



035THV-2

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Saad Dahleb Blida

Faculté des sciences agro-vétérinaire et biologiques

Département des sciences vétérinaires

Mémoire

En vue de l'obtention de diplôme « Docteur vétérinaire »

Thème :

Récolte des ovocytes bovins après abattage

Présenté par : **KHELLAF Mehenni & BOUKHALFA Moussa**

Membres de jury :

Président de jury : Mr KAIDI R, Professeur à l'université de Blida.

Examineurs : Mr GHARBI I, Chargé de cours à l'université de Blida.

Mr KHELLAF, Chargé de cours à l'école nationale vétérinaire d'Alger.

Promoteur : Mr ADEL D, Chargé de cours à l'université de Blida .

Promotion 2006

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail tout d'abord à ma regrettée **chère mère** (Dieu t'accueille au sein de son vaste paradis mère..., Amen) et **mon père** pour tellement de choses que c'est difficile à exprimer..., Pour m'avoir appris d'ouvrir les yeux sur le savoir, pour m'avoir laissé voler de mes propres ailes quand j'en ai eu envie, pour votre amour évidemment...

A mes sœurs Souhila, Lamia, Mounia pour leurs amour et encouragements.

A mes frères Mounir, Djoher et sa femme Nawel pour leurs soutiens moral et leurs conseils.

A la nouvelle femme de mon père.

Au nouveau coucou de la maison, **Hani** pour la joie et la lumière qui vient de ramener avec.

A ma famille Ait Ahcen.

A mes tantes et oncles .

A monsieur Djama mouloud et sa femme pour les encouragements et leurs solidarité.

A monsieur Boukhalifa Ali et toute sa famille.

A mes amis : Louhab, Taeib, Nabil, Riad, Tahar, Mouhoub, Rabie, youcef, Abdenour, Mounir, Salim, Khaled, Farid, Faicel, Cherif, Nourdine et tous les autres que je connais.

A mes amis de la faculté :

Moussa, Mouloud, Nacim, Mhand, Idir, Mahdi, Mastafa, Mouhamed, Ramden, Zinou, Amine, Farida, Sylvie et tous les autres sans citer leurs prénoms .

A toutes les promotions des sciences vétérinaire de Blida.

A tous les autres que j'ai pas cité.

Meheni

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail tout d'abord à ma regrettée **chère mère** (Dieu t'accueille au sein de son vaste paradis mère..., Amen) et **mon père** pour tellement de choses que c'est difficile à exprimer..., Pour m'avoir appris d'ouvrir les yeux sur le savoir, pour m'avoir laissé voler de mes propres ailes quand j'en ai eu envie, pour votre amour évidemment...

A mes sœurs Souhila, Lamia, Mounia pour leurs amour et encouragements.

A mes frères Mounir, Djoher et sa femme Nawel pour leurs soutiens moral et leurs conseils.

A la nouvelle femme de mon père.

Au nouveau coucou de la maison, **Hani** pour la joie et la lumière qui vient de ramener avec.

A ma famille Ait Ahcen.

A mes tantes et oncles .

A monsieur Djama mouloud et sa femme pour les encouragements et leurs solidarité.

A monsieur Boukhalifa Ali et toute sa famille.

A mes amis : Louhab, Taëib, Nabil, Riad, Tahar, Mouhoub, Rabie, youcef, Abdenour, Mounir, Salim, Khaled, Farid, Faïcel, Cherif, Nourdine et tous les autres que je connais.

A mes amis de la faculté :

Moussa, Mouloud, Nacim, Mhand, Idir, Mahdi, Mastafa, Mouhamed, Ramden, Zinou, Amine, Farida, Sylvie et tous les autres sans citer leurs prénoms .

A toutes les promotions des sciences vétérinaire de Blida.

A tous les autres que j'ai pas cité.

Meheni

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à **ma mère**, pour sa patience et ses encouragements tout au long de ma vie..., ma mère parce que tu es la cause de m'ouvrir mes yeux dans ce monde et **mon père** pour l'exemple d'un homme de courage et de sérieux que je me suis maintenant le fils Docteur....

A ma regrettée chère **grande mère** Aicha (dieu l'accueille au sein de son vaste paradis) pour son amour...

A mes sœurs Nacira, Wahiba et Safia pour leurs soutiens durant mon cursus universitaire.

A mes frères Mouhamed, Ammar, Rabah, Said, Ahmed, Rezki, Djamel et Youcef pour leurs aides et encouragements continus au long de mes études.

Aux femmes de mes frères pour leurs conseils.

A mes oncles et tantes pour leur respect envers moi.

A mes amis

Amine, Ismail, Abdel malek, Louhab de Bejaia, Yacine, Soufiane, Farouk, Brahim, Samir, Ahmed, Fatah, Mahdi et les autres, pour leurs encouragements et soutiens.

A mes amis de la faculté

Meheni, Moustache, Mouhamed, Zinou, Ramdane, Hassene, Raouf, Mastafa, Hmidet, Marouane, Mahdi, Abdelghani, Ali, Mouloud, Nouredine, Tahar, Baya, Zouher, Sylvie, Amina, Imane et les autres pour leurs aides et encouragements.

A toutes les promotions des sciences vétérinaires de Blida.

Moussa

REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements :

Au dieu le tout puissant, pour ce qui nous a donné comme savoir et protégé tout au long de notre existence.

A monsieur le Professeur KAIDI

Du département des sciences vétérinaire de Blida

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

A monsieur GHARBI

Du département des sciences vétérinaire de Blida

Qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.

A monsieur KHELLAF

De l'école nationale vétérinaire d'Alger

Qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail.

A monsieur ADEL

Du département des sciences vétérinaire de Blida

Qui nous fait l'honneur d'encadrer, guider et qui a eu l'idée de ce thème.

A monsieur le Professeur HANZEN

De la faculté de médecine vétérinaire de liège

Qui nous a orienté et aidé à la réalisation de la partie expérimentale.

A monsieur le Docteur BENCHABANE

Du département des sciences agronomiques de Blida

De nous avoir accepter de discuter les résultats statistiques obtenus.

A monsieur FERROUK

Du département des sciences vétérinaire de Blida

De nous avoir aidé et encouragé au long de la réalisation de ce travail.

A Monsieur BERBER

Chef du département des sciences vétérinaire de Blida.

De nous avoir faciliter les travaux au sein du laboratoire.

Au personnels d'abattoir de Blida

De nous avoir faciliter la tache de récupération des matrices.

Aux mademoiselles Ihsane et Samia

Agents de la bibliothèque de la faculté

De nous avoir accueillir et offrir la documentation nécessaire.

Aux messieurs MIRANI ,GHOUALI et ALLAM

Ingénieurs en informatique

Qui nous ont aidé à la rédaction de ce mémoire.

Résumé

Dans un objectif de sélection et de production d'embryons in vitro chez l'espèce bovine à partir d'ovaires de vaches abattues, la recherche d'une nouvelle technologie à utiliser est nécessaire pour arriver à ses fins. C'est ainsi que les chercheurs dans ce domaine ont mis au point une technique qui nous permet d'utiliser le potentiel des ovaires des vaches abattues en récupérant les ovocytes présents au niveau de l'ovaire. De manière plus anecdotique, cette technique peut permettre de proposer une dernière descendance à une vache de haute valeur génétique abattue. En effet, la récupération d'ovocytes par ponction des ovaires d'abattoir puis leur maturation et fécondation in vitro à pour but de produire des embryons.

Notre travail fait l'objet d'une étape primaire pour la production d'embryons in vitro à savoir la récolte d'ovocytes d'ovaires bovins après abattage, cette dernière repose sur la ponction des ovaires et la classification d'ovocytes récupérés. La ponction et la récupération des ovocytes par cette méthode nous a permis d'obtenir des résultats encourageants, estimant le taux de récupération à $67,07 \pm 12,2\%$. La classification des ovocytes récoltés est basée sur un modèle de classification établi par le professeur Hanzen.C (2004) au niveau de la faculté de la médecine vétérinaire de Liège (Belgique). Nous avons pu ainsi classer tous nos ovocytes récoltés en quatre classes distinctes.

D'autres travaux dans ce domaine sont nécessaires pour arriver à réaliser la production d'embryons in vitro, cela nous permettra la maîtrise des différentes étapes et de mettre en pratique cette nouvelle biotechnologie en Algérie.

Mots clés : ovocytes, récolte, classification, fécondation in vitro (FIV).

SUMMARY

For an objective of embryo's production selection the bovine species from the ovary of the killed cows, the research of a new technology to be used is necessary in order to achieve its goals. That's how the searchers in this domain decided to use a technique which permits to use a potential of ovary of killed cows by recovering the oocytes which are present in the ovary. With an anecdotic way, this technique may permit to suggest the last descendance for a killed cow of a higher genetic value. Indeed the recovering of the oocytes by the ponction of the ovary, then their maturation and fecondation in vitro has for goal to produce the embryos.

Our task makes an object of a principal step for the production of embryos in vitro, the harvest of oocytes taken from the bovin's ovary after killing, this last depends on the ponction of the ovary and the classification of the recovered oocytes. The recover of oocytes by this method permits us to obtain the encouraging result, estimating the rate to 67,07%. The classification which is established by the Professor HANZEN (2004) in the domain of medicine veterinary of liege (Belgium) we have been able to classify all our recovered oocytes into four different classes.

Other tasks in this domain are necessary in order to achieve the realisation of the embryos production in vitro, this will permit us to master the different steps and to practise this new biotechnology in Algeria.

Key words: oocyte, recovre, classification, fécondation in vitro. (FIV)

Table de matières

Dédicaces	I
Remerciements.....	III
Résumé.....	IV
Sammary.....	V
Table de matières.....	VI
Abréviations.....	X
Liste des tableaux.....	XII
Liste des figures.....	XIII
Liste des photos.....	XIV

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE.....	01
----------------------------	----

CHAPITRE 1 : Rappels physiologiques.

1-Embryologie et formation des ovaires.	03
2-Caractéristique et régulation de la constitution du stock folliculaire.....	04
3-Folliculogénèse.....	05
3-1-Histologie du follicule.....	06
3-2-Aspect morphologique de la croissance folliculaire.....	07
a-Le follicule primordial.....	07
b-Le follicule primaire.....	07
c-Le follicule secondaire.....	08
d-Le follicule tertiaire (Antral).....	08
e-Le follicule mûr ou de De Graaf.	09
3-3-Aspect cinétiques de la croissance folliculaire.	11
3-3-1-Nombre de follicules entament leur croissance et durée de la folliculogénese.	11
3-3-2-Notion de vague de croissance folliculaire.....	11

a-Principe.....	11
b-Phase de recrutement.....	12
c-Phase de sélection.....	13
d-Phase de dominance.....	14
3-4-ovogénèse.....	15
a-Les cellules germinales primordiales.....	15
b-Les ovogonies.....	16
c- Ovocyte : Morphologie.....	16
d-Ovulation.....	17
e-Meiose.....	17
-Méiose ovocytaire.....	17
4-L'atrésie folliculaire.....	20
5-Aspect régulateurs de la croissance folliculaire.....	21
5-1-Déterminisme de l'entrée en croissance. Phase gonadotrope indépendant.....	21
5-2-Phase gonadotrope dépendante.....	22
6-Régulation hormonale de cycle oestral.	23

CHAPITRE 2 : FECONDATION IN VITRO

1-Introduction.....	24
2-Historique de la fécondation in vitro.	25
3-Les étapes de la fécondation in vitro.....	26
3-1-Les techniques de la récolte des ovocytes.....	27
3-1-1-Récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir.....	27
a-Méthode décrite par Christian Hanzen.....	27
b-Méthode décrite par Blondin et M.A.Sirard.....	28
3-1-2-Récolte d'ovocytes in vivo par la technique d'OPU.....	28

-OPU à partir de vaches gestantes.....	29
-OPU chez les génisses prépubère.....	29
A-le matériel	29
A-1-Matériel échographique.....	29
A-2-les aiguilles de ponction.....	30
A-3-le rinçage de la cavité folliculaire.....	31
A-4-les tubulures de connexion.....	31
A-5-la pression d'aspiration.....	32
A-6-le milieu de récolte.....	32
B-la méthode de ponction intra vaginale.....	32
C-Résultats potentiels.....	33
C-1-Donnés générales.....	33
C-2-Facteurs d'influences.....	35
D-Interets de l'ovum pick up.....	37
3-1-3-La qualité des ovocytes.....	38
A-critères de détermination.....	38
A-1- Chez les bovins.....	38
A-1-a-Classification utilisée par Christian Hanzen.....	38
A-1-b-Classification utilisée par Blondin et M.A.Sirard.....	39
A-1-c-Classification utilisée par De Loos et al.....	39
A-2-Chez l'Homme.....	40
Classification utilisée par S.Hamamah et al.....	40
B-facteurs d'influence.....	41
B-1-animal donneur.....	41
B-2-l'ovaire et le follicule.....	42
B-2-1-aspect morphologique.....	43
B-2-2-aspect hormonal.....	44
3-2-Maturation des ovocytes.....	44
a-Maturation in vitro.....	44

a-1- Milieu de base.....	45
a-2-Hormones.....	46
a-3-Facteurs de croissance et autres peptides.....	46
b-Evaluation de la maturation ovocytaire.....	48
c-Particularités d 'espèces.....	49
3-3-Capacitation des spermatozoïdes.....	49
3-3-1-Méthode de la fécondation in vitro.....	50
a-Sélection des spermatozoïdes.....	50
b-Induction de la capacitation.....	51
c-Induction et entretien de la mobilité.....	51
d-Fécondation proprement dite.....	51
- Les critères de fécondation.....	53
3-4-La culture des embryons.....	53
a-culture de l'embryons in vivo.....	53
b-culture de l'embryons in vitro.....	54

PARTIE EXPERIMENTALE

1-Introduction.....	55
2- Matériel et méthode.....	55
2- 1- Ovaires de vaches.....	55
2-2- Matériel.....	55
2-3-Méthode de travail.....	56
a-La collecte des ovaires.....	56
b-Récolte et classification des ovocytes.....	56
3- Résultats.....	60
4-Discussion.....	69
5-Conclusion.....	71
6-Recommandations.....	72
Annexe.....	XV
Références.....	XVI

ABREVIATIONS

AL	: All.
ADN	: Acide Désoxyribonucléique.
AF	: Attenuating Factor.
AMPc	: Adenosine MonoPhosphate cyclique.
BMOC-3	: Milieu de Brinster.
BRL	: Buffalo Rat Liver.
BSA	: Bovine Sérum Albumine.
BVD	: Diarrhée virale bovine.
CO ₂	: Gaze carbonique.
COC	: Complex Oocyte Cumulus.
CPG	: Cellules Germinales Primordiales.
CR1	: Milieu de Rosenkrans.
EDTA	: Acide Ethelen Di amine Tétrac Acétique.
EGF	: Epidermal Growth Factor.
EGTA	: anticoagulant.
FGF	: Fibroblast Growth Factor.
FIV	: Fécondation in vitro.
FSH	: Follicle Stimulating Hormone.
FSP	: Follicle Suppressing Protein.
GH	: Growth Hormone.
GnRH	: Gonadotrophin Releasing Hormone.
GnSI	: Gonadotrophin Surge Inhibiting.
GV	: Germinal Vesicle.
Hg	: mercure.
IBR	: Rhino-tracheite Infectieuse bovine.
ICSI	: Intra Cytoplasmique Sperme Injection.
IGF	: Insulin like Growth Factor.
IGF	: Interféron Growth Factor.
J	: Jour .
Kg	: Kilogramme.
LH	: Hormone Luteinisante.
M199	: Milieu de fécondation in vitro.
MDBK	: Madin Darby Bovine Kidney.
MEM	: Milieu de culture .
MHZ, mm, ml, mg	: Mégahertz, millimètre, millilitre, milligramme.
MIS	: Meiosis Inducing Substance.
MIV	: Maturation In Vitro.
MOET	: Multiple Ovulation and Embryo Transfer.
NaCl	: Chlorure de sodium.
NP	: Non Précisé.

OCS : Milieu de culture.
OMI : Oocyte Meiosis Inhibitor.
OPU : Ovium Pick Up .
p.c : post coit.
PIV : Production in vitro.
PMSG : Pregnant Mare Sérum Gonadotrophin.
PHE : Penicillamine, Hypotamine et Epinephrine.
PZD : Pellucide Zona Drilling.
PDGF :Platele Derived Growth Factor.
SOF : Synthetic Oviductal Fluid.
SUZI : Subzonal Sperm Injection.
TGF : Transforming Growth Factors.
TCM199 : Milieu de culture.
TALP : Tyrode, Albumine, Lactate, Pyruvate.
UI : Unité Internationale.
VERO : Cellules de reins de singe vert.
Vs : Versus.
ZD : Zona Drilling.
ZP : Zone Pellucide.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Bref historique de la FIV chez les mammifères et de la production in vitro d'embryons bovins .(D'après P.Guerin et al.,1996).....	26
Tableau 2 : Pourcentage de récupération des ovocytes après ponction échoguidée transvaginale chez la vache.(D'après C.Hanzen.,2004).....	35
Tableau 3 : Distribution du nombre des follicules et de leur pourcentage d'atrésie selon leur diamètre .(D'après Lussier.,1987).....	43
Tableau 04 : les critères de classification des ovocytes. (C.Hanzen., 2004).....	58
Tableau 05 : Les résultats globaux des récoltes réalisés.....	60
Tableau 06 : Le taux de grands follicules par rapport aux petits follicules selon l'état physiologique des vaches	61
Tableau 07 : La classification des ovocytes récupérés.....	61
Tableau 08 : La qualité des ovocytes récupérés de vaches gestantes et de vaches non gestantes.....	62
Tableau 09 : Le Taux des ovocytes de bonne qualité.....	62
Tableau 10 : Le rapport entre la taille de follicules et la qualité d'ovocytes récupérés..	63
Tableau 11 : La relation entre la qualité des ovocytes récupérés et la présence de corps jaune.....	64

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Schéma d'un embryon. (D'après Witschi et Langmana).....	04
Figure 2 : Le sens de migration des gonocytes.(D'après witschi et Langmana).....	04
Figure 3 : Schéma hypothétique du blocage méiotique intra folliculaire. (D'après Kotsuji et al ., 1994).....	05
Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe histologique d'un follicule ovarien.....	07
Figure 5 : Représentation schématique d'un ovaire contenant les différents stades de croissance (folliculogénèse) et de régression par lesquels passent les follicules Ovariens (Guénard et al. , 1996).....	10
Figure 6 : Sécrétion de gonadotrophine et de facteurs de contrôle au cours des phases de recrutement, de sélection et de dominance.....	14
Figure 7 : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale Jusqu'à la fécondation. (D'après Gosden,R et al .,1997).....	19
Figure 8 : Mécanisme de la régulation du cycle chez la vache(d'après A.R.PETERS et P.S.H BAUL. 1994).....	23
Figure 9 : Schéma illustrant la technique de récolte de liquide folliculaire.(D'après Marcinkowski et al.,1980).....	31
Figure 10 : Photos des quatre classes d'après De Loos., 1989.....	40
Figure 11 : Comparaison de la destinée d'un ovocyte bovin dans un follicule de 4-5 mm selon qu'il est mis en culture ou laissé dans son follicule jusqu'à l'ovulation . (selon Lonergan,P., et al 1993)	48
Figure 12 : Principe de différentes techniques de FIV assistée. (D'après Palermo et al 1992 ;Van Steirteghem et al 1993).....	52

LISTE DES PHOTOS:

Photos01 A ,B : Le matériel utilisé pour la récolte et la classification des ovocytes.....	56
Photo 02 : La ponction des ovaires récoltés.....	59
Photo 03 : Comptage et classification des ovocytes récupérés.....	59
Photos 04 a,b,c : Quelques photos des ovocytes de classe01.....	65
Photos 05 a,b,c : Quelques ovocytes de classe02.....	66
Photos 06 a,b,c : Des ovocytes de classe03.....	67
Photos 07 a,b,c : Les ovocytes de classe04.....	68

Partie
Bibliographique

INTRODUCTION GENERALE :

Les biotechnologies de la reproduction, appliquées aux animaux de rente depuis trente ans, sont à l'origine d'un important progrès génétique. L'insémination artificielle et le transfert d'embryons ont considérablement modifié les méthodes de reproduction et ont permis la mise en place de schémas de sélection chez les bovins.

Depuis de nombreuses années déjà, l'attention des généticiens s'est focalisée sur la sélection tant en qualité qu'en quantité de vaches génétiquement supérieures. Par ailleurs, les impératifs économiques de l'élevage bovin obligent d'avantage que par le passé les éleveurs à optimiser le potentiel de production de leur troupeau, notamment par une réduction de l'intervalle entre vêlages ou par une augmentation du nombre de veaux produits annuellement par ces mêmes vaches, sachant que la saillie naturelle ou l'insémination artificielle ne permettent la production dans le meilleur des cas que d'un seul veau par an et par vache. Ces objectifs génétiques et économiques ont été à la base de développement des biotechnologies de la reproduction telle que la fécondation in vitro. (FIV)

La fécondation in vitro (FIV) est une approche plus récente qui offre un vaste champ d'applications, chez les mammifères la fécondation est interne : les gamètes se rencontrent dans l'oviducte de la femelle. La fécondation in vitro ou fécondation extracorporelle consiste à mettre en présence spermatozoïdes et ovocytes dans un milieu artificiel. Cependant, les gamètes ne peuvent fusionner que s'ils ont subi une maturation préalable. Les ovocytes sont prélevés sur des ovaires obtenus après abattage des animaux, les ovocytes étant récupérés soit par aspiration de liquide folliculaire, par section de l'ovaire en tranches ou par dissection. Cette méthode de collecte des ovocytes est encore largement utilisée dans le cadre de recherches fondamentales sur la fécondation in vitro ou plus occasionnellement dans le cas d'animaux reformés pour des raisons sanitaire ou abattu d'urgence. Elle permet en moyenne l'obtention de 25 à 30% d'embryons transférables. Irréversible, elle n'est par ailleurs pas exempte de difficultés liées non seulement à l'état sanitaire ou au statut génétique de l'animal donneur prélevé à l'abattoir mais également à la méthode de prélèvement qui interrompt de manière brutale et parfois prolongée les mécanismes physiologiques et biochimiques présidents au développement ovocytaire. Les spermatozoïdes éjaculés ne sont pas féconds, ils doivent être maturés (capacités) in vitro.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de cette technique dans le traitement des vaches stériles : 38 à 50% de vaches gestantes. La fécondation in vitro permet aussi de produire des embryons viande à faible coût pour le transfert sur des races laitières.

La pratique du transfert d'embryons peut donc se vulgariser au point de concurrencer dans une certaine mesure l'insémination artificielle. Pratiquée par un plus grand nombre de praticiens sur le terrain, la transplantation embryonnaire permettra aux vétérinaires de reprendre une part plus importante dans le domaine de la reproduction artificielle, et ceci de manière tout à fait légale. (GUÉRIN P et al. ,1996)

Chapitre I

Rappels Physiologiques

1- EMBRYOLOGIE ET FORMATION DES OVAIRES :

L'origine embryologique des ovaires est mixte (figure1) ; des cellules extra-Embryonnaires (Snow et Monk .,1983 ;Soriano et Jaenisch.,1986 ;Witschi.,1948), dites cellules germinales souches, qui colonisent, après une migration ; Une zone dense de tissu mésenchymateux supramesonéphrotique recouverte d'un épithélium cœlomique. Ces cellules initialement localisées au niveau de la paroi de la vésicule vitelline du fœtus se transforment plus tard en ovogonies. Elles migrent activement le long du mésentère dorsal de l'intestin postérieur pour atteindre la crête génitale. Les facteurs impliqués dans cette migration sont tant mécanique (les rearrangements des tissus en formation-53)

Que chimique (substances chemotactiques d'origine gonadique –58-et fibronectine-18.

Les cellules germinales souches se multiplient au cours de la migration et quelquefois encore après (Erikson.,1966 ; Witschi.,1948 ; Zsebo et al 1990). (Figure2).

Les ovaires résultent de la différenciation spontanée du tissu mésenchymateux recouvrant le mesonéphrose de l'embryon sexuellement indifférencié. Cette différenciation s'opère à partir de la septième semaine de développement. Période à laquelle est accomplie la migration des cellules germinales primordiales dans l'épithélium cœlomique et dans le tissu mésenchymateux recouvrant la région lombaire de l'embryon.

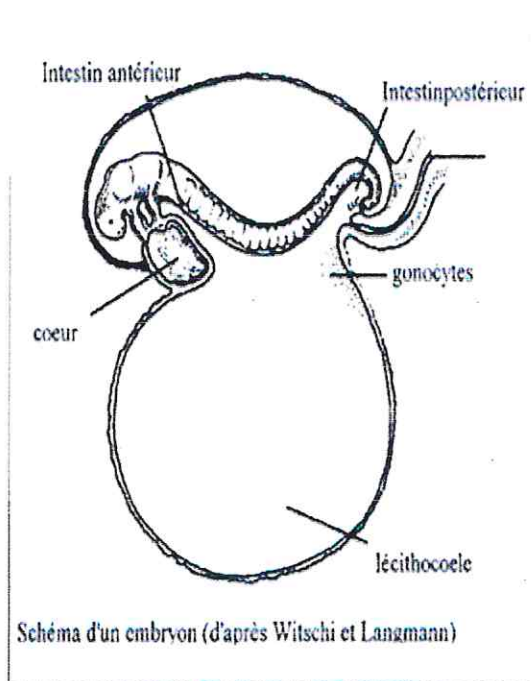


Figure1 : Schéma d'un embryon (d'après Witschi et Langmana., 1948).

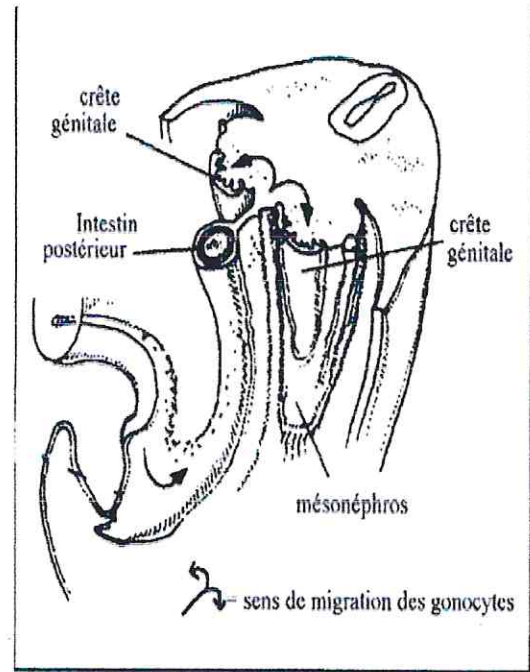


Figure2 : Le sens de migration Des gonocytes. (D'après Witschi et Langmana., 1948).

2-CARACTERISTIQUES ET REGULATIONS DE LA CONSTITUTION DU STOCK FOLLICULAIRE :

Chez la vache, la période de multiplication mitotique des ovogonies s'étend du 45^{ème} au 150^{ème} jour de la vie intra utérine.

Les ovaires de la jeune femelle peuvent contenir deux millions d'ovogonies durant la vie foetale.

Sitôt termine la phase mitotique, ses dernières entamant le processus de méiose qui s'interrompt en prophase 1 et deviennent des ovocytes 1. De ces ovocytes 1, seuls ceux qui s'entourent de quelques cellules folliculaires et d'une lame basale, future membrane de slavjanski, persistent pour former le follicule primordial. Ce phénomène explique que si le nombre d'ovocyte 1 culmine durant la vie utérine, il n'en reste qu'un bien moins grand nombre à la naissance 235000 en moyenne. (Driancourt et al 1991 ; Erickson.,1966).

Ce nombre reste apparemment stable jusqu'à la quatrième année de vie chez la vache puis décline par la suite pour atteindre la valeur de zéro aux envirent de vingt ans d'age. (Erickson., 1996).

La phase d'entrée en méiose des ovogonies se produit bien avant la naissance et se fait de manière spontanée ou, plus vraisemblablement, sous l'influence d'un facteur d'origine mesonéphrotique, dénommé le MIS (meiosis inducing substance) (Westergaard et al., 1985), produit par les cellules du bord interne de l'ovaire. Le contact des ovogonies avec les cellules d'origine mesonéphrotique, conditionne la transformation des premières en ovocytes (Byskov., 1979).

Un autre facteur, l'OMI (oocyte meiosis inhibitor) constitue le facteur responsable de l'arrêt de la méiose et provient des cellules de granuleuse des follicules (Sirard et al. 1989). Il est transmis à l'ovocyte et est responsable du maintien de la concentration élevée en AMPc intra-ovocytaire, facteur responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 3) (Byskov., 1979).

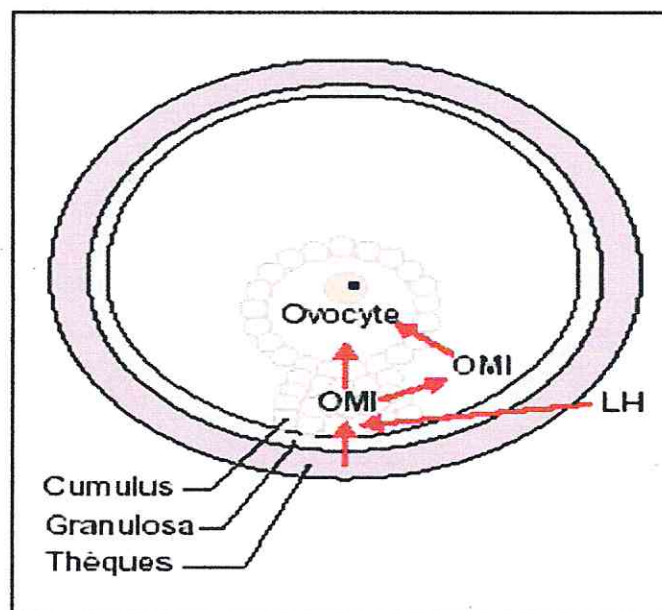


Figure 3 : Schéma hypothétique du blocage méiotique intra folliculaire.
(D'après Kotsuji . F et al ., 1994).

3-FOLLICULOGENESE :

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement folliculaire ovarien, depuis le moment où il sort de la réserve jusqu'au moment de sa rupture à l'instant de l'ovulation ou à son involution (Thibault et Levasseur, 2001). Ce phénomène s'opère de façon continue, puisque chaque jour des follicules entrent dans une phase de croissance.

3-1-HISTOLOGIE DU FOLLICULE :

Chaque follicule ovarien (figure 4) fournit un micro environnement permettant la croissance et la maturation d'un ovocyte (Gordon, 1994). De l'extérieur vers l'intérieur on retrouve les cellules de la thèque externe et interne, de la granulosa et les cellules du cumulus entourant l'ovocyte (Stevens et Lowe, 1997). Le follicule est constitué de deux types cellulaires, soit les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa. Les cellules de la thèque sont des cellules de types fibroblastiques et se divisent en deux couches cellulaires : la thèque externe et la thèque interne. La thèque externe est compacte et traversée de vaisseaux sanguins et n'a pas de fonction sécrétoire. Au contraire, les cellules de la thèque interne sécrètent des stéroïdes (progestérone, androgènes et oestrogènes) (Moore et Trounson, 1977) grâce à un important réticulum endoplasmique lisse et des mitochondries à crêtes tubulaires, ce qui est une caractéristique des cellules synthétisant des stéroïdes (Stevens et Lowe, 1997). Une lame basale contenant du collagène, de la fibronectine, de la laminine et des protéoglycans (Rodgers et al., 1999) sépare les feuillets des cellules de la thèque et de la granulosa. Les cellules de la granulosa ne sont pas irriguées par les vaisseaux sanguins et sont de type épithélial pseudostratifié. Les cellules du cumulus oophorus sont des cellules de type granulosa entourant l'ovocyte qui se sont différenciées et qui constituent une sous-population. Les cellules du cumulus servent à nourrir l'ovocyte (Buccione et al., 1990). La couche de cellules du cumulus (la couche la plus interne) qui est en étroit contact avec l'ovocyte, via des extensions cytoplasmiques se projetant à travers la zone pellucide, forme la corona radiata (Flechon et al., 1986). La corona radiata communique avec l'ovocyte et les cellules du cumulus via des pores appelés jonctions communicantes, « Gap Junctions » (De Loos et al., 1991). Les cellules du cumulus sont, de plus, impliquées dans la modulation d'inhibiteurs de la maturation ovocytaire (Eppig et Downs, 1984; Tsafiriri et al., 1982).

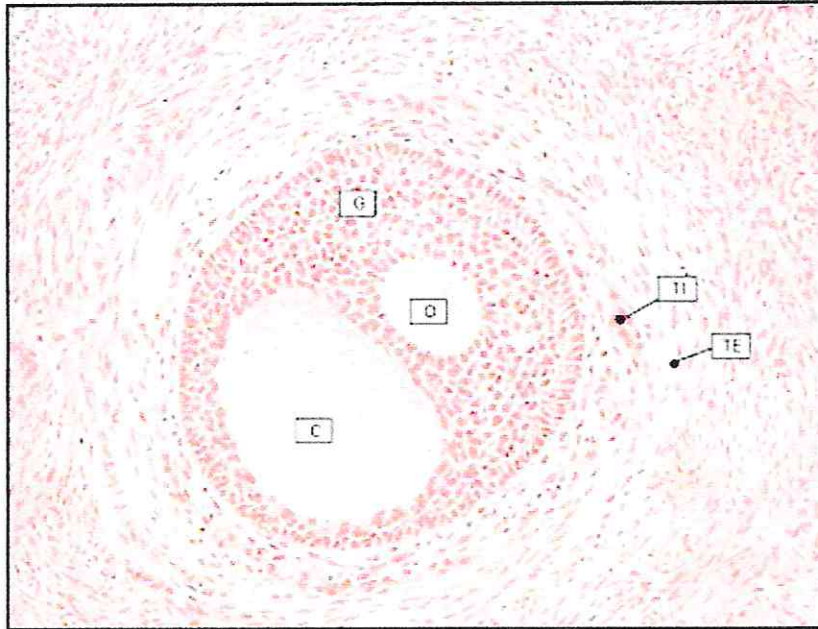


Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe histologique d'un follicule ovarien.

Le follicule ovarien contient différents types cellulaires. TE: Cellules de la Thèque Externe ; TI : Cellules de la Thèque Interne, G : Cellules de la Granulosa : C : Cavité antrale ou antrum ; O : Ovocyte. Figure tirée et adaptée (Stevens et Lowe, 1997).

3-2-ASPECT MORPHOLOGIQUE DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE :

La croissance folliculaire est caractérisée 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 tertiaires et de De Graaf représentant les follicules antraux. (Hulshof et al .,1994). (Figure 5).

a-Le follicule primordial : Centré par l'ovocyte 1, est entouré de cellules folliculaires endothéliiformes. Son diamètre moyen est de 40 µm. Habituellement localisé en périphérie de l'ovaire. L'ovocyte est de diamètre compris entre 20-35µm, se trouve bloquée au stade diplotéine de la prophase I par un polypeptide produit par la granulosa des follicules primaires et secondaires : L'OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor).

b-Le follicule primaire : A ce stade l'ovocyte ne commencera à prendre du volume qu'au moment où il y aura un nombre suffisant de cellules de granulosa, soit environ

40 cellules chez le bovin (Braw-Tal et Yossefi, 1997). C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise, et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse : la zone pellucide. Elle est constituée à 95% de trois glycoprotéines organisés en longs filaments interconnectés, appelées ZP1, ZP2, ZP3. La ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par la ZP1. Seule la ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (YANAGIMACHI, 1994).

c-Le follicule secondaire : Les follicules primordiaux, primaires et secondaires constituent ensemble 95% de la population folliculaire. Les follicules secondaires montrent une activité de divisions mitotiques intensives qui se manifestent par plusieurs couches de cellules de granulosa cubiques, ainsi qu'un ovocyte plus volumineux variant entre 50 et 60 μ M (Hyttel et al., 1997; Russe, 1983). Chez le bovin, les follicules secondaires apparaissent vers le 210^{ème} jour de gestation.

Chez le porc, les premiers follicules secondaires s'observent vers l'âge de la naissance, suivis d'une augmentation graduelle en nombre pour atteindre 30% de la population totale des follicules vers le 90^{ème} jour de vie (Oxender et al., 1979).

d-Le follicule tertiaire (antral) : Les follicules secondaires deviendront tertiaires lorsqu'il y aura formation d'une cavité à l'intérieur du follicule connue sous le nom d'antra (ou antrum). Cette cavité est remplie de liquide folliculaire contenant de l'exsudat du plasma sanguin et de produits sécrétés par les cellules folliculaires. Le stade tertiaire correspond à la phase de recrutement folliculaire. Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante, compris entre 25 et 50. Il dépend du nombre de follicule entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules qui s'atrophient (Armstrong, 1993). Chez le bovin, c'est au 270^{ème} jour de gestation que les premiers follicules antraux apparaissent. Le follicule antral est composé de plusieurs couches de cellules de thèque, d'une membrane basale, d'un épithélium stratifié de cellules de la granulosa et d'un complexe ovocyte-cumulus (COCs). La zone pellucide entourant l'ovocyte est maintenant devenue complète (Braw-Tal et Yossefi, 1997). Des projections de cellules de la corona radiata s'invaginent à la surface de l'ovocyte pour traverser la zone pellucide et former des jonctions communicantes ou gap junctions (Hyttel et al., 1989; Larsen et Wert, 1988). Fur et à mesure que la croissance folliculaire augmente, les jonctions communicantes augmentent en nombre et en dimension (Larsen et Wert, 1988). Cette association permet maintenant l'échange de facteurs régulateurs de la maturation ovocytaire. Il y a aussi modification de la

structure des mitochondries, qui sont devenues en formes de crochets, et augmentation de leur dispersion. Juste avant l'ovulation un espace péri vitellin se forme entre l'ovocyte et la zone pellucide.

Des caractéristiques stéroïdogéniques différentes ainsi qu'une distribution différente des récepteurs démarquent les cellules du cumulus des cellules de la granulosa (Gordon et Lu, 1990). Les cellules de la granulosa possèdent des récepteurs à la FSH, tandis que les cellules de la thèque possèdent des récepteurs à la LH à leur surface. La stéroïdogénèse folliculaire est régulée par ces deux types cellulaires. C'est la théorie des deux cellules-deux gonadotrophines. Les cellules de la thèque produisent des androgènes une fois activés par leur récepteur LH. Les cellules de la granulosa, sous l'influence de la FSH utilisent les androgènes produits par les théques. Les granulosa synthétisent les oestrogènes grâce à l'enzyme qu'elles possèdent, soit l'aromatase, qui transforme l'androstenedione en œstradiol. Les follicules au stade antraux sont devenus dépendants des gonadotrophines (Spicer et al., 1993; Wandji et al., 1992). Les gonadotrophines peuvent influencer le développement des follicules antraux à partir du 60^{ème} jour post natal (Christenson et al., 1985). De plus, les cellules de la granulosa et de la thèque possèdent des sites de liaisons à l'IGF («Insulin Like Growth Factor») (Spicer et al., 1993; Wandji et al., 1992). D'autres facteurs de croissance sont aussi présents dans le follicule tels le TGFβ (Roy et al., 1992; Skinner et al., 1987), l'EGF (Gospodarowicz et Bialecki, 1978; Maruo et al., 1993a) et le FGF (van Wezel et Rodgers, 1996; Wandji et al., 1992). De plus, deux protéines, kit, un récepteur présent sur la membrane de l'ovocyte, et son ligand, kit-ligand, produit par les cellules de la granulosa, sont requises pour la formation de l'antra (Driancourt et al., 2000; Driancourt et Thuel, 1998). Elles joueraient un effet protecteur contre l'apoptose, au stade du follicule pré-antral.

e-Le Follicule mûr ou de De Graaf : Représente la phase terminale du développement folliculaire. Cette phase ne concerne qu'un follicule sur mille entre en croissance (Saumande, 1991). Le follicule mûr se caractérise par une taille maximale de 25mm chez la vache, et de 10mm chez la brebis et la truie, 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 enfermé dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et du 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. Chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0.13mm atteigne la taille préovulatoire. En effet, l'activité mitotique se réduit progressivement pour céder la place à une différenciation cellulaire plus importante.

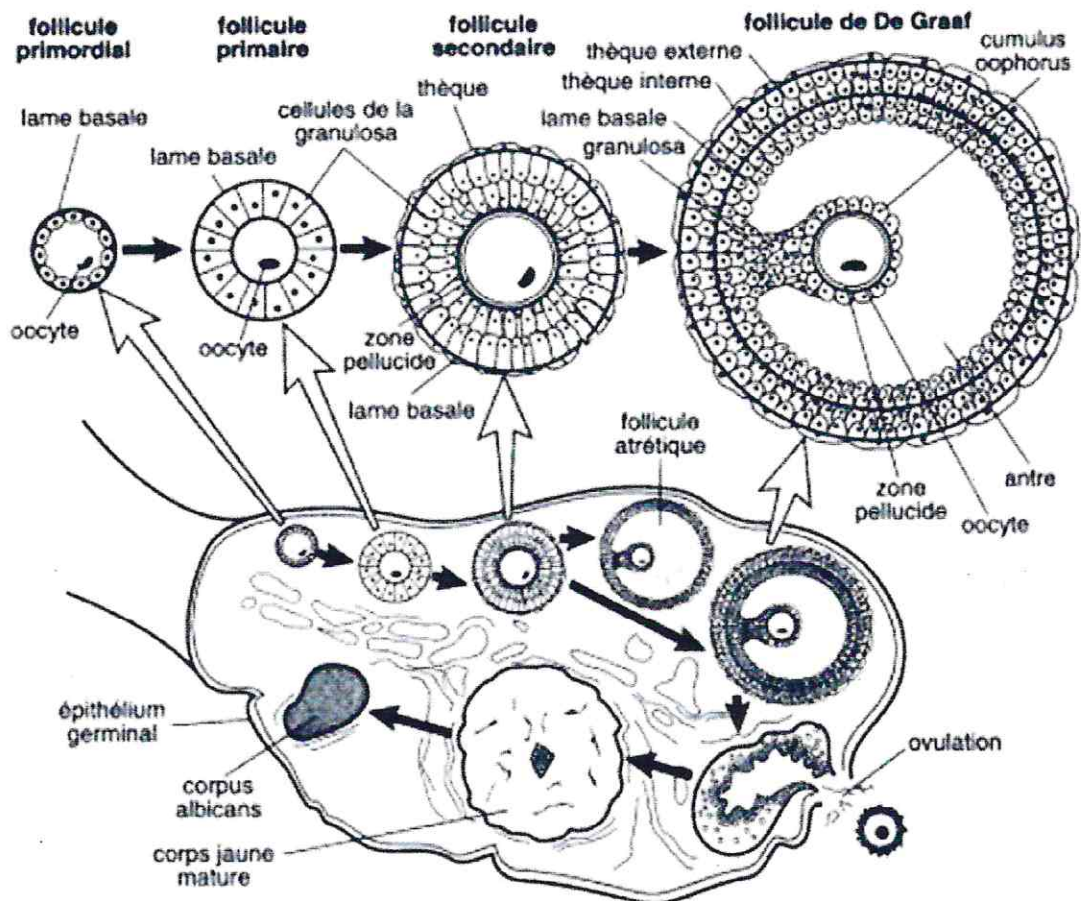


Figure 5 : Représentation schématique d'un ovaire contenant les différents stades de croissance (folliculogénèse) et de régression par lesquels passent les follicules ovariens. (Guénard et al., 1996).

3-3-ASPECT CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE :

Les points forts de la croissance folliculaire concernent sa durée (5 mois chez la vache), le faible nombre de follicules qui parviendront jusqu'à l'ovulation ainsi que le parallélisme qui s'installe entre la croissance du follicule et l'acquisition de la compétence ovocytaire.

3-3-1-NOMBRE DE FOLLICULES ENTAMANT LEUR CROISSANCE ET DURÉE DE LA FOLLICULOGENÈSE :

Seule une très faible proportion des follicules stockés dans l'ovaire entamera sa croissance. Plus de 99% des follicules primordiaux seront voués à l'atrésie, c'est à dire dégèneront sans avoir pu évoluer jusqu'à l'ovulation, ce qui ne signifie pas qu'ils n'entament pas leur croissance. L'âge, l'espèce et l'importance de la réserve influence le nombre de follicules quittant quotidiennement la réserve (Driancourt et al., 1985 ; Gougeon., 1982 ; Hage et al., 1978).

Chez le bovin, peu après la naissance, 50 à 80 follicules primordiaux quittent la réserve chaque jour. Ce nombre augmente alors jusqu'à 120 par jour puis décline par la suite pour se stabiliser aux alentours de 80 par jour à la puberté (Erickson., 1966).

Chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0.13mm atteigne la taille pré ovulatoire (Lussier et al., 1987).

3-3-2-NOTION DE VAGUE DE CROISSANCE FOLLICULAIRE :

a -Principe :

Chez les mammifères domestiques, la croissance folliculaire se distingue en 3 phases (figure 6): soit la phase de recrutement, la phase de sélection et la dominance folliculaire (Ginther et al., 2001). Par exemple, chez la vache et la jument, ces phénomènes se produisent de façon continue et génèrent ce que l'on appelle des «vagues folliculaires». Une vague de croissance folliculaire est le développement synchrone d'un groupe de follicules à des temps différents, d'où le nom de vagues. Récemment, une étude suggère qu'il semblerait y avoir existence de vagues folliculaires chez l'espèce humaine (Baerwald et Pierson, 2004). Notez que chez l'espèce porcine, il n'y a pas de vague folliculaire (Driancourt, 2001). Par contre chez la vache chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules de diamètre égal ou supérieur à 5 mm parmi lequel apparaîtra le follicule dominant.

Habituellement, un cycle ne comporte que 2 ou 3 vagues (avec des extrêmes de 1 à 4), le follicule ovulatoire étant issu de la dernière vague (Ginther et al 1989 ; Driancourt.,1991). Si 3 vagues sont observées (et chaque vague comporte un follicule dominant), elles débutent en règle générale aux jours 2,9 et 16 du cycle, si celui-ci n'en comporte que 2, elles apparaissent alors aux jours de 2 et 11 du cycle (Ginther et al ., 1989).

Cette variation du nombre de vague explique la variation de la longueur des cycles parfois observée, les régulations en jeu impliquant des facteurs génétiques, nutritionnels ou paracrines. (Fortune., 1994).

Ce schéma de croissance folliculaire a également été décrit lors d'autres états physiologiques telle la période pré pubertaire (Hopper et al., 1993) et le post partum (Savio et al., 1990). Il en est de même durant les 45 à 70 premiers jours de la gestation (Savio et al 1990), durant lesquels, malgré la présence d'un corps jaune, l'émergence de vague de croissance folliculaire est observée.

b-Phase de recrutement :

C'est en 1980 que Di Zerega et Hodgen ont, pour les primates proposés des concepts de « recrutement, sélection et dominance."

Leurs études histologiques in vitro ont par la suite été confirmées in vivo chez la vache par échographie et chez la brebis par marécage à l'encre des follicules.

Chez les primates comme chez les mammifères domestiques, FSH constitue le signal endocrinien impliqué dans le recrutement ;

1- Dans presque toutes les espèces étudiées, il existe un synchronisme presque parfait entre le niveau FSH élevé et le recrutement.

2- L'administration de liquide folliculaire riche en inhibine au moment du recrutement déprime le niveau de FSH et bloque le recrutement.

3- Chez des femmes hypogonadotrope, de singe ou des brebis rendues hypogonadotrope par administration d'un antagoniste (ou d'un agoniste) de la GnRh, l'administration de la FSH (pure ou recombinante) est capable d'initier une croissance folliculaire terminale.

Chaque individu présente un niveau seuil de FSH en dessous duquel le recrutement n'est pas induit. Des variations limitées de FSH 30 à 50 % au tour de ce niveau seuil déclenchent ou non le recrutement. Il est également probable que pour un individu donné, tous les follicules ne présentent pas les mêmes seuils. Les conséquences de cette hétérogénéité fonctionnelle sur le devenir de chaque follicule (dominant ou atretique) sont évidentes ; Le potentiel de survie

et de développement d'un follicule ayant des besoins limités en FSH est très supérieur à celui d'un follicule beaucoup moins sensible.

Les effets de FSH sont triples ; -Induction d'une activité aromatasase.

-Stimulation de la production d'inhibine et de folistatine,
(Protéine qui lie l'activine. La balance inhibine/activine du liquide folliculaire évolue alors en faveur de l'inhibine.

-L'inhibine de l'expression d'une des protéines de liaison des IGFs, L'IGFBP2, dans les cellules de granulosa chez la vache, se qui contribue à augmenter la biodisponibilité des IGFs pour les cellules folliculaires. L'IGF-I et la folistatine pourraient moduler l'action de FSH sur le recrutement : L'IGF-I augmente la taille de la cohorte recrutée, alors que la folistatine la réduit. (Driancourt, 2001).

c-Phase de sélection :

La sélection, fait référence au processus par lequel parmi les nombreux follicules en croissance, seuls arriveront au stade préovulatoire en nombre caractéristique de l'espèce ou de la race. Cette notion trouve sa confirmation dans la constance du nombre d'ovulations malgré la diversité quantitative et qualitative de la population folliculaire entre individus.

Cette phase, la sélection qui caractérise par une diminution de la concentration de la FSH et par une augmentation progressive de la synthèse d'œstradiol, résultat de l'augmentation de la fréquence des décharges pulsatiles de l'hormone LH responsable de la synthèse accrue d'androgène par la thèque interne (Driancourt et al., 1991a). L'augmentation de l'œstradiol est plus précisément du rapport entre œstradiol et androgènes constitue une caractéristique de la dominance fonctionnelle du follicule en croissance (Sunderland et al., 1994). On observe également une augmentation dans le liquide folliculaire de la concentration en inhibine.

La rétroaction de l'inhibine et de l'œstradiol sur la FSH, variable selon les espèces, entraîne la réduction de synthèse de la FSH et est responsable du processus de sélection. Ainsi, 1 à 5 jours après le recrutement, les concentrations en FSH atteignent des valeurs inférieures à celles induisant le recrutement, celui-ci s'arrête et l'excède de follicules s'atrophie (Driancourt et al., 1994 a).

d- Phase de dominance :

Il n'y a plus de recrutement lors de la phase de dominance. Chez toutes les espèces, le follicule sélectionné pour être dominant semble être celui qui développe en premier les récepteurs à la LH en surface de ces cellules de la granulosa (Xu et al., 1995). Les récepteurs à la LH sur les granulosa apparaissent lorsque les follicules ont atteint 5 à 6 mm (Driancourt, 2001). La diminution de FSH serait engendrée par la sécrétion de facteurs de rétrocontrôles négatifs par le follicule dominant tel l'inhibine et l'œstradiol. Ces facteurs associés à la baisse de FSH empêcheraient le développement des follicules subordonnés par le follicule dominant (Fortune, 1994). Des facteurs de croissance, des protéines de liaisons tels les IGFs (IGFBP-2, -4, -5) (Besnard et al., 1997; De la Sota et al., 1996) ainsi que l'activine joueraient un rôle dans la sélection et la dominance folliculaire (Roche, 1996). Suite à une forte élévation des gonadotrophines, si le follicule dominant se développe en synchronie avec la phase folliculaire du cycle œstral (ce qui est obligatoire chez la truie et la femme), il s'ouvrira et libèrera l'ovocyte : c'est l'ovulation. Sinon il rétrogradera par atrophie.

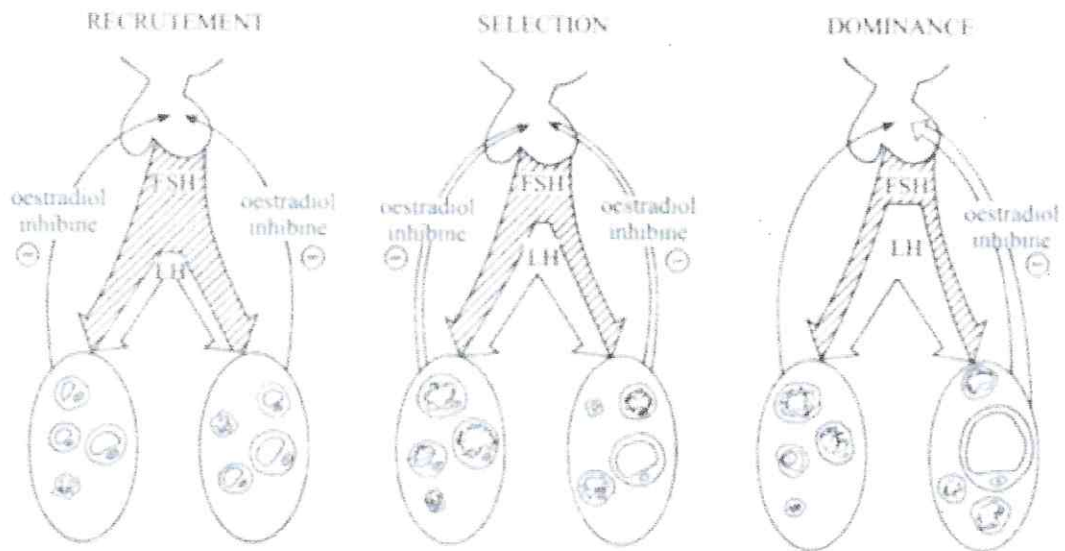


Figure 6 : Sécrétion de gonadotrophines et de facteurs de contrôle au cours des phases de recrutement, de sélection et de dominance.

Légende : L'épaisseur des flèches démontre l'importance de chaque sécrétion.

Figure tirée et adaptée de Thibault et Levasseur, 2001

3-4- OVOGENESE :

L'ovogenèse représente un mécanisme très spécialisé et complexe chez les mammifères. L'ovogenèse évoque l'ensemble des événements pour la production du gamète femelle. Elle fait intervenir la différenciation des cellules germinales primordiales (CPG), leur développement en ovocytes dans les follicules jusqu'au stade final de l'ovulation. L'ovaire de mammifère contient une énorme réserve d'ovocytes qui se forme au cours de la vie fœtale (Driancourt et al., 1991), dont le nombre est fixe à la naissance et s'abaisse au cours de la vie de l'animal (figure07). Récemment, une étude a suggéré la possibilité qu'il existerait un renouvellement des ovocytes chez les mammifères (Johnson et al., 2004).

a-Les cellules germinales primordiales :

Les ovocytes résultent d'un petit nombre de cellules souches connues sous le nom de cellules germinales primordiales. Les CPG représentent l'unique source de cellules germinales qui permettront la continuité de l'espèce. Les CPG subiront des transformations successives pour devenir ovogonies, puis ovocytes et finalement des ovules. L'ultra structure des CPG est très simple. Elles contiennent quelques mitochondries, des ribosomes, un petit appareil de Golgi ainsi qu'un réticulum endoplasmique dispersé (Russe, 1983).

Les cellules germinales entreront dans un cycle de division mitotique intense du 13^{ème} jour embryonnaire jusqu'à environ 7 jours après la naissance. Le nombre de CPG augmente drastiquement allant de 5 000 au 20^{ème} jour p.c. pour atteindre un sommet de 1100 000 cellules déjà au 50^{ème} post-coït (Black et Erickson, 1968). Ensuite, l'activité mitotique cessera brutalement et l'apoptose augmentera graduellement dans les CPG pour abaisser la population totale aux alentours de 500 000 à la naissance. Le nombre de CPG dans les fœtus de porc décroît de 70 % à partir du 50^{ème} jour post-coït au 300^{ème} jour de vie (Guthrie et Garrett, 2001). Une fois établies dans l'ovaire en développement, les CPG commenceront à se différencier pour devenir ovogonies.

Il est établi depuis longtemps que les mammifères perdent la capacité à renouveler leurs CPG pendant la vie fœtale. Ce dogme, qui stipule que le nombre de cellules germinales (ovocytes) est fixe à la naissance (réserve ovarienne) et diminue au cours de la vie, est maintenant révolu. Récemment, il vient d'être montré chez des souris juvéniles et adultes qu'il existerait une mitose active de CPG dans les ovaires (Johnson et al., 2004). Cette étude montre que l'ovaire aurait besoin de répliquer ses CPG pour assurer le renouvellement folliculaire et ovocytaire. En effet, sans la répllication de ces CPG, un calcul, entre le nombre

de cellules présentes initialement et le taux de disparition de celles-ci, propose que la réserve ovarienne serait totalement épuisée en quelques semaines seulement. D'autres études sont cependant requises pour confirmer ce fait chez les autres espèces de mammifères.

b-Les ovogonies :

Les ovogonies sont les cellules qui donneront naissance à tous les ovocytes dans l'ovaire (Russe, 1983). Les cellules germinales demeurent attachées par des ponts intercellulaires et forment ainsi des agrégats cellulaires. On peut maintenant distinguer 2 types de cellules germinales. D'une part, un groupe de cellules se divisera par mitose pour donner la lignée de cellules ovogoniales. D'autre part, le second groupe restera en interphase. Il sera appelé plus tard à se diviser pour permettre l'apparition de nouvelles lignées d'ovogonies. Le nombre de mitose ovogoniale est synchronisé, limité et permis par des ponts intercellulaires (Russe, 1983). Les ovogonies ont une ultra structure semblable aux CPG. Elles détiennent un peu plus de mitochondries et un réticulum endoplasmique plus développé. De plus, elles semblent avoir plus de ponts intercellulaires que les CPG (Russe, 1983).

c-Ovocyte : morphologie.

L'ovocyte (ovule immature) est l'unité de développement fondamental des ovaires de mammifères. Le début de la croissance des ovocytes est apparemment régulé que par des facteurs ovariens et n'est pas d'origine gonadotropique (Peters et al., 1975). L'ovocyte est entouré de cellules du cumulus elles-mêmes entourées de cellules de granulosa. La première couche de cellules du cumulus qui est accolée à la zone pellucide forme la *corona radiata* (De Loos et al., 1994). Certaines évidences démontrent l'importance des interactions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus via des jonctions communicantes (Mori et al., 2000). Ces jonctions permettraient l'apport de nutriments et de substrats pour favoriser la croissance ovocytaire. La zone pellucide, tant qu'à elle, servira à l'interaction de liaison grâce à ces glycoprotéines de surfaces. Les ovocytes sont éliminés et par la phagocytose des cellules somatiques environnantes (Beaumont et Mandl, 1962). Le mécanisme responsable du maintien de l'arrêt méiotique pour une longue période de temps (jusqu'à 40 ans chez la femme) demeure encore inconnu aujourd'hui.

d- Ovulation :

L'ovulation est l'étape ultime où le follicule dominant de la phase folliculaire du cycle œstral libère son ovocyte pour la fécondation. Suite au pic de LH (hormone lutéinisante) relâchée par l'adénohypophyse, l'ovulation se manifeste ultérieurement selon un temps caractéristique à l'espèce, soit de 41-43 h chez la truie, 35-36 h chez la femme, 29-31 h chez la vache, 12-13 h chez la souris et 11-12h chez la lapine (Thibault et Levasseur, 2001). L'ovulation dure de 1 à 3 heures chez l'espèce porcine (Soede et al., 1992). Il y a appel d'eau vers l'intérieur du follicule (œdème) dû à l'acide hyaluronique produit par les cellules du cumulus en réponse à la décharge ovulatoire. Durant le processus, il y a une activité protéolytique intense qui s'accomplit. Le tissu conjonctif de l'apex folliculaire se dissocie, rendant la région sensible à la rupture (Reed et al., 1979). L'ovocyte présente aussi un nombre limité de micro villosités à sa surface (Flechon et al., 1986). Les mitochondries sont ovoïdes et l'appareil de Golgi est situé près du noyau. Les ribosomes sont rarement associés au petit réticulum endoplasmique des thèques, provoquant ainsi un encombrement et étire la membrane basale soutenant les cellules de granulosa, provoquant ainsi le relâchement de l'ovule (Reed et al., 1979).

e-La méiose :

La méiose est la division cellulaire d'une cellule diploïde ($2n$) se produisant exclusivement chez les cellules sexuelles (gamètes), pour la formation de cellules haploïdes ($1n$) (Lodish et al., 2001). Suite à la réplication de l'ADN, il y a deux divisions successives. La première division est dite réductionnelle. C'est la séparation des homologues : le matériel génétique se divise de $4n$ à $2n$. La seconde division est dite équationnelle. C'est la séparation des chromatides sœurs (chromosomes dupliqués), soit la division ($2n$) en nombre de cellules possédant le même bagage génétique ($1n$) (Lodish et al., 2001).

-Méiose ovocytaire :

Les stades de la méiose commencent pendant la vie fœtale et se rend jusqu'au stade diplotène (voir les étapes plus loin) dans l'ovaire (Tsafriri et Dekel, 1994). L'ovocyte progressera jusqu'au stade de la prophase-I et s'arrêtera (stade dictié) pendant plusieurs années. Ce stade, le noyau de l'ovocyte (chromatine) forme la vésicule germinale (GV) caractérisée par une membrane nucléaire visible. Pendant la prophase de la première division méiotique, les chromosomes passent à travers différents stades de division (Lodish et al., 2001). Lors de la prophase de cette première division méiotique, la membrane nucléaire demeure intacte. Apparaissent par la suite les sous-phases de leptotène, zygotène, pachytène

2001). Lors de la prophase de cette première division méiotique, la membrane nucléaire demeure intacte. Apparaissent par la suite les sous-phases de leptotène, zygotène, pachytène et diplotène. Cette classification est basée sur la condensation de la chromatine. Au stade leptotène, il y a acquisition d'un axe protéique sur chaque chromosome qui devient visible en raison de sa condensation. L'ovocyte poursuit donc son chemin au stade zygotène. Grâce à l'axe protéique, les chromosomes homologues s'apparient pour former des chromosomes bivalents. Chacun de ces chromosomes est composé de deux chromatides (Lodish et al., 2001). L'appariement des chromosomes bivalents résulte donc en quatre chromatides. Une fois l'appariement terminé, le stade pachytène débutera. Il s'agit en fait de l'apposition de chaque chromosome homologue (nommé «crossing over») permettant l'échange de petits bouts de chromatides (Lodish et al., 2001). Ce «crossing over» se caractérise par la séparation des chromatides et de leur raccourcissement. Le début de ce dé complexification annonce le stade diplotène. L'ovocyte maintiendra alors son stade de vésicule germinale (GV) durant plusieurs années.

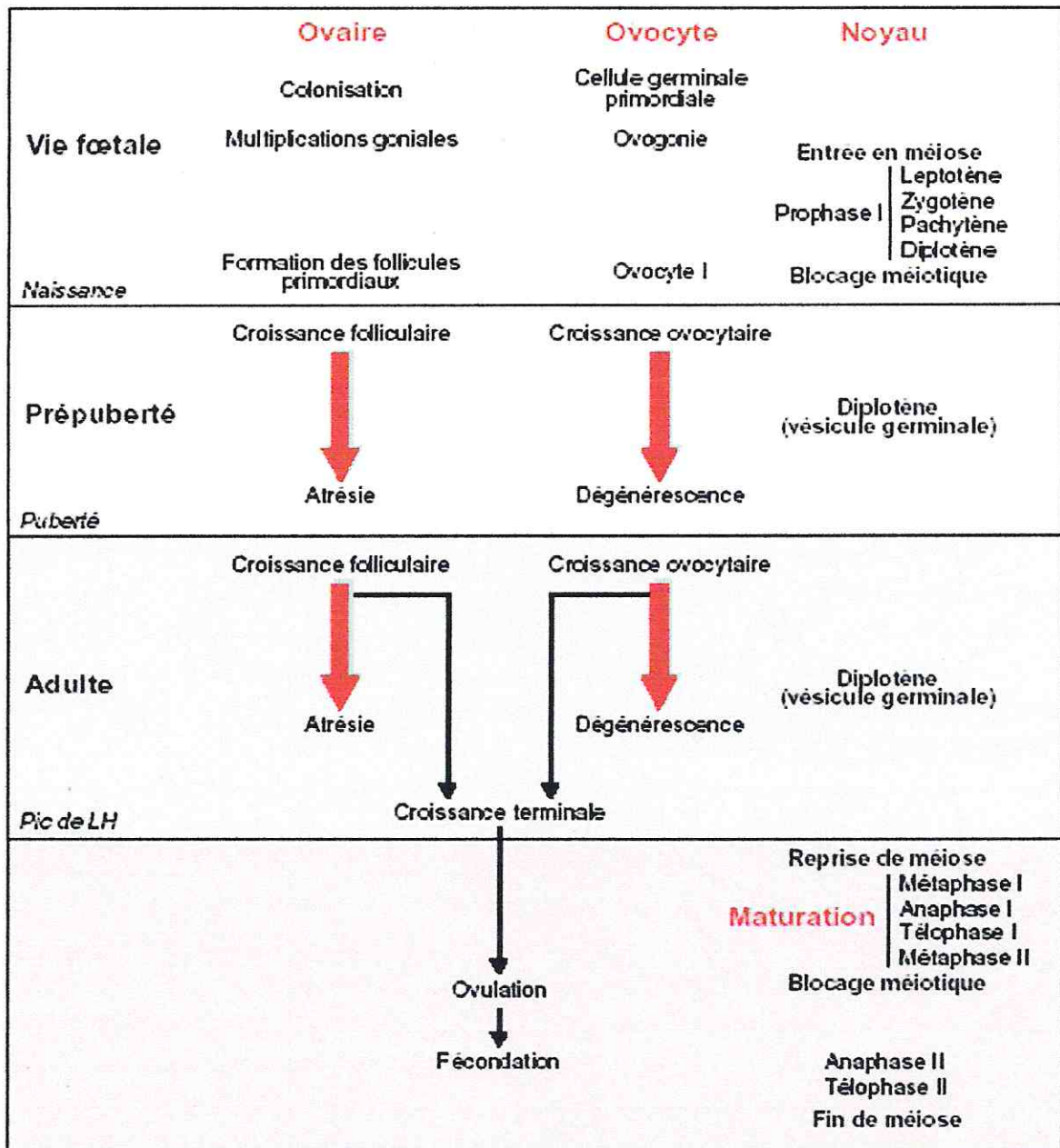


Figure 7 : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à la fécondation. (D'après Gosden R et al., 1997)

4-L'ATRESIE FOLLICULAIRE :

La majorité des follicules sont voués à l'involution (ou atresie folliculaire), soit 99.9 % (Gordon, 1994). L'atresie se définit comme étant la régression du follicule jusqu'à sa disparition dans le stroma ovarien (Thibault et Levasseur, 2001). L'atresie folliculaire est le processus normal qui permet d'éliminer les cellules inutiles, qui ne se sont pas développées correctement et/ou qui sont endommagées (Guthrie et al., 1995). Pour définir l'atresie folliculaire, deux types de critères sont généralement utilisés, soit les critères morphologiques tels la taille du follicule, le nombre et l'aspect des cellules de la granulosa, nombre de pycnoses (point noir de nécrose), soit des critères fonctionnels telle la production d'œstrogène, androgène et de progestérone, liaison de LH et FSH sur les récepteurs. Le mécanisme le plus probable par lequel l'atresie opère est l'apoptose (Hirshfield, 1991; Tilly, 1996). Environ 55% des follicules antraux iront vers la dégénérescence de façon normale, alors que 15% des follicules survivront exceptionnellement lors des 3 jours précédant l'œstrus (Guthrie et Garrett, 2001). L'atresie folliculaire qui se produit au cours de ces 3 jours a été associée à la baisse de 60 à 70% du taux de sécrétion de FSH (Guthrie et Garrett, 2001). Au maximum de son involution, le follicule antral s'écrase sur lui-même et va rejoindre les fibres conjonctives.

Le premier signe observable d'atresie se manifeste tout d'abord dans les cellules de la granulosa. Dans les granulosa, l'apoptose est associée à une diminution de la différenciation cellulaire ainsi qu'à une baisse de production de d'œstradiol et d'inhibine. Les granulosa dégénèrent et perdent ainsi leur activité aromatasase (aromatasase P450), pour finalement entrer en apoptose (Garrett et Guthrie, 1997). La perte de l'activité s'étend ensuite aux cellules de la thèque, diminuant ainsi leur production d'androgènes et d'œstradiol (Driancourt et al., 1991; Maxson et al., 1985). Au niveau stéroïdogénique, bien qu'un follicule atresique comporte des niveaux moindres d'œstrogène qu'un follicule sain, il possède des niveaux beaucoup plus élevés de progestérone (Guthrie et al., 1994). Quant à l'ovocyte, il n'est affecté que pendant les dernières étapes de l'atresie folliculaire (Driancourt et al., 1991). De plus, il a été démontré que la croissance et le taux de survie des follicules préantraux et des ovocytes étaient meilleurs s'ils étaient co-incubés *in vitro* avec des cellules du cumulus provenant de follicules antraux (Wu et al., 2002b).

L'apoptose nécessite la régulation de certains gènes spécifiques, tels que Bcl-2, BAX, Bcl-x ainsi que des membres de la famille des caspases (Guthrie et Garrett, 2001; Tilly

et al., 1995). L'atrésie folliculaire implique plusieurs événements importants tel un clivage internucléosomique de l'ADN par les endonucléases (Arends et al., 1990), une condensation de la structure nucléaire, une diminution du contenu protéique et une réduction du volume cellulaire (Darzynkiewicz et al., 1992; Desoize et Sen, 1992; Guthrie et al., 1994). Plusieurs facteurs ont été démontrés comme étant anti-apoptiques tels le bFGF, le TGF α , l'EGF (Chun et al., 1994; Tilly et al., 1992; Tilly et Hsueh, 1993), ainsi que les gonadotrophines FSH et LH (Chun et al., 1996; Tilly et Tilly, 1995).

5/ASPECT REGULATEUR DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE :

A une phase de croissance folliculaire indépendante de la présence de gonadotropines endogènes, succède une phase de croissance gonadotrope -dépendante. Différentes substances peptidiques interviennent (inhibine, activine, follistatine), de même que des facteurs de croissance. En fin, l'état physiologique (gestation, post-partum, lactation, bilan énergétique) est impliqué pour une grande part dans le déroulement ou la reprise des cycles.

5-1-DETERMINISME DE L'ENTREE EN CROISSANCE. PHASE GONADOTROPE INDEPENDANTE :

Les facteurs responsables de l'entrée en croissance des follicules primordiaux sont encore mal connus. L'importance du pool des follicules primordiaux influence le nombre de follicules le quittant chaque jour. Ainsi, la diminution du stock de réserve avec l'âge est concomitante d'une baisse du nombre de follicules entamant chaque jour leurs croissances (Henderson et Edwards., 1968). Des expériences d'hypophysectomie (Dufour et al., 1979), d'injection à long terme d'agonistes de la GnRH (inhibition de la libération de l'hormone folliculostimulante FSH (Webb et al., 1994)) n'empêchent pas les follicules d'évoluer jusqu'à une taille de 2mm chez la brebis, voir 6 à 7 mm chez la vache. De même, l'injection de gonadotropine exogène ne modifie pas le nombre de follicules entrant en croissance. Ainsi, le développement du follicule jusqu'à ces tailles respectives, semble être indépendant de la présence des gonadotropines FSH et LH. Bien qu'indispensables, en synergie avec d'autres facteurs, à la croissance de follicules à partir du stade secondaire et aux stades précoces de développement de l'ovocyte, les gonadotropines et surtout le taux basal de FSH (Hage et al., 1978), semblent à ce moment être plus responsables de la régulation des capacités de synthèse et de maturation des cellules de la granulosa que de la croissance du

follicule proprement dite (Driancourt et al., 1991). Un facteur produit par les follicules atretiques semble plus être responsable de la diminution du nombre de follicules entament leur croissance (Peters et al., 1973).

D'autres facteurs influencent le nombre de follicules quittant chaque jours la réserve, l'état corporel de l'animal, la quantité et la qualité de son alimentation et l'étape de cycle de reproduction qu'il franchit (post-partum p.ex.).

5-2-PHASE GONADOTROPE DEPENDANTE :

Arrivés à un diamètre de 5mm (brebis (Dufour et al ., 1979) et 4mm (vache (Moser et al., 1989), le développement des follicules passe d'une croissance de type continu (folliculogénèse tonic) (Driancourt. ,1991) a une croissance de type cyclique dépendante des variations du taux des gonadotropines.

De multiples expériences ont démontré que la croissance folliculaire est le résultat d'interactions existant entre les hormones gonadotropes LH et FSH d'origine hypophysaire et les substances polypeptidiques présentent dans le follicule (inhibine, activine, follistatine =FSP, gonadotrophinsurge-inhibiting/attenuating factor =GnS I/AF). L'effet de ces substances est indirecte : elles exercent une retro action négative au niveau hypophysaire. Elles pourraient également exercer une action directe au niveau ovarien (Findlay., 1993).

6/ REGULATION DU CYCLE OESTRAL :

Le schéma ci après présent la régulation du cycle oestral chez la vache.

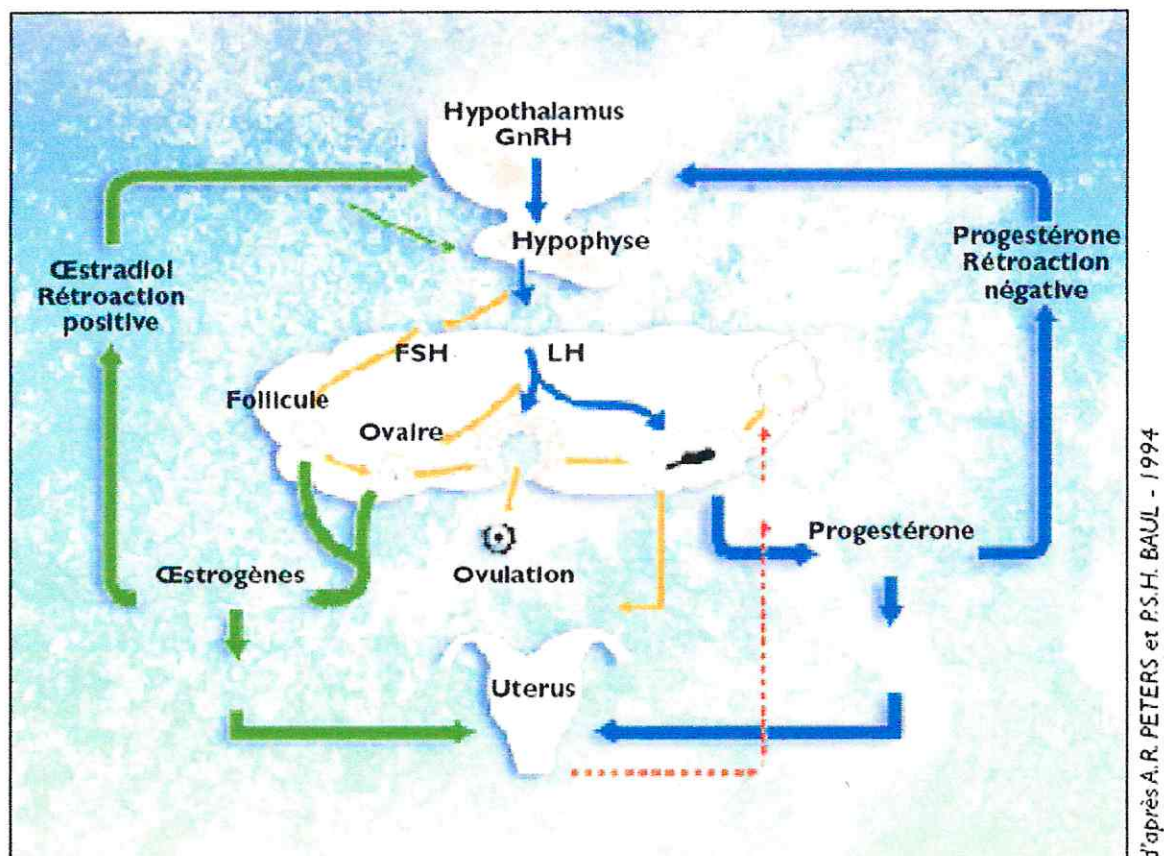


Figure 8 : Mécanisme de la régulation du cycle oestral chez la vache (d'après A.R.PETERS et P.S.H. BAUL. 1994)

Chapitre II

Fécondation

In

Vitro

1-INTRODUCTION :

Les technologies de la reproduction, appliquées aux animaux de rente depuis

Trente ans, sont à l'origine d'un important progrès génétique. L'insémination artificielle et le transfert d'embryons ont considérablement modifié les méthodes de reproduction et ont permis la mise en place de schémas de sélection chez les bovins. Sachant que l'insémination artificielle ne permettra la production dans le meilleur des cas que d'un seul veau par an et par vache. Ces objectifs génétiques ont été à la base du développement des biotechnologies de la reproduction telles que MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) ou la fécondation in vitro (FIV).

La méthode dite MOET implique le traitement des animaux avec des hormones gonadotrophiques (PMSG, FSH). Ces traitements de super ovulations ont ainsi permis d'augmenter de 1 à 10 le nombre d'ovules libérés par cycle. Répétable en moyenne cinq fois par an et par vache, cette procédure n'est cependant pas exempte d'inconvénients puisqu'en effet, elle allonge de deux mois environ le délai nécessaire à l'obtention d'une gestation et peut s'accompagner, surtout si elle est répétée chez le même animal, de réactions iatrogènes ou de kystes ovariens voir d'infections utérines.

Estimée à 100000 ovocytes, la réserve ovocytaire ne conduit en fait à la production moyenne que d'une centaine d'embryons sur la vie d'un animal soumis à des traitements de super ovulation et récolte d'embryons. Il existe donc un gaspillage énorme du potentiel génétique femelle susceptible d'être mis à profit pour la production d'embryons. C'est pourquoi furent mises au point des techniques de récupération d'ovocytes et des méthodes de fécondation in vitro. Celles-ci apparaissent d'autres plus justifiées que différentes recherches sont venues confirmer la continuité du processus de croissance folliculaire sous forme de vagues tant chez les animaux gestants que non gestants. La fécondation in vitro est une approche plus récente qui offre un vaste champ d'applications.

Chez les mammifères, la fécondation est interne : les gamètes se rencontrent dans l'oviducte de la femelle. La FIV ou fécondation extra corporelle consiste à mettre en présence spermatozoïdes et ovocytes dans un milieu artificiel. Cependant, les gamètes ne peuvent fusionner que s'ils ont subi une maturation préalable. L'ovocyte mature peut être récolté par ponction aspiratrice du follicule préovulatoire. Les spermatozoïdes éjaculés ne sont pas féconds, ils doivent être maturés (capacités) in vitro. (HANZEN. ,2004)

2-HISTORIQUE DE LA FECONDEATION IN VITRO :

Dans l'espèce humaine, le premier enfant né après fertilisation in vitro d'un ovocyte fut Louise Brown en juillet l'an 1978 à Oldham. Depuis lors bien des progrès ont été accomplis dans cette espèce. Ils se sont accompagnés de la création dans les divers pays de comités d'éthique.

Le premier veau né après maturation in vitro (MIV), fécondation in vitro (FIV) et transfert non chirurgical de l'embryon ainsi obtenu est né en 1981. C'est cependant au cours des années suivantes que se développe la fécondation in vitro d'ovocytes prélevés sur des ovaires obtenus après abattage des animaux, les ovocytes étant récupérés soit par aspiration du liquide folliculaire, par section de l'ovaire en tranche ou par dissection. Cette méthode de collecte des ovocytes est encore largement utilisée dans le cadre de recherches fondamentales sur la fécondation in vitro ou plus occasionnellement dans le cas d'animaux reformés pour des raisons sanitaires ou abattus d'urgence. Elle permet en moyenne l'obtention de 25-30 pour cent d'embryons transférables. Irréversible, elle n'est par ailleurs pas exempte de difficultés liées non seulement à l'état sanitaire ou au statut génétique de l'animal donneur prélevé à l'abattoir mais également à la méthode de prélèvement qui interrompt de manière brutale et parfois prolongée les mécanismes physiologiques et biochimiques président au développement ovocytaire, le caractère irréversible du prélèvement in vitro et son intérêt génétique limité ont conduit à la mise au point de méthodes laparoscopique ou échographique offrant la possibilité d'un prélèvement d'ovocyte in vivo. La laparoscopie ventrale, paralombaire ou transvaginale a été expérimentée dans l'espèce bovine. Elle est applicable de manière répétée sur le même individu et n'entraîne qu'occasionnellement des complications péritonéales telles que des adhérences. Son utilisation hebdomadaire voire bihebdomadaire ne peut selon certains auteurs être prolongée plus de 5 semaines. Bien qu'elle permette chez la vache d'obtenir un pourcentage de récupération des ovocytes compris 50-85 pour cent, elle a pour des raisons pratiques tel que mise à jeun de l'animal, la nécessité d'induire une distension abdominale (l'allongement de l'intervalle entre deux ponctions...), été progressivement remplacés par des méthodes de ponction ayant recours à l'échographie. D'abord utilisé par voie transcutanée au niveau de la région sacroischiatique, la ponction échoguidée des follicules ovariens (OPU) est communément utilisée à l'heure actuelle par voie transvaginale chez la vache. (HANZEN, 2004)

La première fécondation in vitro chez les mammifères.	FIV avec maturation ovocytaire in vivo et capacitation in vivo (Lapin).	1954
	La première naissance (Lapin).	1954-59
	Capacitation in vitro (Hamster).	1959
	FIV avec maturation ovocytaire in vitro (Lapin).	1963
Fécondation in vitro et production d'embryon in vitro chez les bovins.	FIV avec maturation ovocytaire in vivo.	1973
	Première naissance.	1980
	FIV avec maturation ovocytaire in vitro.	1982
	Première naissance après maturation in vitro et fécondation in vitro.	1985
	FIV avec utilisation de sperme congelé.	1986
	Obtention d'un développement pre-implantatoire in vitro.	1988
	Utilisation de l'héparine.	1988
	Ovum Pick Up	1988
	Première naissance après transfert d'un embryon congelé produit in vitro.	1990

Tableau 1 : Un bref historique de la FIV chez les mammifères et de la production in vitro d'embryons bovins. (D'après : P.GUERIN et al., 1996)

3-LES ETAPES DE LA FECONDATION IN VITRO :

La fécondation in vitro permet aujourd'hui de produire des embryons à partir d'ovocytes prélevés dans les ovaires des bovins, soit après l'abattage, soit par ponction sous control échographique (OPU).

Les ovocytes sont ensuite maturés puis fécondés au laboratoire, les embryons ainsi obtenus sont cultivés pendant sept jours jusqu'à leur transfert dans une receveuse ou leur congélation. Des essais de transfert sur vache repeat breeding ont été réalisés par différentes équipes en France et Angleterre. Les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de cette technique dans le traitement des vaches infertiles : 38-50% de vaches gestantes. La FIV permet aussi de produire des embryons viande à faible coût pour le transfert sur des races laitières.

La pratique de transfert d'embryons peut donc se vulgariser au point de concurrencer dans une certaine mesure l'insémination artificielle. Pratiquée par un grand nombre de praticiens sur le terrain, la transplantation embryonnaire permettra au vétérinaire de reprendre une part plus importante dans le domaine de la reproduction artificielle, et ceci de manière tout à fait légale.

Les applications des recherches en biotechnologie sont quelque fois très loin du domaine d'action des praticiens sur le terrain.

C'est pour quoi la fécondation in vitro, longtemps réservé à l'usage de la médecine humaine n'avait pas encore trouve d'application intéressante en médecine vétérinaire.

3-1-LES TECHNIQUES DE LA RECOLTE DES OVOCYTES :

3-1-1-RECOLTE D'OVOCYTES À PARTIR D'OVAIRES

D'ABATTOIR :

Les chercheurs ont mis en pratique plusieurs techniques de récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir, notamment celle décrite par le professeur Chritian Hanzen, celle de Blodin et Marc-Andre Sirard.

a-Méthode décrite par Chritian Hanzen :

La récolte des ovocytes in vitro est effectuée après récupération des ovaires à l'abattoir.

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

Le prélèvement des ovocytes par aspiration (trompe à eau : 1à 2 cm de Hg) du liquide folliculaire au moyen d'une aiguille (19G à biseau court) est une des méthodes les plus ancienne.elle permet en moyenne de récupérer de 09 à 16 ovocytes par ovaire soit 30 à 60% de follicules ponctionnés. P.Guerin et al (1996) trouve que cette technique permet de récolter en moyenne 6 ovocytes par ovaires et une personne peut ponctionner une centaine d'ovaires en moins de 2 heures. La dissection préalable des ovaires permet l'obtention de 16 à 17 follicules par ovaire. Cette seconde méthode offre l'avantage d'augmenter le pourcentage d'ovocytes morphologiquement normaux (60 à 63% vers 31 à 80%), conséquence possible du fait que la dissection permet de mieux identifier les follicules non atretique. Elle est cependant plus lente que la première.la découpe de l'ovaire en tranche (slicing ovary) offre pour avantage d'augmenter le nombre d'ovocytes récupérés (20 à 55 par ovaire)

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

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

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

3-1-2-RECOLTE D'OVOCYTES IN VIVO PAR LA TECHNIQUE D'OPU :

Après 1980 et tôt 1990 sont venus des travaux sur la récupération des premiers ovocytes bovines, utilisant une technique d'aspiration à l'aide d'ultrasound-guidée transvaginale (Rath, 1993 ; Roelofsen-Vendrig et al., 1994 ; Bols et al., 1996). Cette procédure d'OPU est maintenant utilisée dans plusieurs pays.

Il est évident qu'une aspiration répétée peut se faire deux fois par semaine pendant plusieurs mois sans faire appel à une stimulation hormonale des donneuses.

Anticoagulants sont souvent utilisés pour assurer la récupération et la qualité des ovocytes collectés par OPU ; Décrite par Wang et al. (1994) que l'héparine est plus utilisée que EDTA, EGTA ou bien sans recommandation d'anticoagulants.

Selon Bols et al. (1995), lorsque l'OPU est fréquemment utilisée, est désirable pour des raisons économiques et pratiques.

Bungartz et al. (1995) recommande une aspiration répétée à courte durée d'intervalle est possible et les ovocytes peuvent être récupérés à partir de vache sans respecter leur cycle de reproduction.

Une alternative d'approche pour une collection transvaginale d'ovocytes par une laparoscopie ; Décrite par Reichenbach et al. (1993, 1994) et Brem et al. (1995) en Allemagne.

Aussi dans ce pays, Wiebke (1993) utilisait une endoscopie transvaginale pour la ponction des follicules et récupérait des ovocytes à un pourcentage de 74-84% , sans endommager le tissu ovarien, pour des génisses ayant ponctionné leurs follicules à intervalle de 4, 5 et 7 jours, le nombre d'ovocytes récupérés été 8.2, 12.2, 13.3, respectivement.

-OPU à partir de vaches gestantes :

Plus de 20 ans, la super ovulation a été employée dans l'opération de transfert embryonnaire comme une principale méthode pour augmenter le nombre d'embryons récupérés chez les bovins laitiers à haut potentiel génétique, beaucoup de difficultés associées à la technologie de transfert embryonnaire causées par une variabilité de réponse à la super ovulation ainsi que la qualité des embryons (Bak et al. 1989).

A Louisiane, Ryan et al. (1993) sont les premiers qui arrivent à récolter des ovocytes à partir des vaches gestantes utilisés dans la production d'embryons.

Reinders et Van Wagendonk- de Leeuw (1996) ; Révèlent que la récolte d'ovocytes peut se faire sur des génisses dans ses trois premiers mois de gestation. Ainsi l'OPU peut être utilisé sur des vaches gestantes plus de quatre mois, sans avoir de différences de point de vue qualité d'ovocytes.

-OPU chez les génisses prépubère :

Presicce et al. (1995) menait une étude pour comparer le développement folliculaire, récolte d'ovocytes, qualité des ovocytes et développement embryonnaire pré et péripubère chez des génisses Holstein ; Ils constataient que les ovocytes obtenus seront capables pour produire des embryons, mais cette habilité est prouvée avec un âge en dehors de la période observée entre 5 et 11 mois.

En France, Revel et al. (1995) commentait sur la baisse de la capacité du développement de la maturation in vitro et la fertilité des ovocytes issus de génisses comparés à celle prévenus des vaches. Ils reportaient que la production des blastocytes est significativement basse pour des génisses (9-11%) que des vaches (>20%).

En Allemagne, Rick et al. (1996) présentait les résultats observés que l'OPU peut être successivement appliquée chez un troupeau de Holstein -Friesian à partir de 6 mois, mais elle moins efficace que chez les adultes.

A-LE MATERIEL :

A-1-Le matériel échographique :

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

Cependant, parce qu'elle offre une meilleure résolution, une sonde de 7,5 MHz s'avère optimale pour visualiser la population folliculaire ponctionnable, déterminée in vitro par

échographie, celle-ci se compose de follicules de diamètre compris entre 2 et 4 mm (92%), entre 5 et 10 mm (6%) et supérieur à 10 mm (2%).

Comparée à d'autre méthode, l'échographie sous-évalue cependant le nombre de follicules ponctionnables réellement présents sur l'ovaire. Ainsi, comparant la détermination antemortem par échographie et post mortem par dissection du nombre de follicules présents sur les ovaires, Gong démontre que l'échographie n'identifie que 19 et 44 % des follicules de taille respectivement inférieure à 5 mm et comprise entre 5 et 10 mm. Cette observation fut confirmée à l'occasion d'une autre étude au cours de laquelle en follicule sur trois (34%) détecté par dissection fut identifié par échographie.(HANZEN 2004)

A-2-Les aiguilles de ponction :

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

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

Le tranchant et l'échogénicité sont deux caractéristiques essentielles des aiguilles de ponction. Une attention particulière sera également réservée à la nature du matériel (métal, inox), au biseau (25° à 45°), à la longueur totale (40 à 60 cm) ainsi qu'aux diamètres interne (0,6 à 1,2 mm) et externe (0,8 à 1,6 mm) des aiguilles de ponction. Le diamètre interne (0,6 à 1,2 mm) ne semble pas influencer le taux de récupération des ovocytes. Sa réduction offre l'avantage de pouvoir ponctionner les follicules de petit diamètre (2 mm). La réduction du diamètre évite par ailleurs la contamination éventuelle des tubes de récolte par du sang mais augmente le risque de lésion du cumulus oophorus des ovocytes lors de l'aspiration et par conséquent leur potentiel de fécondation future. A l'inverse, l'augmentation du diamètre externe entraîne plus de lésions de la paroi vaginale, de l'ovaire et des follicules mais contribue à augmenter le pourcentage de récupération des ovocytes.(HANZEN 2004)

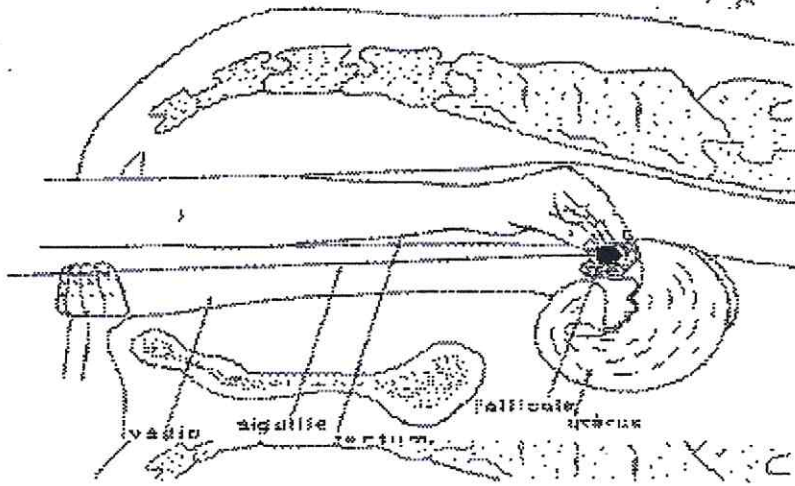


Figure 9 : schéma illustrant la technique de récolte de liquide folliculaire.

(D'après Marcinkowski et al., 1980)

A-3-Le rinçage de la cavité folliculaire :

Réalisé au moyen de PBS (Phosphate Buffered Saline), il augmente ou non chez la vache, le taux de récupération des ovocytes. Chez la jument, son effet favorable a été reconnu. Il nécessite cependant l'augmentation du diamètre de l'aiguille et contribue par ailleurs à allonger le temps nécessaire à la ponction. Réalisé sous trop forte pression, le rinçage de la cavité folliculaire peut entraîner la rupture et la perte de l'ovocyte. Certains systèmes sont équipés d'une tubulure de rinçage permanent de l'aiguille d'aspiration. Cette adaptation évite l'obturation du canal de l'aiguille par de petits caillots de sang, phénomène plus fréquemment observé si l'ovaire est porteur d'un corps jaune fonctionnel.

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

A-4- Les tubulures de connexion :

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

A-5- La pression d'aspiration :

Elle constitue un des principaux facteurs influençant le taux de récupération des ovocytes. Habituellement exprimée en mm de Hg, la pression d'aspiration réellement observée à l'extrémité de l'aiguille est comprise selon les auteurs entre 40 et 150 mm de Hg. Elle est néanmoins dépendante de différents facteurs tels que le diamètre et la longueur de l'aiguille ou le système de ponction utilisé. Cette pression d'aspiration est parfois exprimée en terme de ml d'eau aspirée en une minute par la pompe d'aspiration. Ainsi, une pression d'aspiration de 110mm Hg permet d'aspirer respectivement 37 et 46 ml d'eau par minute au moyen d'aiguilles de 19 et 18 G. des pressions permettant l'aspiration de 4 à 60 ml d'eau par minute sont habituellement recommandés. La pression d'aspiration doit être à la fois constante et non excessive. Les turbulences induites au niveau des points de jonction entre l'aiguille et le système tubulaire par des variations de la pression d'aspiration ou l'augmentation de la pression d'aspiration qui accélère la progression des ovocytes peuvent contribuer à la perte de cellules de la granuleuse. A l'inverse, une pression d'aspiration trop faible réduira le taux de récupération des ovocytes. Une étude plus spécifique réalisée in vitro a démontré que l'augmentation de la pression d'aspiration de 25 à 100 mm Hg contribue à accroître le taux de récupération des ovocytes. Cependant le pourcentage d'ovocyte utilisable pour la fécondation est optimal pour des pressions comprises entre 25 et 50 mm Hg. Semblable observation a été réalisée par d'autres auteurs. Indépendamment du diamètre de l'aiguille utilisée, une augmentation de la pression d'aspiration de 20 à 56 ml par minute augmente le nombre d'ovocytes dénudés et diminue celui d'ovocytes compacts. (HANZEN 2004)

A-6- Le milieu de récolte :

C'est un milieu tamponné au phosphate (PBS) pouvant ou non contenir du sérum foetal 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. Cependant, le contact prolongé (plus de 60 minutes) des ovocytes avec ce milieu est de nature à en réduire le potentiel de développement. Il convient donc de les placer dès que possible dans un milieu non-hépariné.(HANZEN 2004)

B- La méthode de ponction intra vaginale :

La position anatomique des ovaires de la vache, situés au bord antérieur du bassin à une largeur de main du col de l'utérus facilite l'utilisation de la méthode dans cette espèce. L'animal placé dans un travail de contention est éventuellement tranquilisé par une injection d'hydrochloride de détomidine (1mg/100kgs)(domosedan RD) ou xylazine (rompun

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

Les matières fécales sont évacuées de rectum. Au besoin, la vessie est vidée au moyen d'une sonde de foley. La région vulvaire est lavée et désinfectée pour éviter tout risque de contamination des ovocytes prélevés. La sonde échographique est guidée au travers de la cavité vaginale jusqu'à son extrémité antérieure para cervical au moyen d'un guide métallique. L'ovaire manipulé par voie transrectale est amené sur l'extrémité de la sonde échographique. Les follicules présents sur l'ovaire apparaissent sur l'écran de l'échographe sous la forme de zone noire anéchogène. Le déplacement de l'ovaire et / ou de la sonde permet d'ajuster la position du follicule à ponctionner sur le trajet de l'aiguille de ponction identifiée par une ligne sur l'écran de l'échographe. L'aiguille est poussée vers l'avant de manière à traverser successivement la paroi vaginale puis celle du follicule. Une fois la pointe de l'aiguille identifiée aux abords de la cavité folliculaire, l'aspiration est déclenchée: elle se traduit par la disparition progressive de la zone anéchogène folliculaire. Certains auteurs ont recommandé de cureter la cavité folliculaire en imprimant des mouvements circulaires à l'aiguille de ponction. Après la ponction, le contenu de chaque tube de récolte est maintenu à une température de 35 à 38°C. Il est filtré et examiné pour isoler et mettre en maturation les ovocytes récupérés. (HANZEN 2004)

C- Résultats potentiels:

C-1-Données générales :

Par rapport au nombre de follicules ponctionnés, le pourcentage moyen d'ovocytes récoltés est de 57% mais varie selon les auteurs entre 19 et 70%. (Tableau 2).

Selon les auteurs, le nombre moyen d'ovocytes récupérés par session de ponction échoguidée in vivo est compris entre 2.8 et 9.7. Appliquée à 200 vaches laitières et à viande, la technique a permis de récupérer en moyenne 6.3 ovocytes par vache dans 98% des 1006 séances de ponction effectuées. Plusieurs auteurs s'accordent à dire qu'il existe d'avantage de variations du nombre de follicules ponctionnés (8 à 20) et d'ovocytes récoltés (4 à 11) entre animaux qu'au cours du temps pour un animal donné.

La ponction échoguidée des follicules ne constitue qu'une étape à l'obtention d'embryons. Les ovocytes doivent en effet être mis en maturation puis être fécondés. En moyenne, 82% des ovocytes récupérés peuvent être mis en maturation (tableau 2) Selon les auteurs, ce

pourcentage est compris entre 41 et 100%. Il en résulte la maturation d'un ovocyte sur deux en moyenne (49%) (Tableau 2)

En moyenne, 15%(3 à 41% selon les auteurs) des ovocytes mis en maturation atteignent le stade de morula ou de blastocyte (tableau 2) .kruip estime à 2.1 le nombre d'embryons produit par animal et par semaine sur base d'une ponction bihebdomadaire, ce qui représente un nombre annuel moyen 4 fois supérieures à celui autorisé par la super ovulation. D'une expérience réalisée au moyen de vaches infertiles et après transfert de 813 embryons à des receveuses, Looney obtient 325 gestations soit respectivement 5.1% de gestations par rapport au nombre de follicules ponctionnés et 39.9% par rapport au nombre de morulas ou blastocystes obtenus. D'une expérience comparée menée dans le même laboratoire, il ressort que respectivement 30 et 41% d'embryons ont été obtenus après fécondation d'ovocytes récoltés in vitro et in vivo.(HANZEN., 2004)

Tableau 2 : Pourcentage de récupération des ovocytes après ponction échoguidée transvaginale chez la vache. (D'après C.Hanzen., 2004).

MHz	N follicules	N ovocytes récupérés	%	Diamètre follicule (mm)	Références
7.5 / 6	91	17	19	>= 3	Scott et al. 1994
7.5	115	29	25	> 2	Van der Schans et al. 1991
5	197	53	27	NP	Pieterse et al. 1988
7.5	415	116	28	> 9	Vos et al. 1994
6.5	1289	461	36	NP	Simon et al. 1993
7.5	291	122	42	NP	Bols et al. 1995
5	1391	625	45	>= 2	Meintjes et al. 1995
7.5	124	60	48	>= 5	Moyo et Dobson 1995
7.5	443	220	50	NP	Baltussen et al. 1990
7.5	206	103	50	>=3	Kruip et al. 1991
7.5	723	376	52	>=3	Pieterse et al. 1991b
NP	7970	4303	54	>=2	Kruip et al. 1993
6.5	3042	1677	55	>= 2	Roelofsen-Vendrig et al. 1994
NP	1014	558	55	NP	Lansbergen et al. 1995
6.5	641	371	58	>= 2	Donnay et al. 1996
6.5	937	618	66	> 2	Bungartz et al. 1995
5	9120	6344	70	NP	Looney et al. 1994
Total	28009	16053	57		

NP: Non Précisé

C-2-Facteurs d'influences :

Différentes fréquences de ponction ont été évaluées. Réalisée en début (J3-J4), au milieu (J9-J10) et en fin de cycle (J15-J16), la technique permet de ponctionner en moyenne 13 follicules par cycle. Le nombre moyen de follicules ponctionnés en début de cycle (4.9) est plus élevé que celui obtenu au milieu (3.4) ou en fin (3.9) de cycle, le taux de récupération des ovocytes étant sensiblement le même et compris entre 50 et 53%.

Par rapport à une ponction hebdomadaire, la ponction bihebdomadaire ne réduit ni le nombre de follicules ponctionnables de diamètre supérieur à 2 mm, ni le nombre d'ovocytes récupérés par ponction. Elle offrirait au contraire l'avantage de pouvoir ponctionner une population folliculaire relativement plus homogène. Selon certains auteurs, par rapport à une ponction réalisée toutes les 96 heures, une ponction réalisée toutes 48 heures augmente le pourcentage

d'ovocytes récupérés et celui d'ovocytes morphologiquement intacts (52.6 vs 38.2). Cependant, ce rythme de ponction s'accompagne d'une diminution de la qualité des ovocytes au cours des 2 mois de ponction. Réalisé par laparoscopie transvaginale, la ponction bihebdomadaire permet par rapport à une ponction hebdomadaire de doubler le nombre d'ovocytes récoltés par semaine (12.2 vs 5.2).

L'effet d'une stimulation de la croissance folliculaire au moyen de PMSG ou de FSH a été étudié. Bien qu'elle s'accompagne d'une augmentation. La cause peut en être trouvée dans le fait qu'une fois ponctionnées, la paroi du follicule tend à s'affaisser et à former des replis susceptibles d'emprisonner l'ovocyte ou de coiffer l'extrémité de l'aiguille ce qui supposerait l'utilisation d'une pression d'aspiration plus élevée lors de ponction de follicules de plus grand diamètre. Après un traitement de super ovulation, le pourcentage de récupération des ovocytes est d'autant plus élevé que la ponction est réalisée tardivement après le pic de l'hormone lutéotrope (LH). Cette observation a été imputée à la réduction du degré d'adhésion du cumulus proliger à la paroi folliculaire dans les follicules prêts à ovuler ou en voie d'atréisie.

D'autres traitements ont été évalués. Ainsi, lors de ponction hebdomadaire, l'injection d'une prostaglandine en cas de présence d'un corps jaune, permet l'obtention d'un plus grand nombre d'ovocytes mais réduit leur qualité. Le nombre d'ovocytes reste néanmoins inférieur à celui obtenu lors de ponctions bihebdomadaires. La suppression de l'effet inhibiteur du follicule dominant par une vaccination contre l'inhibine, ne modifie pas le nombre d'ovocytes obtenus. Il est possible que l'hormone de croissance (GH : growth hormone) connue pour augmenter le nombre d'embryons transférables après un traitement de super ovulation puisse offrir de nouvelles perspectives dans le cadre de la fécondation in vitro d'ovocytes prélevés par ponction échoguidée.

L'effet du stade de reproduction a également été étudié. Comparant des génisses et des vaches en lactation, tariées ou gestantes, bungartz observe un nombre moyen de follicules ponctionnables significativement plus élevé chez les vaches en lactation (10.6) et tariées (9.3) que chez les vaches gestantes (7.3) ou les génisses (8.1). Le nombre d'ovocytes récoltés n'est cependant pas significativement différent (5.7 à 7.2). Le pourcentage d'ovocytes récoltés est significativement plus élevé chez les vaches tariées (74.4 vs 66.3 à 69.9). Enfin, le pourcentage d'embryons obtenus n'est pas significativement différent (11.9 à 22.7%) entre les quatre groupes comprenant il est vrai un nombre limité d'animaux (4 à 6). (HANZEN., 2004)

D-Intérêt de l'ovum pick up:

La technique de l'OPU –FIV présente trois intérêts principaux pour la sélection à raison de deux sessions d'OPU par semaine et d'environ 1,5 embryons transférables par session, le nombre de veaux qui peut être obtenus par unité de temps est pratiquement multiplié par 4 par rapport au nombre de veaux produits après super ovulation et la collecte classique. Il devient donc possible d'augmenter encore la pression de sélection sur les mères à taureaux. Le deuxième intérêt est d'améliorer l'efficacité de la sélection même en raisonnant à niveau constant de prolificité. En effet, l'OPU-FIV permet de réaliser des accouplements in vitro et donc de mieux planifier le choix des reproducteurs mâles à la limite ovocyte par vache. On peut en particulier augmenter considérablement le nombre de mâles accouplés à une même femelle, nombre qui n'est pas très élevé en super ovulation classique (égal au maximum au nombre de collectes). Ceci a pour effet d'améliorer la précision des index de sélection (meilleure <connexion> entre reproducteurs) et surtout de diminuer la parenté moyenne entre les produits de la génération suivante, ceux-ci ayant lus rarement leurs deux parents communs. De ce fait, le taux de consanguinité à long terme est diminué et avec lui le risque de voir apparaître une fixation fortuite de gènes à effets défavorables (Hanzen., 2004). Woolliams (1989) montre déjà avec la super ovulation classique, qu'on a tout intérêt à changer de taureau à chaque collecte. Un troisième intérêt potentiel de l'OPU-FIV est devenu possible d'obtenir des descendants des femelles qui ne répondent pas à la super ovulation. On ne dispose toutefois pas encore de données suffisantes sur les performances de telles femelles pour la production d'embryons in vitro. En cumulant tous les effets positifs de l'OPU-FIV pour la sélection (et en anticipant sur son intérêt potentiel), Leitch et al (1995) trouvent que le rythme de progrès génétique annuel avec un schéma OPU-FIV est supérieur de 10 à 30% à celui d'un schéma avec super ovulation et fécondation in vivo, les donneuses ayant le même âge dans les deux cas. L'OPU-FIV permet aussi de diminuer l'âge des donneuses par rapport à la production d'embryons in vivo car il est possible d'effectuer des ponctions répétées d'ovocytes dès l'âge de 9 mois. Ceci pourrait être considéré comme un programme de sélection. Mais même en admettant que de tels ovocytes aient des probabilités de fécondation non diminués, ce qui fait encore l'objet de données contradictoires, l'effet d'un tel raccourcissement de l'intervalle de génération serait nul sur le progrès génétique annuel. En effet, les descendants naîtraient beaucoup trop tôt par rapport à la connaissance des performances de la donneuse (lactation notamment) et celle ci serait donc insuffisamment sélectionnée, parce qu'évaluée avec une précision trop faible. L'OPU-FIV est

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

3-1-3-Qualite des ovocytes :

A-CRITERES DE DETERMINATION :

Plusieurs chercheurs ont mis en pratique divers critères de classification des ovocytes, citons celles réalisés chez les bovins par Christian Hanzen., 2004, Blondin.P, M.A.Sirard, 1995, Deloos et al, .1989 et chez l'Homme par S.Hamamah, et al, .1996 .

A-1-CHEZ LES BOVINS :

A-1-a-CLASSIFICATION UTILISEE PAR CHRISTIAN HANZEN :

La sélection des ovocytes repose essentiellement sur des critères morphologiques (microscope optique) ou ultra structurelles (microscope électronique).Du cumulus oocyte complex (COC). Les ovocytes bovins immatures peuvent être repartis en quatre catégories selon le degré de compacité des cellules de cumulus et de transparence de l'ooplasmе. Il semble évident que les différences éventuellement identifiées lors de l'examen peuvent être attribués à des stades divers de maturation, celle ci s'accompagnant d'importantes modifications de surface et donc de contact entre l'ovocyte proprement dite et les cellules de cumulus :

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

- CLASSE 04 : Le cumulus est complètement expansé voir absent (ovocyte nu ; naked oocyte).

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

A-1-b-CLASSIFICATION UTILISEE PAR BLONDIN, M.A.SIRARD :

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

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

Seuls les COCs qui ont les caractéristiques des classes 1,2 et 3 sont habituellement sélectionnées pour être utiliser dans le système de production in vitro (PIV).

A-1-c-CLASSIFICATION UTILISEE PAR DELOOS ET AL :

Selon le nombre et la compacité des cellules de cumulus oophorus et l'homogénéité de l'ooplasme, on distingue quatre classes (figure 10) :

- CLASSE 01 : Le COC compact avec plusieurs couches cellulaires (supérieur à 3 couches), et un ooplasme homogène.
- CLASSE 02 : Le COC compact avec un à deux couches cellulaires et un ooplasme homogène, a une grosse apparence et une sombre zone pellucide.
- CLASSE 03 : Le COC légèrement compact avec un ooplasme irrégulier contenant des amas sombres.
- CLASSE 04 : Ovocytes nus ou un COC expansé, un ooplasme irrégulier.

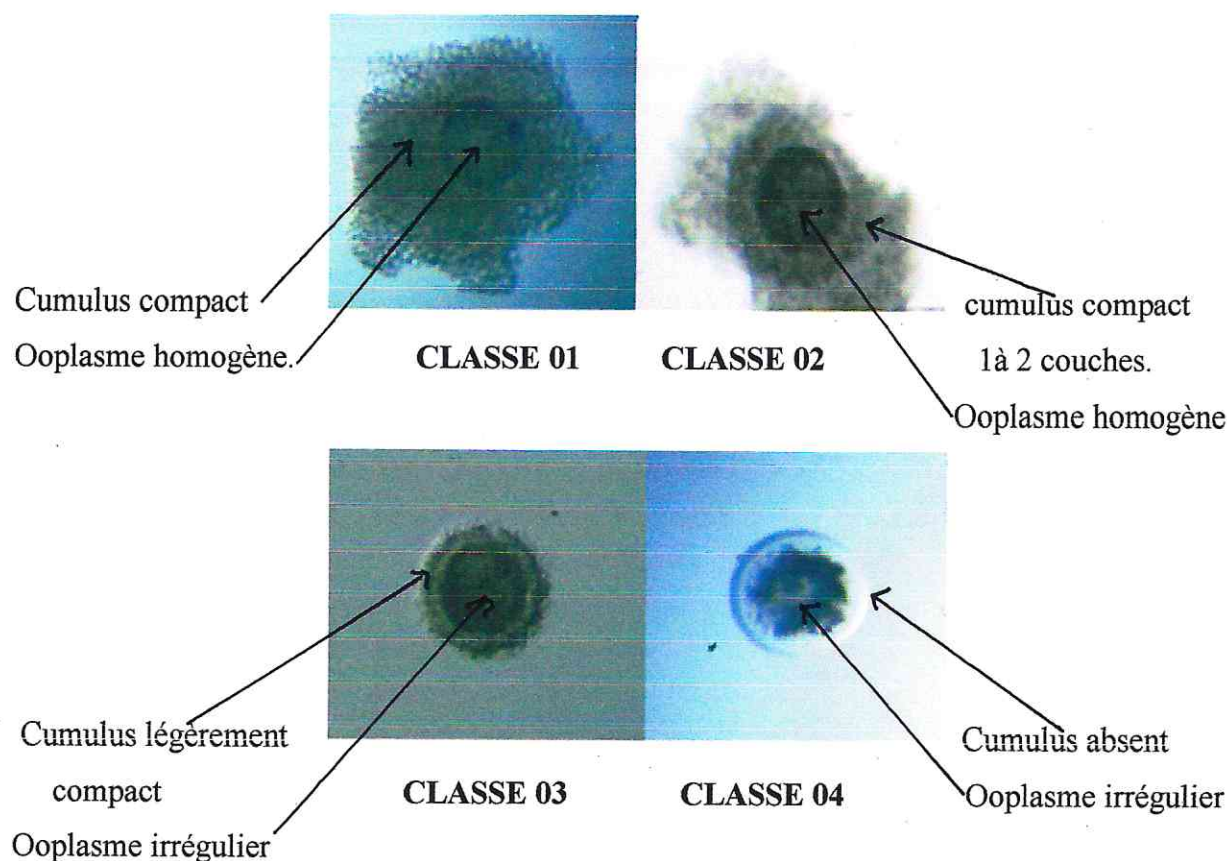


Figure 10 : Photos des quatre classes d'après De Loos., 1989.

Konishi (1996) a observé que plus de 60% d'ovocytes collectés par une aspiration transvaginale des follicules sont classés en qualité 02 à 04.

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

Il était observé que 74,30% d'ovocytes sont collectés à partir d'ovaires bovins d'abattoir dont 57,2% sont compacts, cellules de cumulus épaisses, 9,6% ont des couches de cumulus minces, et 7,5% sont nus (Shioya et al., 1988), ils ont observés que 50% d'ovocytes nus subissent une maturation et la moitié de celles-ci sont fécondées, bien que 20% d'ovocytes nus sont dégénérés après leur examen microscopique.

A-2-CHEZ L'HOMME :

-CLASSIFICATION UTILISEE PAR S. HAMAMAH, ET AL :

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

- CLASSE 01 : Un cumulus expansé, corona radie, ovocyte régulier.
- CLASSE 02 : Un cumulus expansé, corona compact, ovocyte irrégulier.

- CLASSE 03 : Un cumulus danse, corona compact ovocyte régulier.
- CLASSE 04 : Un cumulus expansé, corona dispersé, ovocyte attique.
- CLASSE 05 : Un cumulus expansé, corona dispersé, zone pellucide fracturée.
- CLASSE 06 : Un cumulus avec des amas, corona compact, ovocyte irrégulier.

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

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

B-Facteurs d'influences :

B-1-L'animal donneur :

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

L'effet du stade de reproduction a été étudié. Selon certains auteurs mais pas pour d'autres, la qualité des ovocytes prélevés chez animaux gestants serait supérieure à celle des ovocytes obtenus sur des animaux non-gestants. La cause pourrait en être trouvée dans la présence d'une population folliculaire différente (Hanzen., 2004). Guérin (1996) rapport que la compétence des ovocytes n'est pas influencée par l'état de gestation. Ainsi, lors de gestation, le nombre de follicules de taille moyenne (5 à 9mm) ou de grande taille (>10mm) serait moindre, le nombre de petits follicules étant la même. La présence d'un corps jaune sur l'ovaire ponctionné pourrait avoir ou serait sans influence sur la maturation des ovocytes obtenus (Hanzen., 2004). Guérin et al (1996) trouvent que la compétence des ovocytes ne semble pas influencée par la période du cycle oestral de la donneuse. Ainsi le taux de développement des ovocytes diminue-t-il selon qu'ils proviennent d'ovaires porteurs d'un corps jaune cyclique, d'ovaires provenant d'animaux cyclés mais non porteurs de corps jaune, de génisses pré pubères ou d'animaux gestants. Comparant des génisses et des vaches en lactation, tarées ou gestantes (Hanzen., 2004), Bungartz (1995) n'observe pas de différences

significatives du pourcentage d'embryons obtenus (11.9 à 22.7 %) entre les quatre d'animaux qu'il étaient, il est vrai en nombre limité (4 à 6).

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

L'effet de la race a été peu étudié. Les races européennes ont significativement plus de gros follicules que les Zébus ou que les animaux issus de croisement. La race Holstein donne davantage de COC par ovaire que les Zébus mais leur taux de clivage est inférieur.

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

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

B-2- L'ovaire et le follicule :

La capacité de l'ovocyte à accomplir sa maturation nucléaire et cytoplasmique s'acquiert progressivement au cours du développement folliculaire. Il est donc essentiel de pouvoir juger de la qualité des follicules dont proviennent des ovocytes. Cette qualité est le plus souvent évaluée sur base de critères morphologiques, qu'ils soient de nature anatomique (diamètre, aspect macroscopique...) ou histologique ou sur base de critère dépend étroitement des conditions de prélèvement (in vivo ou in vitro) des ovocytes.

Physiologiquement, trois types de follicules peuvent être distingués : les follicules non atériques. Ils se caractérisent par l'absence de signes de dégénérescence, une abondance de figures mitotiques dans le cumulus oophorus, une membrane basale continue et la présence d'un ovocyte normalement développé. Au microscope, ces follicules apparaissent uniformément brillants, transparents, bien vascularisés et possédant une couche de cellules granuleuses uniformes sans que des particules flottantes ne puissent être identifier dans le liquide folliculaire. Des signes de dégénérescence et une réduction du nombre de mitoses sont

visibles dans les follicules dit légèrement atrétiques. Dans les follicules atrétiques, le nombre de cellules dégénérées augmente, la membrane basale est désorganisée et des macrophages apparaissent dans la cavité folliculaire. (Hanzen., 2004)

En moyenne on estime que 50 à 85% des follicules présents sur l'ovaire sont plus ou moins atrétiques. Ce pourcentage dépend de leur taille. L'atrésie concerne davantage les follicules de grand que de petit diamètre (Lussier., 1987). ce dernier a précisé l'importance. (Tableau 03)

Tableau 03 : Distribution du nombre de follicules et de leur pourcentage d'atrésie selon leur diamètre. (D'après Lussier., 1987)

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

N : Nombre

B-2-1- Aspects morphologiques :

Comparant la transparence de follicules de diamètre supérieur à 5 mm, Grimes et Ireland, obtiennent davantage d'ovocytes matures de follicules transparents que de follicules présentant un certains degré d'opacité. Par ailleurs, il semble bien démontré que la qualité des ovocytes dépend essentiellement de la taille des follicules dont ils sont issus. Les ovocytes provenant de follicules de diamètre supérieur à 5 voire 6 mm produisent davantage d'embryons que ceux provenant de follicules dont le diamètre est compris entre 2 et 6 mm voire dont le diamètre est inférieur à 2mm. Etudiant la qualité des ovocytes provenant de follicules de diamètre supérieur à 8mm, Stubbing constate que les ovocytes matures proviennent le plus souvent de follicules dont le volume est d'au moins 0.3ml (10mm de diamètre moyen). La cause peut en être trouvé dans le fait qu'in vivo, la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte s'étale sur plusieurs jours, temps nécessaire à la croissance du follicule d'une taille comprise entre 2 et 6mm et une taille préovulatoire (10 à 20mm). In vitro, ces événements s'étalent sur moins de 24 heures. L'influence de divers facteurs hormonaux intra folliculaires (hormones stéroïdiennes, facteurs de croissance...) s'en trouve donc modifiée.

Classiquement, les ovocytes de bonne qualité proviennent des follicules non-atrétiques ou de follicules en voie d'atrésie. L'explication en serait que la proie des follicules non-atrétiques

secrèterait une substance inhibitrice de la maturation cytoplasmique. Cette inhibition étant en tout ou partiellement levée dans les follicules en voie d'atrésie, le cytoplasme de ces ovocytes apparaît plus granuleux et les cellules du cumulus présentent un début d'expansion.

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

En pratique, dans le cadre de l'OPU, la possibilité de déterminer par échographie le diamètre du follicule voire l'identification d'un aspect transparent ou au contraire semi-opaque représente un atout majeur dans l'évaluation indirecte de la qualité de l'ovocyte. (Hanzen., 2004)

B-2-2- Aspects hormonaux :

La croissance du follicule dominant a été associée à l'augmentation des concentrations en oestradiol 17 bêtas et en progestérone, le rapport entre ces deux hormones augmentant dans les follicules dominants mais diminuant dans les follicules dominés. Par ailleurs on sait que la concentration en oestradiol diminue dans tous les follicules en voie de dégénérescence quelque soit leur taille. Les follicules dits non-atrétiques de taille inférieure à 8 mm sont sous influence androgénique tandis que ceux de taille supérieure à 11 mm sont sous influence oestrogénique. La dégénérescence s'accompagne d'une diminution progressive des concentrations folliculaires en oestradiol et androgènes et en une augmentation en progestérone. Cette observation se trouve confirmée par le fait que davantage de blastocystes sont obtenus à partir d'ovocytes provenant de follicules dont le taux de progestérone était faible. En pratique, cette détermination des concentrations hormonales n'est que ponctuellement possible et ne peut être envisagée comme critère de sélections des follicules à ponctionner. (Christian Hanzen., 2004).

3-2- MATURATION DES OVOCYTES :

a-Maturation in vitro :

Diverses méthodes ont été proposées. Une première possibilité est de réaliser cette maturation ovocytaire en placent les follicules disséqués dans un milieu de culture. Cette méthode réservée aux follicules de petit diamètre (1à 2 mm) requiert une expérience certaine.

Dans l'espèce équins certains auteurs ont avec succès réussi le transfert d'ovocytes sur des follicules preovulatoires de juments, celle ci étant ensuite récoltée après insémination.

Habituellement, cependant les ovocytes sont placés en maturation par groupe de 10 à 20 dans des micros puits renfermant de 50 à 100 microlitres de milieu. Il est bien démontré que la température de maturation ovocytaire comme celle assurant une pénétration optimale des spermatozoïdes lors de la fécondation est de 39 °C.

La maturation in vitro des ovocytes est soumise à l'influence de nombreux facteurs dont la plupart restent à préciser.

En effet, alors qu'en moyenne 60 à 85 % des ovocytes matures in vitro sont fécondés et se développent, seul 25 à 30 % atteignent le stade blastocyste. La réussite de la maturation in vitro dépend de nombreux facteurs dont un des plus importants est la technique de maturation et en particulier la composition du milieu de culture utilisé. En effet, 50,3% des ovocytes matures in vivo atteignent après fécondation in vitro le stade de blastocyste. Lors de la maturation in vitro ce pourcentage est de 29,8%. (Figure 11) (Hanzen., 2004)

La plupart des milieux de culture cellulaire sont aptes à assurer la maturation ovocytaire et la réaction acroamatique des spermatozoïdes. Il en est de simples et de complexes, les plus couramment employées sont :

a-1-Milieu de base :

Tous les milieux de culture classiques (MEM, TCM 199, TALP, Waymouth, Ham-F12, SOF, B2 ...) ont été utilisés pour la maturation mais peu d'études les ont systématiquement comparés. Le milieu généralement pour la maturation est le TCM199, un milieu tamponné au bicarbonate, contenant des sels minéraux, des sources de carbone et d'énergie (glucose, glutamine) ainsi que des acides aminés et vitamines.

La présence d'acides aminés paraît indispensable à la qualité de la maturation, ceci étant particulièrement vrai pour les acides aminés soufrés (cystine, cystéine) intervenant dans le métabolisme de glutathion et pour la glutamine, une des principales sources d'énergie de l'ovocyte (avec le pyruvate et le glucose qu'il peut capter et métaboliser).

A ce milieu de base sont souvent ajoutées des molécules de haut poids moléculaire dont l'effet surfactant empêche l'adhésion des complexes cumulus ovocytes entre eux et au support de culture. L'albumine sérique bovine (BSA) est souvent utilisée à cet effet, ainsi que des liquides biologiques complexes (sérums bovins fœtaux, sérum de femelle en oestrus, liquide folliculaire). Cependant l'utilisation de ces additifs d'origine animale pose des problèmes d'ordre sanitaire et nuit à la reproductibilité des expériences. De plus, la complexité de ces

suppléments interdit l'analyse du besoin réel de l'ovocyte. De bons résultats ont pu être obtenus en substituant à ces protéines animales des hauts polymères synthétiques présentant les mêmes propriétés tensioactives, tels que le polyvinyle alcool. Les conditions physiques utilisées pour la maturation sont généralement celles de la température centrale de l'espèce (39°C, mammifères domestiques ; 37°C, primates, petits rongeurs), sous une atmosphère d'air contenant 5% de CO₂ saturé en humidité, pour une durée de 24 heures (ruminants et souris) à 44 heures (Humain et porc). (Pascal Mermillod, 2001)

a-2-Hormones :

La plupart des auteurs démontrent l'importance d'une complémentation hormonale ;

L'effet des hormones gonadotropes (FSH et LH) sur la qualité de la maturation *in vitro* reste très controversé, malgré de nombreuses études (Bever MM, 1997). Les divergences de résultats tiennent sans doute à la présence ou non de sérum ou de fluide folliculaire pouvant masquer ou amplifier leur action. Toutefois, FSH potentialise l'action de facteurs de croissance, comme l'EGF ou le PDGF et stimule l'expression de récepteurs LH par les cellules de cumulus et LH agit directement sur le métabolisme ovocytaire, augmentant la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Elle exerce leurs actions via les cellules de cumulus. Le niveau élevé de l'œstrogène dans le follicule pré-ovulatoire permet l'augmentation dans l'ovocyte de l'ADN-polymérase B, réparatrice (Murdoch WJ, Van Kirk EA, 2001).

L'œstradiol augmente la capacité de développement des ovocytes humains après maturation *in vitro*, sans affecter la maturation nucléaire. Cet effet reposerait sur une action non génomique, en favorisant l'influx de calcium au niveau de la membrane ovocytaire et permettant l'initiation d'oscillations calciques cytoplasmiques (Tesarik J, Mendoza C, 1997).

La GH accélère la maturation nucléaire, stimule l'expansion de cumulus et améliore le taux de développement au stade de blastocystes, ceci en absence de sérum et d'hormone gonadotrope (Izadyar F., 1998). La GH aurait donc un effet sur la maturation nucléaire et également sur la maturation cytoplasmique (taux de développement), ce dernier effet résulterait d'une accélération de la migration des granules corticaux. Cette action de la GH est également transmise par le cumulus.

a-3-Facteurs de croissance et autres peptides :

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

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

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

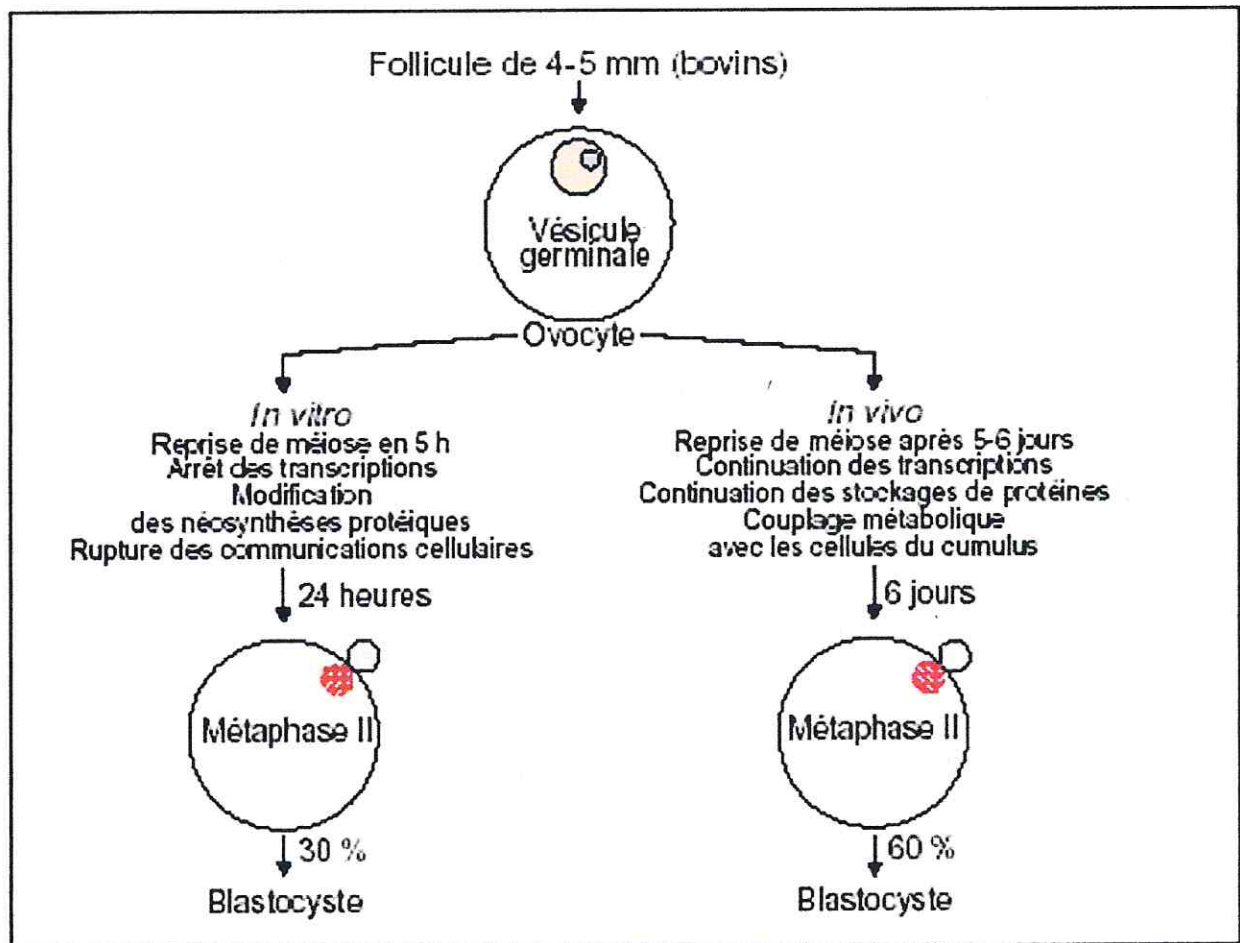


Figure 11 : Comparaison de la destinée d'un ovocyte bovin dans un follicule de 4-5 mm selon qu'il est mis en culture ou laissé dans son follicule jusqu'à l'ovulation. (Selon Lonergan P., et al 1997)

b-Evaluation de la maturation ovocytaire :

In vitro, l'ovocyte placé dans des conditions optimales et donc soustrait à l'influence inhibitrice du milieu folliculaire et de l'OMI (oocyte Maturation Inhibiting factor) en particulier, reprend spontanément sa division méiotique. L'expulsion du premier globule polaire (fin de la maturation) prend habituellement 18 à 24 heures. Elle peut néanmoins déjà s'observer après 3 à 12 heures de culture. On peut à ce moment aisément différencier la membrane pellucide, le noyau, et l'espace perivitellin refermant le premier globule polaire. Morphologiquement, les cellules du cumulus apparaissent beaucoup plus dispersées (3 fois le diamètre de l'ovocytes c'est à dire plus de 300 microns) sous l'effet semble-t-il de l'acide hyaluronique sécrété par les cellules de la granuleuse en réponse à la libération de l'hormone

LH cette expansion s'accompagne également d'une mucification plus intense des cellules. Il facilite l'ovulation et le passage des spermatozoïdes.

L'absence de globules polaires n'implique pas nécessairement l'absence de maturation nucléaire. Au sein du noyau on peut observer également la migration centrale des vésicules, mitochondries et autres gouttelettes lipidiques, donnant à ce dernier un aspect plus condensé. Il est cependant difficile de conclure à la maturation de l'ovocyte sur son seul examen morphologique. Un complément d'information sera obtenu après coloration à base d'une solution de tyrode et de fuschine. Le critère définitif sera néanmoins le développement de l'ovocyte féconde jusqu'au stade blastocyste. (Hanzen., 2004)

c-Particularités d'espèces :

Comme chez la vache, la maturation ovocytaire s'observe davantage d'effet favorable dans l'espèce caprine qu'ovine.

Dans l'espèce porcine, le prélèvement d'ovocytes par aspersion ou par dissection des ovaires permet l'obtention respectivement de 8 et 45 ovocytes par ovaire.

Plus que chez les ruminants, l'addition au milieu de maturation d'un grand nombre de cellules granuleuses favoriserait les résultats. Chez le porc, la durée de la maturation ovocytaire est plus longue 42 à 44 heures. Le rôle favorisant de l'addition de cystéine et d'EGF a plus souvent été reconnu dans cette espèce. La maturation de l'ovocyte de jument nécessiterait 36 heures. A la différence des ruminants et de la truie, cette espèce ne présente pas de pic préovulatoire de LH. La maturation de l'ovocyte serait optimisée par la présence dans le milieu de cellules thécales. (Hanzen., 2004)

3-3-CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES :

In vitro, la capacitation se produit quand sont présents dans le milieu de suspension des spermatozoïdes de l'albumine sérique, de l'héparine pour les ruminants (glycosaminoglycane), et des accepteurs de cholestérol, albumine et lipoprotéine. En rechargeant l'albumine sérique avec de cholestérol on empêche la capacitation. En présence de ligands spécifiques du cholestérol on observe un afflux de cholestérol et une stimulation de la capacitation.

La capacitation in vitro ne se produit qu'avec de fortes concentrations de spermatozoïdes.

Les enzymes acrosomiques libérés par des spermatozoïdes morts ou ceux ayant subi une réaction acrosomique spontanée, contribueraient à modifier les chaînes oligosaccharidiques des

protéines membranaires des spermatozoïdes intacts comme le font les enzymes de tractus génital femelle in vivo.

Après 1 à 10 heures, selon les espèces, un pourcentage important des spermatozoïdes est capables.

Les temps nécessaires sont semblables in vivo et in vitro.

3-3-1-Méthode de la fécondation in vitro :

a-Sélection des spermatozoïdes :

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

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

Dans le premier cas les spermatozoïdes sont déposées sur une double solution de concentration différente de percoll puis centrifugé pendant 15 minutes à 500 G : Se faisant les spermatozoïdes vivants se retrouvent au fond du tube et les morts à l'interface des deux solutions. Dans le second cas, on dépose un milieu tampon (TALP calcium free tyrode / albumine / sodium lactate / sodium pyruvate) ou de culture sur un culot de spermatozoïde et après incubation (1 heure à 39°C) on récupère la phase supérieure renfermant les spermatozoïdes mobiles, les spermatozoïdes morts demeurant dans le fond.

Le culot des spermatozoïdes vivants est remis en suspension dans du milieu pour le débarrasser le plus complètement possible de son milieu de congélation (glycérol).

Le culot de spermatozoïdes est récupérés (100microlitres) par centrifugation.

Leur concentration est ensuite déterminée et ajustée de manière à avoir une concentration égale à 2.000.000 de spermatozoïdes par ml.

Ainsi préparé et conservé à 25°C, le sperme peut encore être utilisé au bout de 4 à 8 heures.

Ces manipulations seront réalisées dans une hotte à flux laminaire. (Hanzen. ,2004)

b-Induction de la capacitation :

Bien que diverses méthodes aient été employées pour induire artificiellement la capacitation, il semble bien que la méthode utilisant l'héparine soit la plus appropriée pour le sperme bovin (milieu tampon ou de culture renferment 10 à 20mcg/ml d'héparine). Le sperme y est ajouté de manière à avoir une concentration de 2.000.000 spermatozoïdes par ml. Le recours à l'héparine ne semble pas pouvoir être appliqué dans les espèces ovines, caprine et porcine. Dans l'espèce équine, il semble que le recours à un agent ionophore (A23187) doive être préféré. (Hanzen., 2004).

c- Induction et entretien de la mobilité :

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

d- Fécondation proprement dite :

La fécondation est réalisée dans une goutte de 50 à 100 micros litre de milieu sous huile de paraffine ou minéral pour éviter toute évaporation, chaque goutte renferme une vingtaine d'ovocytes et environ 100.000 spermatozoïdes (2 millions par ml). L'incubation dure 18 heures à 39°C dans une atmosphère d'air renfermant 5% de CO₂, l'atmosphère sera également saturée d'humidité pour éviter toute évaporation du milieu. Une augmentation du temps de l'incubation est un facteur de risque de polyspermie. Il est important par ailleurs que le laboratoire soit maintenu autant que faire se peut à une température comprise entre 25 et 30°C.

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

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

Trois cibles au niveau de l'ovocyte ont été visées par la fécondation assistée : (figure 12)

1- Au niveau de la zone pellucide (zona drilling ou ZD ou PZD) on faisant une ouverture avant d'incuber les ovocytes avec les spermatozoïdes.

2- Au niveau de l'espace perivitellin en injection directement une dizaine de spermatozoïdes sous la zone pellucide (SUZI).

3- En injectant directement un seul spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte (ICSI ; intra cytoplasmique sperme injection). (S.Hamamah et al ., 1999).

PZD (partial zona dissection) et ZD (zona drilling)



SUZI (subzonal sperm injection)



ICSI (intracytoplasmic sperm injection)

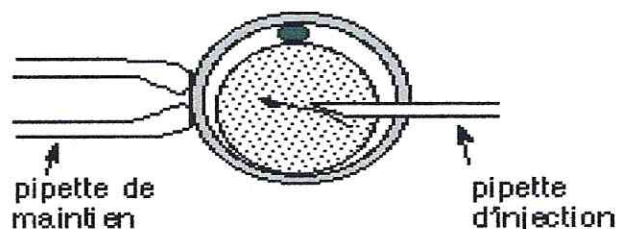


Figure 12 : PRINCIPE DE DIFFERENTES TECHNIQUES DE FIV ASSISTEE.

(D'après Palermo et al 1992 ; Van Steirteghem et al 1993)

Les critères de fécondation :

- L'apparition de deux globules polaires ou des deux gros noyaux constituent les critères le plus souvent employés pour confirmer la fécondation. Cependant, dans l'espèce bovine est à la différence des espèces murine et humaine, ces pronucleis ne sont habituellement visible que s'ils ont au préalable été traité par centrifugation ou par coloration (fuschine).

La raison doit en être trouvée dans le fait que l'ovocyte renferme davantage de vésicules lipidiques.

- L'identification de spermatozoïdes accessoires fixes à la membrane pellucide constitue un autre paramètre d'évaluation. leur nombre est directement proportionnelle aux chances de fécondation et de développement embryonnaire.

- Le taux de clivage constitue une autre méthode d'évaluation, in vivo, le stade 4 cellules est habituellement atteintes après 42 heures. In vitro, il exprime le nombre de blastomères identifiés à 48 ou 72 heures. ce nombre est directement proportionnel à la possibilité pour l'embryon d'atteindre le stade blastocyste. Ainsi la présence de 4 blastomères 48 heures après la fécondation se traduit par 13% de développement jusqu'au stade de blastocyste. Si ce nombre est supérieur à 4, le pourcentage est de 40%. Dans notre laboratoire, nous évaluons le nombre de blastomères à 72 heures, si le stade est atteint à ce stade de gestation, 80% des embryons se développent jusqu'au stade blastocyste.

Selon les auteurs et donc les protocoles au demeurant pléthoriques, les taux de fécondation sont compris entre 30 et 85 % tandis que les pourcentages de blastocystes obtenus sont compris entre 7 et 50%, 50% d'entre eux donnant lieu à une gestation. Il est intéressant de noter que comme après une fécondation in vivo, 60% des embryons obtenus sont des mâles. (Hanzen., 2004)

3-4- LA CULTURE DES EMBRYONS :

a-Culture de l'embryon in vivo :

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

récupères après 3 à 7 jours. Des résultats semblables ont été obtenus après transfert d'embryons dans des oviductes (10 à 50 embryons par oviductes) de brebis préalablement synchronisées au moyen d'une éponge vaginale et d'une injection de PMSG, les embryons étant introduits après ligature des oviductes 01 à 02 jours après l'ovulation. De différentes études réalisées, il apparaît que 56% des embryons peuvent être récupères après une semaine, 24% d'entre eux ayant franchi la phase de blocage et atteint le stade morula-blastocyte.

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

b- Culture de l'embryon in vitro :

Chez les ruminants, 80 à 85% des ovocytes maturés et fécondés in vitro se clivent et 30 à 40 % forment des blastocystes, qui transplantés dans des femelles receveuses conduisent en moyenne à 50 % des mis-bas. La tendance est à l'utilisation de milieux entièrement synthétiques, sans apport de serum (Hasler, J.F., 2000). Les embryons ne peuvent se développer dans les milieux traditionnellement utilisés pour cultures cellulaires. Il leur faut pour franchir avec succès la phase de blocage, être cultivés en présence de cellules (ou de leur produit de sécrétion). D'origine le plus souvent tubaire ou autre : c'est la coculture. Certaines méthodes ont recours à des milieux chimiquement définis se rapprochant le plus de la composition des sécrétions tubaires. Ce sont des milieux salins additionnés d'acides aminés tel que le SOF (Synthetic Oviductal Fluid), le CR1 (milieu de Rosenkrans) ou le BMOC-3 (Milieu de Brinster) . La culture des embryons dans ce type de milieu permet de mesurer directement l'impact de divers facteurs sur le développement embryonnaire sans qu'il y ait besoin de prendre en considération l'effet des cellules. En culture, les embryons sont placés en contact avec un substrat nourricier (cellules de feeder). Ces cellules peuvent être trophoblastiques, tubaires, cellules de la granuleuses ou somatique. Ces dernières telles les MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) , BRL(Buffalo Rat Liver) ou VERO (cellules de reins de singe vert) offrent l'avantage de pouvoir être contrôlés sur le plan sanitaire (absence de virus IBR ou BVD) ce qui n'est pas le cas des autres types cellulaire , le plus souvent prélevé à l'abattoir . Ces cellules sont placés en culture dans un milieu (le plus souvent le milieu M-199 ajoute parfois d'OCS ou de divers facteurs de croissances tels l'IGF , le TGF , EGF, l'insuline ...).(Hanzen C.,2004)

Partie expérimentale

1- Introduction :

La production d'embryons dans l'espèce bovine par la technique de fécondation in vitro se déroule en 04 étapes : la récolte des ovocytes, la maturation, la capacitation des spermatozoïdes et la fécondation in vitro proprement dite. L'étape fondamentale de la réalisation de cette technique est la récolte des ovocytes.

Nous avons essayé dans ce travail de maîtriser la technique de récolte des ovocytes à partir des ovaires issus de vaches d'abattoir et de faire une classification de tous les ovocytes récoltés. Puis nous avons étudié les divers facteurs influençant la qualité des ovocytes récoltés : état physiologique des vaches, la taille des follicules d'où les ovocytes sont issus et la présence ou absence de corps jaune.

2- Matériel et méthodes :

2-1- Les Ovaires :

Les ovaires utilisés dans notre travail sont prélevés au niveau de l'abattoir de Blida. Ils sont séparés et identifiés (état physiologique, situation de l'ovaire)

Les ovaires prélevés sont ensuite transférés au laboratoire du département des sciences vétérinaires de l'université Saad Dahleb de Blida.

2-2- Matériel :

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

- Ciseaux.
- Sachets de congélation.
- Glacière contenant de l'eau tiède qui sert à la préservation et le transport des ovaires.
- Thermomètre pour la prise de température dans la glacière.
- Seringues.
- Aiguilles (G : 18), utilisés pour la ponction des follicules.
- Solution physiologique (NaCl 0,9%).
- Boîtes de pétries quadrillés, utilisés pour contenir le liquide folliculaire récolté.
- Microscope inversé.
- Micro pipette.

- Appareil photos numérique.



A : Matériel de récolte.

B : microscope inversé .

Photo01 A, B : Le matériel utilisé pour la récolte et la classification des ovocytes.

2-3-Méthode de travail :

Notre travail est reparti en deux temps à savoir : la collecte des ovaires à l'abattoir de Blida, la récolte et la classification des ovocytes au niveau du laboratoire du département vétérinaire de Blida.

a-La collecte des ovaires :

Avant la collecte des ovaires on prépare la glacière en mettant de l'eau tiède dans les sachets de congélation et on contrôle la température dans la glacière qui doit être comprise entre 24 à 30°C à l'aide d'un thermomètre électronique.

A l'abattage des vaches, on récupère les matrices et on contrôle l'état physiologique, les ovaires sont ensuite prélevés le plus vite possible (dans les 2 heures suivant l'abattage des vaches) à l'aide de ciseaux on met chacun dans un sachet de congélation, on mentionne la situation de l'ovaire (ovaire gauche ou droit), état physiologique de la vache (vache gestante ou non). Les ovaires récupérés sont conservés dans la glacière et transférés vers le laboratoire.

b-Récolte et classification des ovocytes :

La récolte des ovocytes par ponction des follicules doit être dans les quatre (04) heures qui suivent la récupération des ovaires.

La vérification de la température dans la glacière est nécessaire juste à l'arrivée au laboratoire, elle doit être entre 25 à 30°C, on prépare ensuite le matériel de récolte.

Le protocole de récolte se résume comme suis :

On mentionne sur la fiche commémorative (Annexe 1) l'état physiologique, la situation de l'ovaire, présence ou absence de corps jaune et le nombre de grands follicules (>6mm) observés. On procède d'abord à la ponction et à l'aspiration des grands follicules puis des petits follicules, le liquide récupéré est mis dans une boîte de pétrie. Au moment de la ponction des follicules, l'application d'une pression d'aspiration est nécessaire pour une récupération maximale de liquide folliculaire.

Le rinçage de la seringue à base d'une solution de NaCl est recommandé après ponction de chaque ovaire.

L'étape finale de ce protocole est le comptage à grossissement (G : 10) et la classification à grossissement (G : 40) des ovocytes observés sous le microscope, ainsi le nombre d'ovocytes et la classe à laquelle ils appartiennent sont mentionnés sur la fiche commémorative.

On a eu recours dans la classification des ovocytes observés au model établi par C.Hanzen.(2004) tableau 04.

Les meilleurs ovocytes observés sont isolés dans des boîtes de pétries, contenant chacune une goutte de NaCl à l'aide d'une micro pipette afin de subir un lavage pour éliminer les débris cellulaires et arriver à avoir une image claire sous le microscope, on fait ensuite des photos de ces ovocytes.

Tableau 04 : Les critères de classification des ovocytes (C.Hanzen.,2004)

	Aspect de cumulus oophorus	Aspect de l'ooplasmе	Photos
Ovocyte de classe 1	-Transparent -Compact et entoure complètement l'ovocyte	- homogène	Figure16
Ovocyte de classe 2	-Transparent. -Compact et entoure Complètement l'ovocyte.	-Irrégulier. -Une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie.	Figure17
Ovocyte de classe 3	-Sombre et moins compact.	-Plus irrégulier et présente des amas plus sombres.	Figure18
Ovocyte de classe 4	-Cumulus est complètement expansé voir absent (ovocyte nu ou naked oocyte)		Figure19



**Photo02 : la Ponction des ovaires
récoltés.**



**Photo03 : Comptage et classification des
ovocytes récupérés.**

3- Résultats :

A- Résultat global de la récolte :

Les résultats obtenus au cours de notre travail sont illustrés dans le tableau suivant.

Tableau 05 : Les résultats globaux des récoltes réalisés.

Récolte	Nombre d'ovaires.	Nombre et taux de follicules.		Nombre d'ovocytes récupérés.	Taux d'ovocytes récupérés.
		<6mm n (%)	>6mm n (%)		
1	06	47 (88,67)	06 (11,32)	37	69,81
2	08	57 (95)	03 (5)	45	75
3	04	45 (86,53)	07 (13,46)	36	69,23
4	04	33 (89,18)	04 (10,81)	24	64,86
5	06	71 (94,66)	04 (5,33)	41	54,66
6	06	57 (85,07)	10 (14,92)	51	76,11
7	07	58 (84,05)	11 (15,94)	55	79,71
8	06	48 (82,75)	10 (17,24)	46	79,31
9	04	29 (85,29)	05 (14,70)	21	61,76
10	06	215 (97,28)	06 (2,71)	131	59,27
Total	57	660 (90,90)	66 (9,09)	487	67,07 ± 12,2
		726			

Durant les 10 récoltes réalisées le nombre et le taux des follicules et des ovocytes récupérés de chaque récolte sont illustrés dans le tableau ci dessus. Dans les 57 ovaires prélevés, 487 ovocytes sont récupérés de 726 follicules ponctionnés ce qui constitue un taux de récupération de 67,07 ± 12,2 %. Avec une moyenne de récupération de 8,54 ovocytes et 12,73 follicules ponctionnés par ovaire.

Le taux de follicules ponctionnés de petites taille (90,90%) est supérieur au taux de follicules ponctionnés de grande taille (9,09%).

B- Etude de la proportion des différents follicules en fonction de leur taille :

Tableau 06 : Le taux de grands follicules par rapport aux petits follicules selon l'état physiologique des vaches.

Etat physiologique	Nombre d'ovaires	follicules ponctionnés	follicules >6mm	follicules <6mm	Taux de follicules >6mm.	Taux de follicules <6mm.
Vaches gestantes	14	147	16	131	10,88	89,11
Vaches non gestante	43	579	50	529	8,63	91,36

Dans les 14 ovaires collectés de vaches gestantes le nombre de follicules de petite taille (<6mm) ponctionnés (131) est supérieur à celui de follicules de grande taille (>6mm) (16), des résultats identiques ont été remarqués sur les 43 ovaires issus de vaches non gestantes, par conséquent le taux de follicules ponctionnés de petite taille ($89,11 \pm 3,5 \%$) est supérieur au taux de follicules ponctionnés de grande taille ($10,88 \pm 3,6 \%$) présents chez les vaches gestantes, ainsi chez les vaches non gestantes le taux des follicules de petite taille ($91,36 \pm 7,8\%$) est supérieur au taux des follicules de grande taille ($8,63 \pm 2,2 \%$). On ne constate pas une différence significative des taux des follicules de petite taille et de grande taille entre les deux catégories de vaches.

C- Classification des ovocytes :

Tableau 07 : La classification des ovocytes récupérés.

Qualité des ovocytes	Nombre d'ovocytes récupérés	Taux d'ovocytes récupérés (%)
Classe 01	67	13,75
Classe 02	243	49,89
Classe 03	99	20,32
Classe 04	78	16,01
Total	487	100

Les ovocytes récupérés de classes 02 constituent le taux le plus élevé (49,89 %), tandis que la classe 01 représente le taux le plus faible, les classes 3 et 4 sont représentés par les taux de 20,32 % et 16,01% respectivement.

D- Influence de gestation sur la qualité des ovocytes récoltés :

Tableau 08: La qualité des ovocytes récupérés de vaches gestantes et de vaches non gestantes.

Qualité des ovocytes.	Vache gestante (14 ovaires récoltés)		Vache non gestante (43 ovaires récoltés)	
	Nombre d'ovocytes	Taux d'ovocytes	Nombre d'ovocytes	Taux d'ovocytes
Classe 1	07	6,60	60	15,74
Classe 2	50	47,16	193	50,65
Classe 3	27	25,47	72	18,89
Classe 4	22	20,75	56	14,69

Les ovocytes récoltés de qualité 1 constituent un taux plus bas soit chez les vaches non gestantes (15,74%) ou chez les vaches gestantes (6,60%), les ovocytes de qualité 2 représentés par les 193 ovocytes récoltés de 43 ovaires des vaches non gestante et de 50 ovocytes récoltés des 14 ovaires de vaches gestantes, constituant ainsi un taux plus élevé de toutes les classes d'ovocytes récoltés, représenté chez les vaches non gestantes et les gestantes par un taux de 50,65% et 47,16% respectivement. Tandis que le taux d'ovocytes récoltés de qualité 3 et 4 chez les vaches gestantes marquer par 25,47% , 20,75% et celui des non gestantes par 18,89% et 14,69% respectivement.

Il est à signaler que la différence n'est pas significative si on compare les taux de différentes classes d'ovocytes des vaches gestantes et des non gestantes.

Tableau 09 : Le Taux des ovocytes de bonne qualité :

Les ovocytes de bonne qualité.	Nombre récupérés.	Taux d'ovocytes récupérés. (%)
Classe 1	67	13,75
Classe 2	243	49,89

Les ovocytes de bonne qualité et qui sont utilisés pour la production d'embryons in vitro sont les classes 1 et 2 selon la classification de Blondin et Sirard (1995) et C.Hanznen (2004) qui ont un cumulus compact et abondant.

Les ovocytes de qualité 1,2 représentés respectivement par les taux de 13,75 et 49,89 % d'ovocytes récupérés, l'ensemble constitue un taux de 63,64%, ce qui fait la majorité des ovocytes récoltés sont de bonne qualité.

E- Influence de la taille de follicule sur la qualité des ovocytes :

Tableau 10 : Le rapport entre la taille de follicules et la qualité d'ovocytes récupérés.

Qualité des ovocytes.	Nombre d'ovocytes récupérés de follicules >6mm.	Pourcentage d'ovocytes récupérés de follicules >6mm.	Nombre d'ovocytes récupérés de follicules <6mm.	Pourcentage d'ovocytes récupérés de follicules <6mm.
Classe 1	04	8,88	63	14,25
Classe 2	16	35,55	227	51,35
Classe 3	14	31,11	85	19,23
Classe 4	11	24,44	67	15,15

On note dans ce tableau que le taux d'ovocytes récupérés de bonne qualité issus de follicules de petite taille (65,60%) est supérieur au taux d'ovocytes de bonne qualité issus de follicules de grande taille (44,43%) , tandis que le taux d'ovocytes de qualité 3 et 4 issus de follicules de grande taille (31,11%vs24,44%) est supérieur au taux d'ovocytes de qualité 3 et 4 issus des follicules de petite taille (19,23%vs15,15%)

F- Influence de corps jaune sur la qualité des ovocytes :

Tableau 11 : La relation entre la qualité des ovocytes récupérés et la présence de corps jaune.

Présence ou absence de corps jaune	Nombre d'ovocytes récupérés par qualité.		Taux d'ovocytes récupérés par qualité.(%)	
	Bonne qualité.	Mauvaise qualité.	Bonne qualité.	Mauvaise qualité.
Présence de corps jaune.	182	120	60,26	39,73
Absence de corps jaune.	128	57	69,18	30,80

Dans ce tableau le taux des ovocytes récupérés de bonne qualité est estimé lors de la présence de corps jaune à 60,26 % face à 69,18% à son absence. Le taux des ovocytes récupérés de mauvaise qualité à la présence de corps jaune est de 39,73% face à 30,80% à son absence.

Vu l'insuffisance de données adéquate concernant l'influence du corps jaune sur la qualité des ovocytes récoltés, il serait difficile d'interpréter les résultats obtenus.

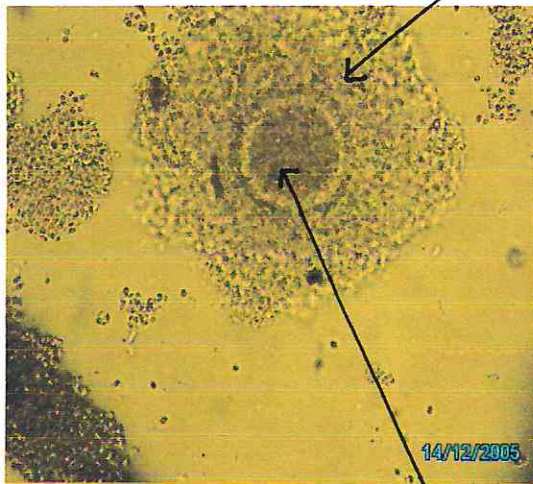
G- Classification des ovocytes :

La classification des ovocytes est basée sur des critères morphologiques (microscope optique inversé) à savoir la compacité des cellules de cumulus oophorus et la transparence de l'ooplasm.

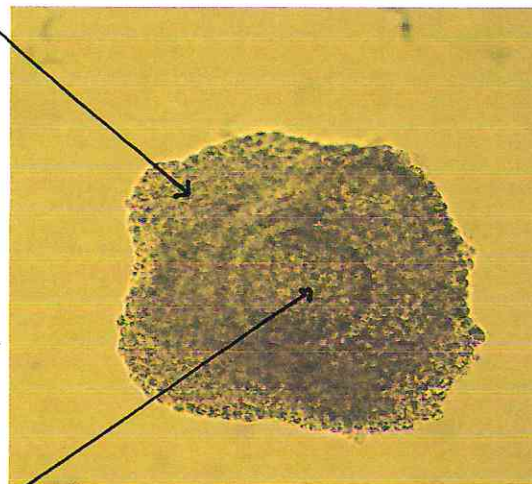
Les photos ci après montrent les différentes classes d'ovocytes récoltés :

Classe 01 :

Cumulus compact et transparent



a

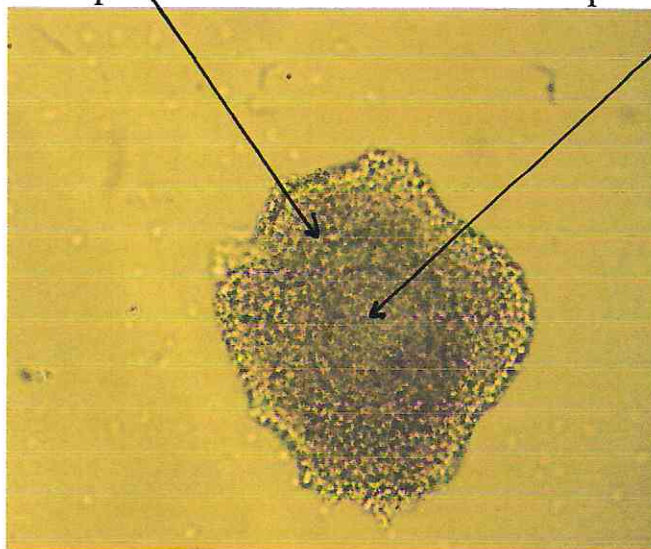


b

Ooplasme est homogène

Cumulus compact

ooplasme homogène

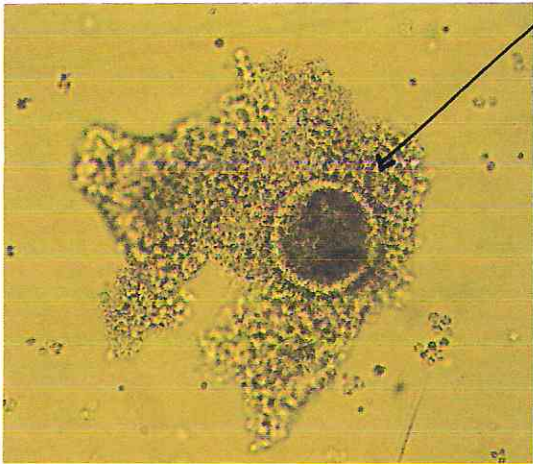


c

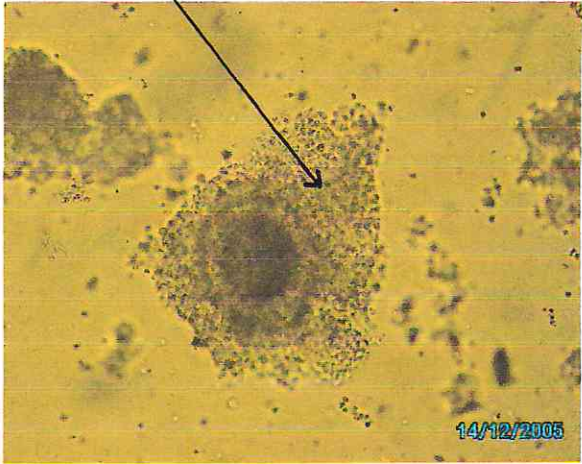
Photos 04: a, b, c : Quelques ovocytes de classe 01.

Classe 02 :

Cumulus compact , transparent



a



b

Des amas sombres présent dans l'ooplasm.

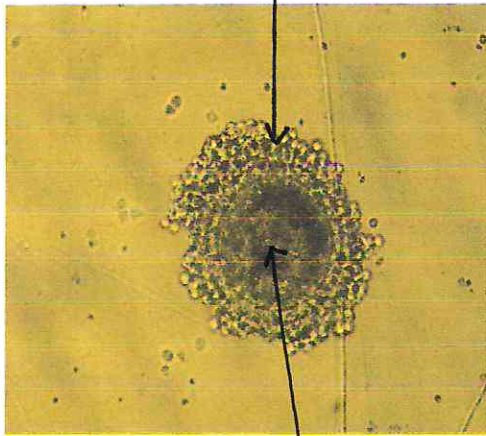


c

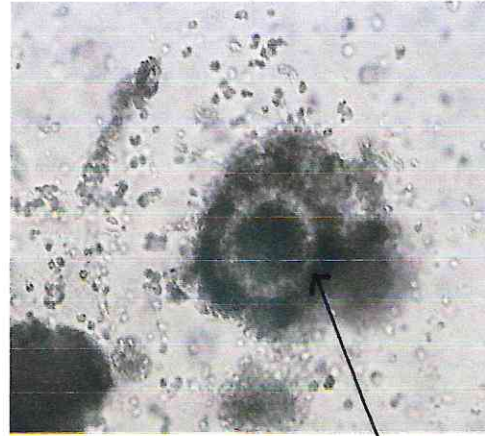
Photos 05 : a, b, c : Quelques ovocytes de classe 02

Classe 03 :

Cumulus oophorus fortement expansé



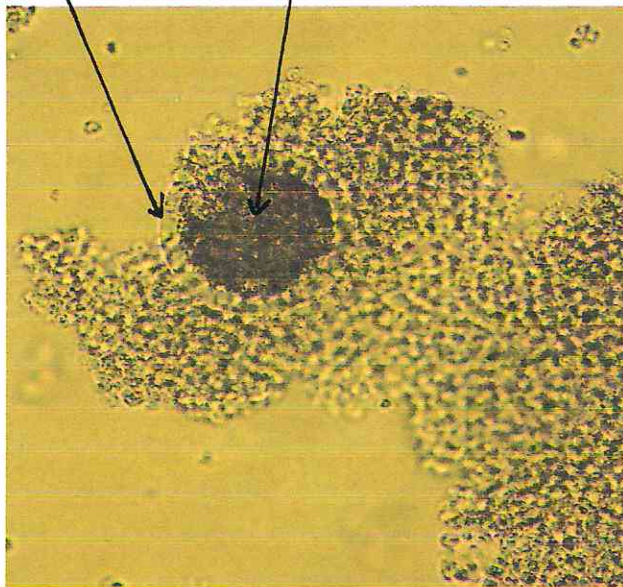
a



b

Un cumulus sombre

Un ooplasme irrégulier
Une zone nue de cumulus



c

Photos 06 : a, b, c : Des ovocytes de classe 03

4-Discussion :

Les résultats obtenus après récupérations des ovocytes par ponction des follicules d'ovaires d'abattoir, sont estimés à un taux de récupération de 67,07% avec une moyenne de récupération de 8,54 ovocytes par ovaire, ceci est comparable aux résultats de Shioya et ses collaborateurs (1988) et qui ont estimé le taux de récupération à 74,30 % et ceux de C. Hanzen (2004) lors de son travail sur les ovaires d'abattoir estimé à un taux compris entre 30 à 60% et une moyenne de récolte de 9 à 16 ovocytes par ovaire, P.Guerin et al (1996) trouve que 6 ovocytes au moyenne sont récoltés par ovaire.

Lors de ponction sur ovaires issus de vaches gestantes, on a remarqué que le nombre de follicules de petites tailles est supérieur à celui de grandes tailles, estimés respectivement à 85,81% et 14,18%, ce même constat cité par C.Hanzen (2004) .

D'après nos résultats la différence n'est pas significative entre le taux d'ovocytes de bonne qualité chez les vaches non gestantes (66,39%) et chez les vaches gestantes (53,76%), Hanzen (2004) rapporte que la qualité des ovocytes prélevés chez les animaux gestants seraient supérieure à celle des ovocytes obtenus sur des animaux non gestants, Guérin et al .,1996 rapporte aussi que la compétence des ovocytes ne semble pas influencée par l'état de gestation.

Les ovocytes de bonne qualité récupérés, représentent le taux le plus élevé (63,64%), ce qui reprend aux résultats obtenus par plusieurs chercheurs notamment ceux observés par Shioya et al (1988) qui rapporte un taux de 57,20% d'ovocytes collectés à partir d'ovaires d'abattoir.

On a remarqué dans les résultats présentés dans le tableau 10 que le taux des ovocytes de bonne qualité issus des follicules de diamètre < 6mm (65,60%) est supérieur à celui des ovocytes de bonne qualité issus de follicules >6mm (44,43%), ce qui est différent des résultats de Hansen (2004) qui rapporte que les ovocytes provenant de follicules dont le diamètre > 6mm produisent d'avantage d'embryon que ceux issus de follicules dont le diamètre < 6mm, cette différence observée par rapport à nos résultats est probablement dû à l'aspiration des grands follicules utilisant une seringue comme moyen d'aspiration et qui nous a conduit à perdre beaucoup d'ovocytes, cela faute de la faible pression d'aspiration et

qu'une fois ponctionner, la paroi du follicules tend à s'affaisser et à former des replis susceptibles d'emprisonner l'ovocyte et de coiffer l'extrémité de l'aiguille (Hansen.,2004).

Selon le tableau 11, l'interprétation des résultats de l'influence de corps jaune sur la qualité des ovocytes récoltés est statistiquement difficile à interpréter, Hansen (2004) constate que la présence de corps jaune sur l'ovaire ponctionné pourrait avoir une influence sur la maturation des ovocytes obtenus et peut être sans influence sur la qualité des ovocytes récoltés. Guérin et al (1996) rapport que la compétence des ovocytes ne semble pas influencée par la présence du corps jaune.

Les photos de différentes classes d'ovocytes illustrées dans nos résultats (Photos04 à 07) sont classées selon le model décrit par C.Hanzen et le tableau 04 montre les critères de classification qui nous ont permet de sélectionner les ovocytes récoltés en quatre classes distinctes.

5- CONCLUSION :

Le travail que nous avons effectué avait deux objectifs, le premier est la maîtrise de la technique de la récolte des ovocytes à partir d'ovaires bovins d'abattoir, en effet il nous a permis d'obtenir un nombre encourageant d'ovocytes car pour la première fois cette technique fondamentale de la fécondation in vitro est initiée en Algérie utilisant des moyens simples pour la récolte, un taux de récupération estimé à 67,07% avec une moyenne de récolte de 8,54 ovocytes par ovaire.

Le deuxième est le point fort de notre travail qui est la classification de tous les ovocytes récoltés car on a pu illustrer le modèle de classification. (Tableau 04) selon la classification de Hanzen 2004

On est arrivé à les classer en quatre classes et de compter les taux de récupération des ovocytes de bonne qualité (qui sont normalement destinés après leur maturation pour la fécondation et la production d'embryons in vitro) et de mauvaise qualité. On a constaté que les ovocytes récoltés de bonne qualité constituent un taux plus élevé par rapport au taux des ovocytes de mauvaise qualité.

Il est à signaler que durant notre travail certaines conditions n'étaient pas à notre disposition citons, le nombre réduit d'ovaires récoltés faute de la non disponibilité des vaches destinés à l'abattage au niveau de l'abattoir du Blida excepté les mardis, ajoutée la disposition du laboratoire une fois par semaine pour effectuer la ponction des ovaires, des difficultés trouvées lors d'aspiration de liquide folliculaire par manque de la pompe aspirante, ce qui nous a conduit à perdre un volume non négligeable de liquide folliculaire par l'utilisation de la seringue.

Enfin, nous dirons que ce modeste travail doit être une clé pour initier des travaux sur la fécondation in vitro en Algérie, cela est devenu nécessaire parce que cette technique peut permettre de proposer une dernière descendance à une vache de haute valeur génétique abattue (réforme ou accident) et qui permet d'obtenir des lots d'ovocytes de race identifiée donc de produire des embryons.

6- Recommandations :

Nous avons constaté lors de notre travail sur les ovaires d'abattoir que nous pouvions avoir des résultats plus satisfaisants si les moyens adéquats pour la récolte des ovocytes sont offerts, pour cela nos recommandations se résument comme suis :

L'impératif d'utilisation d'une pompe aspirante pour la récolte des ovocytes, en effet l'absence de cette dernière nous a poussé à travailler avec une seringue et par conséquent nous avons perdu des volumes de liquide folliculaire à chaque ponction des follicules.

Il est nécessaire pour étudier l'influence de corps jaune sur la qualité des ovocytes récoltés et de mieux interpréter les résultats, d'avoir accès aux données biologiques à savoir la race, l'état sanitaire, état physiologique, les facteurs environnementaux et autres ,d'avoir des échantillons importants répétés dans le temps et dans l'espace.

Il faudrait penser aussi à d'autres techniques de récolte des ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir à savoir la dissection des ovaires qui permet d'obtenir 16 à 17 ovocytes en moyenne par ovaire, la découpe de l'ovaire en tranche (slicing ovary) qui est une méthode qui offre l'avantage d'augmenter le nombre d'ovocytes récupérés (20 à 55 ovocytes par ovaire), ou bien celle impliquant la digestion de l'ovaire en moyen de la trypsine qui permet la récupération d'environ 221 ovocytes par ovaire.

Enfin, puis que le but de la récolte des ovocytes est la fécondation in vitro, il serait très intéressant de penser à la maîtrise des différentes étapes de la FIV.

ANNEXES

&

REFERENCES

ANNEXE 1 : Fiche commémorative.

MATRICE	ETAT PHYSIOLOGIQUE	SITUATION DE L'OVAIRE	STRUCTURES OVARIENNES	NOMBRE DE FOLLICULES PONCTIONNEE		NOMBRE D'OVOCYTES RECUPERES
				inférieur A 6 mm	Supérieur A 6mm	
1		O.DROIT				
		O.GAUCHE				
2		O.DROIT				
		O.GAUCHE				
3		O.DROIT				
		O.GAUCHE				
4		O.DROIT				
		O.GAUCHE				

OBSERVATION :

Matrice	Ovaires	Taille des follicules	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
<u>1</u>	o.droit	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
	o.gauche	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
<u>2</u>	o.droit	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
	o.gauche	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
<u>3</u>	o.droit	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
	o.gauche	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
<u>4</u>	o.droit	Sup 6mm				
		Infer 6mm				
	o.gauche	Sup 6mm				
		Infer 6mm				

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Armstrong, D.T 1993- Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39,7,24.
- 2- Areuds, M.T, Morris, R.G.and wyllie, A.H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuebase-Amj pathol 136,593,608.
- 3- Baerwold, A.R, And Pierson, R.A, (2004). Endometrial development disassociation with ovrain follicular waves during the menstrualcycle.
- 4- Bak, A, Greve, T., and sdmidr, M. (1989) effect of supervulation on reproduction, *theriogenology* 31,169.
- 5- Beaumont, H, H, and Mandl, A, M.(1962).a quantitative and cytological stady of oogoni and oocytes in the foetal and meonatal rat.Proc R Soc London B Biol Sci 155,557.
- 6- Besnard,N.,Pisselet,C.,Monniaux,D.,and Muget,P.(1997).
Proteolytic activity degrading insulin like growth factor-bin ding protein-2,3,-4, and-sin healthy growing and atretic follicles in the pig avary-biol Repod 56,1050-8.
- 7- Bevers MM, DielmanSJ, Van Den Hurk R et al.(Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine .) *Theriogenology*, 1997,47,13-22.
- 8- Black,J.L.,and Etickson,B.H.(1968).Oogenesis and avarian development in the prenatal pig. *Anat Rec* 161,45-55.
- 9- Blondin,P.,Sirard,M.A, oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes.*Mol reprod Dev*,1995. 41(1): p.54-62.
- 10- Bols, P.E.J., Van soom,A.,Vanrose,G.,and kruif,A.(1996) Transvaiginal cyte pick-up in infertile Belgain blue donor cours- *Theriogenology* 45-359.
- 11- Bols,P.E.J.,vandenheed.J.M.M.,vansoom,A.and de kruif, A.(19995) Transuagmal avini Pick-up (OPU) in the cow: a new dispopsuble needle guidance system- *theriogenology* 43,677-687.
- 12- Brow-Tal R., and Yossefi,(1997).Stodies inviro and invitro on the initiation of follicle growth in the bovine avary. *J reprod Fertil* 109,165-71.
- 13- Brem,G.,Reichenbach,H.D.,weibke,N., Wenigerking,H.and plama,G.(1995) in vito production and breeding applications of cattle endryos groduced in vito after repeated endoscopically guided oocyte as piration.(OVP). 67,4-14.
- 14- Buccisne,R.,Schroeder,A.C.,and Fppig,J.J.(1990) interactions between somatic cells and germ cells throughouth mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction* 43, 543-547.

- 15- Bungartz,L., lucas-hahn,A., Rath,D. and Niemann,H.(1995) collection of rocytes from cattle via follicular aspiration aided byuttrasound with or without gonadotrapim pre-treatment and in défferent reproductive stages theriogenology 43,667-675.
- 16-Byskov,A.G.,Regulation of meiosis in mammals. Ann.Biol. Anim. Biochem. biophys. ,1979,19,1251-1261.
- 17- Christeson,R.K.,Ford, T.T., and Redmer,D.A.(1985).Maturation of avarian follicles in the prepubertal girl-J Reprod Fertil suppl 33,21-36.
- 18- Chun,S.Y., Billig,H., Tilly, J-L., Furuta,I., Tsafrir,A.,and Hsuel,A.J.(1994) Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured provulatory follicles: mediatory role of end guenons insulin- like grouth factor 1- Endocrinology 135,1845-53.
- 19- Chun,S.Y., Eisenhauer,K.M., Minami,S., Billig,H.,Perlas,E., and H sueh,A.J.(1996) Houmonal regulation of opoptosis in carly antral follicles: Follicle-stinulating homone as a major survival factor. Eudocinology 137,1447-56.
- 20- Darzinkiewicz,Z., Bruno,S., Del Bimo,G.,W.,G., Hotz,M.Alassota,P.,and traganas,F.(1992).Features of opoptic cells measured by flow cytometry. Cytometry B,795-808.
- 21- De la sota,R.L.,Simmen,F.A.,Diaz,T.,and Thatcher,W-w-(1996). Insulin-like growth factor System in bovine first wave dominant and subordinate follicles. Biol Reprd 55,803-12.
- 22- De loos, F, Kastrop,p , Vannaurik,P ,Vanbeurden,T.H. ,and kruij, T.M.A. (1991).Heterologons celle contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes.Molecular Reproduction and devloperment 28, 255-259.
- 23- De loos,F.A.M., Zeinstra,E.,and bevers,M.M-(1994) Follicular wall maintains meitic arrest in bovine ooyets cultured in vito. M olecular Reproduction and development 39,162-165.
- 24-De loos et al .,1989,oocyte recovry ,57-89.
- 25- Desoivse,B.,and Sen,S.(1992).L'apoptose on mort cellulaire programme Cocepts, mécanismes et apports en cancérologie. Bull cancer 79, 413-425.
- 26- Driancourt,M.A.,Cahill,L.P.,Bindon,B.M. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in boorola and control Merino ewes.J. Reprod.Fert., 1985,73,93-107.
- 27-Driancourt, M. Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology, 1991, 35,55-79.
- 28- Driancourt,M.A., Gougeon,A., Royere,D.(1991) la fonction ovarienne.Dans la reproduction chez les mammifères et l'homme.thibault C, Levasseur MC.Eds Ellipses INRA, 273-298.

- 29- Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55,1211-39.
- 30- Driancourt, M.A., Reynand, K., Cortvindt, R., and Smits, J. (2000)- Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod*, 143-52.
- 31- Driancourt, M.A., and Thuel, B. (Control of oocyte growth and maturation by follicular dev 38,345-62.
- 32- Dufour, J., Cahill, L.P., Mauleon, P. (1979) Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J.Reprod.fert.* 57,301.
- 33- Eppig, J.J., and Dours, S.M. (1984) Chemicals Signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 30,1-11.
- 34- Erickson, B.H. (1996)-Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. reprod.fert.* 10,97-105.
- 35- Erickson, B.H. (1996b). Developmental and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim.Sci.* 25,800-805.
- 36- Findlay, J.K. (1993). An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *biol.Reprod.*, 48,15-23.
- 37- Flecher, W.H., Greenan, J. (1985). Receptor mediated action without receptor occupancy. *Endocrinology.*, 116,1660-1662.
- 38- Flechon, J.E., Motlik, J., Hunter, R.H., Flechon, B., Pioko, J., and Fultra, J. (1986) Cumulus oophorus mucification during resumption of meiosis in the pig. A scanning electron microscope study. *Reprod Nutr Dev* 26,989-98.
- 39- Fortune, J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *biol.reprod.*, 50,225-232.
- 40- Fujimoto, T., Yoshinaga, K., Kono, I. (1985). Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *anat Rec.*, 2,11271-278.
- 41- Garrett, W.M., and Guthrie, H.D. (1997) steroidogenic enzyme expression during preovulatory follicle maturation in pigs. *Biol reprod* 56.
- 42- Ginther O.J., Bergfelt, D-R., Beg, M.A., and Kat, K. (2001). Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biol Reprod* 65,345-50.
- 43- Ginther, O.J. Kastelic, J.P., Knopf, L. (1989a). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Amin. Reprod. Sci.*, 20, 187-200.
- 44- Gordon, I. (1996). *Reproduction in: cattle and buffaloes*. Vol 1. Cab international, UK.

- 45- Gordon,I.(1994).laboratory production of cattle embryos.In “Bio tednology in agriculture”,vol 1.11 Edition by I Gordon.Cal international,Wallingford UK,pp.640p.
- 46- Gordon, I., and Lu, K. (1990).Production of embrgos in vito and its impact on livestock production.Theriogenology 33, 77-87.
- 47-Gosden R, Krapez J, Briggs D .Growth and development of the mammalian oocyte.BioEssays 1997; 19:875-82.
- 48- Gospodarowicz,c.,and Bialock,!H.(1978).The effects of the epidermal and fibroblast frowth factors on the replicative lispans of cultured bovine granulasa cells.Endocrinology,103,854-865.
- 49- Gougen,A.(1982). Rate of follicular growth in human ovary. Dans Rolland R, Van Hall E, Hillier SG, Eds. Follicular maturation and ovulation. Excerpta , Amsterdam, 153-163..
- 50-Guenard,H.,Boisseau,M.R.,carré,F.,Deville,P.,Hanoune,Harf,A.,Iacour,J.R.,Iamour,Y., Lévy,B.,Marthan,R.,Martineaud,J.P.,Minaire,Y.,MinF.,Paillard,M.,suynghedauw,B.,Varène,P .,andVincent,J.(1996).”Physiologie ».Editions frodel,4 ;passage de la Main d’or,paris.
- 51- Guerin,P.,Guyader-Joly,C.,Mermillod,B.,et Leguienne,B.(1996) Point veterinaire,vol.28 numéro spécial « Reproduction des ruminants.P14-17.
- 52- Gulhrie,H.D.,and Garrett,W.M.(2001).Apoptosis during folliculogenesis in pigs.reprod Suppl 58,17-29.
- 53- Guthrie,HD.,Grimes,R.W.,goger,B.S.,and Hannond,J.M.(19995).Follicular atresia in pigs nueasurment and physiology.J anim sci73,2 834-44.
- 54-Guthrie,H.D.,Welch,G.R.,cooper,B.S.,Zakaria,A.D.,andJohnson;L.A.(1994).Flow cytonetic determination of degraded deaxyrborucleic acid in gronulasa cells to edentofyatretic follicles during preovulatory maturation in the pig.Biol Reprod 50,1303-1311.
- 55- Hage,A.J., Groenklevant,A.C.,Welschen,R. Follicle Growth in the immature rat ovary. Acta Endocrinol., 1978, 88, 375-382.
- 56- Hamamah,S.,et Ménézo,(1999).”Ovocyte et Embryon de la.Physiologie à la phathologie.édition marketing S.A.32 rue Bague,Paris.
- 57-Hanzen,C.,2004.Thèse : La production d’embryons in vitro,2^{ème} doctorat.
- 58- Henderson,S.A., Edward,R.G. Chiasma frequency maternal age in mammais. Natural, 1968, 218-228.
- 59- Hisushfield,A.N.(1991).Theca cells may be present at the outset of follicular growth.Biol Reprod 44,131- HOPPER (H.W.), SILCOX (R.W., Follicular evelopment in propubertal heifers. Amin. Reprod. Sci., 1993, 3, 17-12.
- 157-62.

- 60-Hulshof,S.C.J.,Figuereido,J.R.,Beckers,J.F.,Bevers,M.M., Venden hurk,R.(1994).Iso lotin and charatenzation of préantral follicles from foetal ovaries,Vet.cluarterly,16,78-80.
- 61- Hyttel,P,Fair,T.,Colleson,H.,and Greve,T.(1997). Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle.theriogenology 47,23-32.
- 62- Hyttel,P.,greve,T.,and Callense,H.(1989).Vltrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle-J. Reprod.Fertil.Suppl.38, 35-47.
- 63- Izadyar F, Hage WJ,Colenbrander B etal (The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation .) Mol Reprod Dev,1998,49,444-53.
- 64- Johnson,J,Canning,J.,Kaneko,T.,Pru,J.K.,and tilly,J.L.(2004). Germline stem cells and follicular unewal in the posttatal mammalian ovary, Nature 428,145-50.
- 65-Kotsuji F, Kubo M , Tominaga T .Effet of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes .J Reprod Fert 1994 ; 100 : 151-6.
- 66-Lodish,H.,Berk,A.,Zipurski,S.L.,Motsudaira,P.,Baltimore,D.,and Darnell.(2001).” Molecular cell Biology” .W.H. Freenuman and comary, New York.
- 67- Lonergan L, Carolan C, Van Langendonck A etal .(Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplatation embryo development in vitro .)Biol Reprod,1996,54,1420-9.
- 68-Lonergan P,Khatir H , COROLANC , Mermillod P. Bovine blastocyst production in vitro following inhibition of oocyte meitic resorption for 24 h . j reprod fertile 1997;109:355-65.
- 69- Lussier,J., Matton,P., Dufour, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J. Reprod. Fert., 1987, 301-307.
- 70-Marcinkowski, D.P.,Ludwicki.M., Ghafourt.A.(1980).A non-surgical technique for the recovery of follicul fluid from cattle ,with possible applications to ova and embryo culture .theriogenology 13,104.
- 71- Maruo,T.,Lodines-L lave,C.A.,samoto,T.,Matsuo,H.,and Manalo,A.S.(1993)Expression of epidermal gruth factor,H.,and its receptor in the human avary during follicular growth and regression. Endocrinology 132,924-931.
- 72- Maxson,W.S., Hanez,A.F., and Schomberg,D.W(1985). Steroid ogensis in porcine atretic follicles: Lass of oromatase activity in isolated gramulsa and theca.Biol Reprod 33,495-501.
- 73- Moor,R-M.,and Trounson,A.O.(19977) hounonal and follicles factors oflecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity.J.Repord.Fertil.49.101.109.

- 74- Mori,T.,Anono ,T.,and Shimizu,H.(200).Roles of gap junctional communication of cumulus cells *reprod.*62,913-91.
- 75- MurdochWJ,VanKirkEA(Estrogenic upregulation of DNA polymerase β in oocytes of preovulatory ovine follicles). *Mol Reprod Dev* ,2001,58,417-423.
- 76-Palermo G.D., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340, 17-18.
- 77-Peters,A.R and P.J.H Ball ,*Reproduction in cattle-1987-1994 Butter worth-UK.*
- 78- Peters,H., Byskov,A.G., Faber, M. Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. *Excerpta Medica*, 1973, 20-23.
- 79- Presicce,G.A., Jian,S.,Sim kin,M.,and Yang,X.(1995) oocyte quality and embryo development in prepubertal calves.*Biology of Reproduction* 52(suppl.1),127.
- 80- Rath,D.(1993) Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine embryos. *Embryo.Transfer newsletter* 11(2),10-15.
- 81- Reed,M.,burton,FA.,and Van diest,P.A.(1979).Ovulation in the guinea-pig.I-the ruptured follicle-*J A nat* 128,195-206.
- 82- Reichenbach,H.D., Weibke,N.H., besenfelder,V.H.,Modl,J.and Brem,G.(1993) Transvaginal laparoscopic guided aspiration of bovine follicular oocytes: Preliminary results.*Theriogenology* 39,295.
- 83- Reichenbach,H.D.,weibke,NH., Modl,J.,Zhu,J.,and Brem,G.(1994) laparoscopy through the vaginal fornix of cows of the repeated aspiration of follicular oocytes-*Veterinary Record* 135,353-356.
- 84- Reinders, J.M.C.,and Van wagten de ouk-de leeuw,A.M.(1996).improvement of MOET program by addition of in vitro production of embryos after ovum pick-up from donor heifers.*Theriogenology* 45,354.
- 85- Revel F.,M ermillod ,P.,Peynot,N.,renard ,J.P.,and Heyman. Y.(1995).Low developmental capacity of vitro of reproduction and *Fertility* 103(1),115-120.
- 86-Rick,G.,Hadelar,K.G.,Lemme,E.,Lucas-Hahun,A.,Rath,D.Schindler,L.,and Neimann,H.(1996)-Long-term ultrasound guided ovum pick-up in heifers from 6 to 15 months of age.*theriogenology* 45,356.
- 87- Roche,J.F.(1996).Control and regulation folliculogenesis-a symposium in perspective. *Reviews of reproduction* 1.19-27.
- 88- Rodgers,R.J.,Van wezel,I.L.,Irrving-Rodgers,H.F.,Lavromos, T.C., Irvine ,C.M., and krupa ,M,(1999)-Roles of extracellular matrix in follicular development.*J Reprod fertile suppl* 54,343-52.

- 89-Roelofsen-vendrie,M. W.,boir,r.,Wirth,Y. A.,Picterse,M. C.,and Kruip,P.A.M.(1994).Application of the orrum pick-up technique, to cows, Tijdschrifts moor diergenees kunde 119,61,63.
- 90- Roy,S.K.,Ogren,C.,roy,C., and lu,B.(1992).Cell-type specific localization of transforming growth factor-2 and transforming growth factor-1 in hamster avary: differential regulation by follicle stimulating homone and luteinizing home.biol reprod 46,595-606.
- 91- Russe, I. (1983) Oogbenrsis in cattle and sheep.biblio.anat .24, 77-92.
- 91- Ryan,D.P.,B lake wood,E.G.,swanson,W.F.,rodiegnes,H.and Godke,R.A.(1993).Vesting homone-treated pegnant cours aspotentil source of oocytes for in vitro fertilization.Therio genology 40, 1039-1055.
- 93-Savio,J.D., Boland, M.P., Hynes, N. Resumption of Follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. J. Reprod. Fert., 1990, 88, 569-579.
- 94- Saumande,J.(1991).La folliculo genése chez les ruminants.Rec Med vet 167 :205-218.
- 95-Shioya,Y. M,Kuwayama,M.Fukushima, S.Iwassaki ,and A.Hanada.1988.In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro .Therigenology.30(3) :488-499.
- 96- Silvac C,Kuight PG(Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental compentance of in vitro.matured bovine oocytes.)Biol Reprod ,1998,58,558-565.
- 97- Sinowatz,F.,Wessa,E.,Neumuller,C.,and Palma,G.(2003). On the species specificity of sperm binding and sperm peretralison of the zona pellucida.Reprod domest anim 38,141-6.
- 98- Sirard, M.A., Florman, H.M., Leibried-rutledge, M.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of ovine oocytes. Biol. Reprod.,1989, 40, 1257-1263.
- 99- Skinner,M.M., keski-oja,J.,steen,K. G.,and Moses,H.L.(1987).Ovarian thecal cells prodnce transforming growth factor-wich regulate granulosa cell growth.Endocrinology 121,786-792.
- 100-Smith,L.C.,M.Olivera-Angel,N.P.Groome,B.Bhatia,C.A.Price.1996.Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle .J.Reprod.Fertil .106:193-199.
- 101- Snow,M.H.L., Monk, M. Emergence and migration of mouse Cells. Dans McLaren A, Wilie CC, Eds. Current problems in germ cell differentiation. Cambridge University.
- 102- Soede,N.M.,kemp,B., and noordhuizen,J.(1992).the duration of orlation in pigs,studied by transrectal wltra songraphy,is not realated early embryonic diversity-theriogenology 38,653-666.

- 103- Soriano, P., Jaenisch, R. Retroviruses as probes for mammalian development allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell*, 1986, 461-929.
- 104- Spicer, L.J., Alpizar, E., and Ehternkamp, S.E. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, gonadotropin bovine granulosa cell proliferatin, progesterone production, estradiol production and insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim Sci* 71, 1232-1241.
- 105- Stevens, A., and Lowe, J. (1997). "Human histology". Times Mirror international publishers limited, Paris, Bruxelles.
- 106- Sunderland, S.J., Growe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.F., Ireland, J.J. (1994). Selection, Dominance and atresion of follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* 101, 547-555.
- 107- Tesarik J, Mendoza C (Direct non-genomic effect of follicular steroids on maturing human oocytes : oestrogen versus androgen antagonism. (Review) (20 refs) *Hum Reprod Update*, 1997, 3, 95-100.
- 108 – Thibault, C., and Levasseur, M (2001)". La reproduction chez les mammifères et l'homme. » INRA, Paris.
- 109 – Tilly, J., Tilly, K., Kenton, M., and Johnson, A. (1995), Expression of members of the BCL – 2 gene family in the immature rat ovary : engine chorionic gonadotropine – mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax. And constitutive BcP-2 and BcP-x messenger ribonucleic acid levels. *End* 136, 232-241.
- 110 – Tilly, J. L. (1996). Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1, 162-72.
- 111 – Tilly, J.L., Billing, H., Kowalski, K.I., and Hsueh, A.J (1992). Epidermal growth factors suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 6, 1942-50.
- 112 – Tilly, J L., and Hsueh, A. J. (1993). Microsome autoradiographic method for qualitative and quantitative analysis of oocyte DNA fragmentation. *J Cell Physiol* 154, S19-26.
- 113 – Tsaliriri, A., and Dekel, N. (1994). Molecular mechanisms in oogenesis. In "Molecular Biology Female Reproductive System". (J.K. Findlay, Ed.), PP. 207-258. Academic Press, San Diego.
- 114 - Tsaliriri, A., Dekel, N., and Bar-Ani, S. (1982). The role of oocyte maturation inhibition in follicular regulation of oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility* 64, 541-551.
- 115- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H., Liu J., Staessen C., Smitz J., Wisanto A., Devroey P., 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8, 1061-1066.

- 116 – Van Wezel, I., and Rodreges, R. J., (1996). Morphological characterization of bovine Memordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod* 55,1003-1011.
- 117- Wandji, S.A., Pelletir, G., and sirard, M.A. (1992). Ontogeny and cellular localization of I-125-Labeled basic fibroblast growth factor and I- 125-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biology of reproduction* 47,807-813.
- 118- Wang, S., H olyoak, R.G., and bunch, T.D. (1994). the effects of operation fluids containing different anticoagulants in the development copobility of bovine oocytes. *Journal of animal Science* 72(suppl.1)/ *Journal of dairy Science* 77 (suppl.1),375.
- 119- Webb, R., Gong, J.G., Bamley, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Teriogenology*, 1994, 41, 25-30.
- 120- Weibke, N. (1993) Ex vivo collection of bovine cumulus oocytes complexes by tranvaginal follicular aspiration guided by loperoscopy thesis, University of Munich, 109pp.
- 121- Westergaard, L. Callesen, H., Hytetl, P. Meiosis inducing substances (MIS) in bovine provulatory follicles. *Zuchthygiene*, 1985, 20, 217-221.
- 122- Witschi, Langmana, Migration of the germ cells of human embryos from the yolksac to the primitive gonadal fold. *Contrib Embryol.*, 1948, 326-70.
- 123- Woollianus, J.A., and Wilmot. (1989). Embryo manipulation in cattle breeding and production 48,3-30.
- 124- W, M, F., huang, W.T., Tsay, C., Husu, H.F., liu, B.T., Chiou, C.M., Yen, S.C., Cheng, S.P., and Ju, J.C. (2002). The stage-dependent inhibitory effect of porcine follicular cells on the development of preantral follicles. *Anim Repord sci* 73,73-88.
- 125- Xu, Z., G arverik, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Hamilating S.R., and Youngquist, R.S. (1995). Expresion of follicle-stimulating homone and luteinizing homone receptor messenger ridoruclaic acids inbovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 53,951-957.
- 126- Yanagimachi, R., Mammalian fertilization lu: Knobil E, Neill J D. (Eds). The phehysiology of reproduction-Second edition. Reven Press Ltd, New york, 1994, 189-317. I N: Hamzen Ch ., Hourtie, O., Drin, P.V .2000 .Le developpement folliculaire chez la vache: I.Aspects morphologiques et cinétiques. *Aun. Med. Vet.* 2000, 144, 223-235.
- 127- Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mous and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 1990b, 63, 213-221.