chesne p., garnier v., thuard j.m. et renard j.p. (1990). le cl onage embryonnaire chez les mammifères domestiques. *btia génétique*, **56**:33– 36.

68. hinrichs k., williams k.a. relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *biol. reprod.*, 1997, **57**, 377-384.
69. hirshfield a.n., midgley a.r. morphometric analysis of follicular development in the rat. *biol. reprod.*, 1978, 19, 597-605.
70. hochi-s., choi y.h., braun j.w., sato k. et oguri n. (1993). factors affecting the recovery of follicular oocytes from horses and their in vitro maturation.
71. hulshof s.c.j., figuereido j.r., beckers j.f., bevers m.m., ven den hurk r. isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *vet. quartely*, 1994, 16, 78-80.
72. hutchinson l.a., findlay j.k., de vos f. effect of bovine inhibin, transforming growth factor-b and bovine activin-a on granulosa cells differentiation. *biochem. biophys. res. commun.*, 1987 ; 146, 1405-1412
73. ireland j.j., roche j.f. development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormone, steroids in follicular fluid and gonadotrophin receptors. *endocrinology*, 1982, 111:2077.
74. issel rd, nagele a, eckert kg et al. « promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and n-acetyl-cysteine» .*biochem pharmacol*, 1988,37,881-888.
75. komar cm, berndtson ak, evans aco., fortune je, le déclin de l'œstradiol circulant pendant la période péri-ovulatoire est corrélé aux diminutions de l'œstradiol et des androgènes et de l'arn messager de l'aromatase p450 et de l'hydroxyhydrase p450 dans les follicules préovulatoires bovins. *biol. reprod*, 2001, 64 1797-1805.
76. kouamo.j - 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
77. kruij tam, dieleman sj, steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle 1982. *theriogenology*. 24, 395 407
78. kumar a., solanki s.k., tripathi v.n. et jain g.c. (1997). oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *animal reproduction science*, 47: 189-195

79. larson g.h., mallory d.s., dailey r.a., lewis p.e. gonadotropin concentrations, follicular development and luteal function in pituitary stalk-transected ewes treated with bovine follicular fluid.j.anim.sci.,1991 ;69,4104-4111.
80. law a.s., baxter g., logue d.n., o'shea t., webb r. evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. j.reprod.fert.,1992 ;96,603-616
81. lodde et al., 2007 . essais de la maturation ovocytaire in vi tro chez la vacheprésenté par belarouci fatma zohra et tafet naouel(2017)
82. luciano1, f. franciosi, c. dieci, i. tessaro, l. terzaghi, s.c. modina, 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
83. lussier j., matton p., dufour j.j. growth rates of follicles in the ovary of the cow. j.reprod.fert.,1987, 81, 301-307.
84. 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.
85. manarang-pangan, s. & menge, a. c. (1971) immunologie studies on human follicular fluid. fert. steril. 22, 367.
86. marie m., (1996). use of monitoring for assessment of reproductive status in postpartum
87. marieb, n. e. 1999. anatomie et physiologie humaine, éditions du renouveau pédagogique inc. *the benjamin/cumming publishing company inc*, 1-1204.
88. matzuk m.m., burns k.h., viveiros m.m.,eppig j.j., 2002. intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation.science, 296, 2178-2180.
89. 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.
90. menezos et j.testart., 1975 étude comparée du sérum sanguin et du liquide folliculaire préovulatoire chez la vache.
91. menezos y et j.testart., 2001 étude comparée du sérum sanguin et du liquide folliculaire préovulatoire chez la vache.

92. mermillod p. (2001). croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. dans: thibault et levasseur (edits). la reproduction chez les mammifères et l'homme. ellipses, inra, paris, pp: 348- 366.
93. mermillod p. et marchal r. (1999 b). la maturation de l'ovocyte de mammifères.
94. mikkelsen al, host e, blaabjerg j, lindenberg s. maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *reprod biomed online* 2001; 3: 112-116.
95. monniaux , d., caraty, a., dalbies-tran, r., dupont, j., fabre, s., mermillod, p. et monget, p. 2009. développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *inra prod. anim.*22, 59-76.
96. monniaux d., chupin d., saumande j. superovulatory responses of cattle. *theriogenology*, 1983, 19, 55-64.
97. monniaux d., monget p. gonadotropines et régulations paracrines ovariennes. intégration des mécanismes de régulation d'un processus physiologique complexe, la folliculogenèse ovarienne. in les gonadotropines. y.combarnous et p.volland-nail eds. 1997,inra, paris pp267-284.
98. nagai t., the improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine 1291-1301 oocytes. *theriogenology*, 2001, 55
99. natumanya, r., owiny, d. and kugonza, r. 2008. the potential of ankole cattle abattoir ovaries for *in vitro* embryo production. *african journal of animal and biomedical sciences* 3(1), 1819-4214.
100. 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 135, 3229-3238.
101. otoi, t, willingham, l, shin, t, kraemer, dc, and westhusin, m. 2002. effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *reproduction* 124(6):775-781.7
102. pedersen h.g., watson e.d., telfer e.e. effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *theriogenology*, 2004, **62**, 468-480.
103. peters h. et ball. (1994). the ovary. in reproductive biology handbooks 175pp ed elek. granada press, new york.
104. peters h. the development and maturation of the ovary. *ann.biol.bioch.biophys.*, 1976, 16, 271- 278.

105. preis k.a., carnevale e.m.,(2004) coutinho da silva m.a., caracciolo di brienza v., gomes g.m., maclellan l.j., squires e.l. in vitro
106. rothblat gh, cristofalo vj. 1972; growth, nutrition and meta bolism of cells in culture. new york: academic press.
107. russe i. oogenesis in cattle and sheep. *biol.anat.*,1983, 24, 77-92.
108. 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
109. satitmanwiwat1*,chinarat changsangfah1, tassanee faisaiarm1, kulnasan saikhun1 and kampon kaeoket2 (2015) effect of different charged groups of cow follicular fluid proteins on in vitro oocyte maturation
110. satrapa, r.a., nabhan, t., silva, c.f., simões, r.a.l., razza, e.m., puelker, r.z., trinc, l.a. and barros, c.m. 2010. influence of sire breed (*bos indicus* versus *bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *theriogenology* 76, 1162-1167.
111. saumande j. la folliculogénèse chez les ruminants. *rec.méd.vét.*, 1991, 167, 205-218.
112. savio j.d .,boland m.p., hynes n., roche j.f. resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *j.reprod.fert.*,1990a, 88, 569-579.
113. shabpareh v., squires e.l., seidel g.e., jasko d.j. methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *theriogenology*, 1993, **40**, 1161-1175.
114. shalgi, r., kraicer,p. f. & soferman, n. (1972b) human follicular fluid. (abstract). *j. reprod. fert.* 31, 515.
115. shi ds, avery b, greve t.,1998. effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. *theriogenology*;50:667-74.
116. sirard m.a., florman h.m., leiberied-rutledge m.l. timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *biol.reprod.*,1989, 40, 1257- 1263.
117. sirard, m.a., richard, f., blondin, p. and robert, c. 2006. contribution of the oocyte to embryo quality. *theriogenology* 65: 126à136.
118. sirois j., fortune j.e. lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *endocrinology*, 1990, 127, 916-925.

119. stancioiu, n. & lunca, h. (1971) concentrations des protéines totales et des fractions protéiques dans le liquide folliculaire normal, pendant les différentes phases du cycle oestral, et dans le liquide des kystes folliculaires ovariens, ainsi que dans le sang des mêmes vaches. *red. méd. vét. ec. alfort.* 147, 979.
120. sunderland sj., crowe ma, boland mp, roche jf., ireland jj., selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. *j. reprod. fertil*, 1994 101 547-555
121. tanikawa m, harada t, mitsunari m et al « expression of c-kit messenger ribonucleic acid in human oocyte and presence of soluble c-kit in follicular fluid » *j clin endocrinol metab*, 1998, 83, 239-42.
122. trounson a, wood c, kausche a. in vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *fertil steril* 1994; 62: 353-62.
123. turnbull k.e., braden a.w.h., mattner p.e. the pattern of follicular growth and atresia in ovine ovary. *austr.j.biol.sci.*, 1977, 30, 229-241.
124. veeck ll, wortham jw jr, witmyer j, sandow ba, acosta aa, garcia je, jones gs, jones hw jr. maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *fertil steril* 1983; 39: 594-602.
125. walker sk, quinn p, ashman rj, smith dh, seamark rf. protein supplementation for the culture of one-cell embryos of sheep. *pro aust soc reprod biol.* 1986; 18:9.
126. wandji s.a., fortier m.a., siurard m.a. differential response to gonadotropins and prostaglandins e2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. *biol.reprod.*, 1992, 46, 1034-1041.
127. wang, z. g., song-dong, y. and zi-rong, x. 2007. effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in holstein cow. *asian-aust. j. anim. sci.* 20(4), 496 - 500.
128. wani, n.a., wani, g.m., khana, m.z. and sidiqi, m.a. 1999. effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* maturation and *in vitro fertilization* procedures in sheep. *small ruminant research* 34, 71-76.
129. ward f., rizo d., corridan d., quinn k., boland m. et lonergan p. (2001). paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implication for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *molecular reproduction and development*

130. waston aj, de sousa p, caverney a et al. « impact of bovine maturation médium on oocyte transcrit levels, blastocyst development , cell number and apoptosis.» *biol reprod* 2000,62.355-364.
131. 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.
132. webb r., gong j.g., bamley t.a. role of growth hormone and intrafollicula peptides in follicle development in cattle. *theriogenology*, 1994 ; 41, 25-30.
133. webb r., gong j.g., bamley t.a. role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *theriogenology*, 1994 ; 41, 25-30.
134. westergaard l, callesen h, hyttel p. meiosis inducing substances (mis) in bovine prevulatory follicles. *zuchthygiene*, 1985, 20, 217-221.
135. wynn p, picton hm, krapez ja, rutherford aj, balen ah, gosden rg. pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase ii by in-vitro maturation. *hum reprod* 1998; 13: 3132-8.
136. xiao s., findlay j.k., robertson d.m. the effect of bovine activin and follicle stimulating hormone (fsh) supreesing protein/follistatin on fsh-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *mol.cell.endocrinol.*,1992 ;133,131-139.
137. yanagimachi r. mammalian fertilization. in : knobil e, neill jd. (eds). *the physiology of reproduction*. second edition. raven press ltd , new york, 1994, 189-317.
138. yang sh, son wy, yoon sh, ko y, lim jh. correlation between in vitro maturation and expression of lh receptor in cumulus cells of the oocytes collected from pcos patients in hcg-primed ivm cycles. *hum reprod* 2005; 20: 2097-103.
139. zhang x, zerafa a, wong j, armstrong dt, khamsi f. human menopausal gonadotropin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization and cleavage rates. *fertil steril* 1993; 59: 850-3.
140. zhangj.j. boyle m.s., allen w.r. recent studies on in vitro fertilization of equine oocytes. *equine vet. j.*, 1989, **21**, 101-104.