



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies & Agro-Ecologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Etude de l'effet du milieu de culture sur la maturation
in-vitro des ovocytes bovins**

*Présenté par
Chalah Zineb et Ramdane Amel*

Devant le jury :

<i>Benazzouz Fella</i>	<i>MAA</i>	<i>SNV, USDBlida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Djazouli-Alim Zaha</i>	<i>Professeur</i>	<i>SNV, USDBlida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Adel Djallal</i>	<i>MCB</i>	<i>ISV, USDBlida1</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Boukenoui-Ferrouk Nouria</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, USDBlida1</i>	<i>Co-Promotrice</i>

Session 2021/ 2022

Dédicace

Avec l'aide de DIEU le tout puissant est achevé le présent travail, Je dédie ce mémoire :

♥ *A mon père **Mohammed**, Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

♥ *A ma mère **Razika**, Quoi que je fasse ou quoi que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles*

♥ *A mes frères **Mahmoud et Hakim** et ma sœur **Manel** , qui m'avaient encouragé tout le long de mes études, m'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, et qui par leur soutien, leurs conseils et leur amour, m'ont permis d'arriver jusqu'à ici car ils ont toujours cru en moi, Merci d'avoir toujours soutenu et merci pour tous les bons moments passés ensemble, et ce n'est pas fini.*

♥ *A la femme de mon frère **Khadidja**, puisse Dieu te donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.*

♥ *A mes adorables **Ines et Rihem**, je vous souhaite tout de bonheur et réussite dans la vie.*

♥ *A ma binôme **Chalah Zineb** et sa famille merci de m'avoir aidé lorsque j'avais besoin d'aide. Je te souhaite tous les bonheurs du monde.*

♥ *A ma copine **Loubna Messiouri** mes vœux les plus sincères à mon incroyable sœur tu comptes tellement à mes yeux ma chérie que Dieu te protège, t'accorde santé, succès et plein de bonheur dans ta vie.*

♥ *A ma cousine **Souad** Je te souhaite beaucoup de succès, de prospérité et une vie pleine de joie et de bonheur.*

♥ *A mes belles amies (**Souad ; Fadia; Loubna; Kaouther**) qui m'ont toujours donné le sourire dans les moments difficiles.*

♥ *A tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

♥ *A TOUTE MA FAMILLE*

A Mes tantes ; Mes oncles et leurs enfants

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements.

Dédicace

En témoignage d'amour et d'affection , je dédie ce modeste travail avec une grande fierté a tous ceux qui me sont chers :

♥ *Ma très chère mère **Yamina** , qui a œuvré pour ma réussite , de par son amour , son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux consetis, pour toute son assistance et sa Présence dans ma vie.*

♥ *Mon très cher père **Hassan** , qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de Sacrifices et de privation pour m'aider à avancer dans la vie . Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je suis puisse vous combler de bonheur .*

♥ *Ma merveilleuse petite famille **Aicha et Khadija et Asma et Muhammad et Abd el Malak**. Que Dieu vous donne la santé, le bonheur et le succès. Merci pour tout ce que vous m'avez donné .*

♥ *Ma cher binôme **RamdaneAmel** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout ou long de projet . Dieu vous protège .*

Merci pour tout et pour votre gentillesse, vous être meilleures familles.

Remerciements

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

La réalisation de ce Projet a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute nos gratitude.

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

*Je remercie en particulier **Dr Benazzouz F** qui nous a donné l'honneur d'accepter la présidence de jury et qui n'a pas hésité à m'encourager, me motiver et m'orienter et m'apporté beaucoup de soutien sur ce mémoire et sur ma future carrière .*

*Nos vifs remerciements vont aux membres de jure pour avoir accepté de juger notre présent travail et en particulier **professeur Djazouli Alim Z** .*

*Mes remerciements **Dr Boukenoui-Ferrouk N** pour son savoir-faire, sa compétence, sa patience, et ses conseils bien avisés, pour ses remarques constructives qui ont contribué à l'amélioration de ce mémoire .*

Mes remerciements également à toutes les équipes des abattoirs d'eucalyptus et l'équipe du laboratoire de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida.

On réserve une pensée spéciale à tous les enseignants de notre spécialité Biotechnologie et Pathologie Moléculaire qui ont sus nous donner une formation didactique et appréciable tout au long de notre cursus.

Nous tenons également à remercier tous ceux qui nous ont épaulé et soutenu tout au long de l'élaboration de ce mémoire pour leur compréhension et encouragement.

Enfin, Un gros merci également à nos familles pour leurs soutiens aussi bien moral que financier et pour leurs sacrifices.

Sommaire

Dédicace	
Remerciements	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction	1
Partie bibliographique	2
1. Anatomie et histologie de l'ovaire	3
2. Ovogenèse	3
3. Folliculogenèse	4
3.1. Vagues folliculaires	7
3.1.1. Folliculogenèse basale	7
3.1.2. Folliculogenèse terminale	7
3.1. Régulation hormonale de la fonction ovarienne	8
4. Collecte des ovocytes bovins <i>in vivo</i>	14
5. Collecte des ovocytes à partir des ovaires prélevés sur des animaux abattus (<i>ex vivo</i>)	15
5.1. Collecte et acheminement des ovaires	16
5.2. Ponction des follicules	17
5.2.1. Ponction par aspiration	17
5.2.2 Slicing des ovaires (tranchage)	17
5.2.3. Digestion enzymatique	18
6. Classification des ovocytes récoltés	18
6.1. Evaluation sur la base des caractéristiques morphologiques du cumulus oophorus	18
6.2. Evaluation selon l'aspect de la chromatine de la vésicule germinale	20
7. Maturation <i>in vitro</i> des ovocytes sélectionnées après classification	22
7.1. Choix des ovocytes pour la maturation et la fécondation <i>in vitro</i>	22
7.2. Milieux de maturation	22
7.2.1. Milieux de base	22
7.2.2. Milieux de maturation et additifs	23

7.3. Conditions de la mise en incubation et maturation <i>in vitro</i>	28
7.4. Evaluation et classification des ovocytes après la maturation <i>in vitro</i>	28
7.4.1. Degré d'expansion du cumulus	28
7.4.2. Maturation nucléaire	29
7.4.3. Maturation cytoplasmique	29
8. Fécondation et mise en culture.....	29
9. Transfert d'embryon.....	30
Partie matérielle et méthode.....	31
1. Matériel et méthode.....	32
1.1 Matériel biologique	32
1.2. Matériel de collecte et d'observation	32
2. Méthode	33
2.1. Récolte et acheminement	33
2.2. Ponction des follicules	34
2.3. Préparation du liquide folliculaire	35
2.4. Observation de boîte de pétri.....	37
2.5. Collecte et rinçage des COCs	37
2.6. Milieux utilisés pour la Maturation <i>in vitro</i>	38
2.7. Mise en culture des COCs	38
Résultats	39
Discussion	46
Conclusion	50
Références bibliographiques.....	52
Annexes	62

Liste des tableaux

Tableau 1 :Taux de récupération des COCs dans les 03 prélèvement.....	41
Tableau 2 : Pourcentage des COCs selon leurs classes.....	42
Tableau 3 : Résultats du premier milieu après maturation <i>invitro</i>	43
Tableau 4 : Résultats du deuxième milieu après maturation <i>invitro</i>	43
Tableau 5 : Résultat du troisième milieu après maturation <i>invitro</i>	44
Tableau 6: Taux global de maturation <i>invitro</i>	44
Tableau 7 : Tableau synthétiques de ponction des ovaires, des milieux et des conditions de leur transport.....	63
Tableau 8 : Tableau synthétique des milieux et des conditions de la maturation ovocytaire <i>invitro</i>	64

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.
AGNE : Acides Gras Non Estérifiés.
ARN : Acide Ribonucléique.
ARNm : ARN messenger.
BAF : Bovine Aminioc Fluid.
BSA : Bovine serum Albumin.
CC : Cellules de Cumulus.
COC : Complexes Ovocyte Cumulus.
CO₂ : Dioxyde de Carbone.
CYP19A1 :Cytochrome p450,family19 SubfamilyA 1.
DPBS :Dubelcco Phosphate Buffered Saline.
ECS : Sérume de vache enchaleur.
EGF : Epidermal Growth Factor.
E2 : œstradiol.
FFB : Fluid Follicular Bovine
FBS : Foetal Bovine Serum.
FF : Fluid Follicular.
FGFs : Fibroblaste Growth Factor.
FIV : Fécondation *in vitro* .
FSHR :Follicle Stimulating Hormone Receptor.
FSH : Follicle Stimulating Hormone.
CG : Cellule de la Granulosa.
GDF-9 : Growth and Différenciation Factor9.
GnRH: Gonadotrophin-Releasing Hormone.
GV0 : Germinale Vesicle 0.
GVB : Germinale Vesicle Break.
Ham's-F12 : Milieu de Ham F12.
HCO₃ : Bicarbonate.
HIOCs : Hydrophobic Ionizable Organic Compounds.
IGF-2 : Insulin-like Growth Factor 2.
IGFBP : Insulin-like Growth Factor-Binding Protein.
IVM : *InVitro* Maturation.

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1 ou somatomédine C.

LHCGR : Luteinizing Hormone/Chorio Gonadotropin Receptor.

LH : Luteinizing Hormone.

MIV : Maturation *in vitro*.

MEM : Milieu Essentiel Minimum.

NaCl : Chlorure de Sodium.

O₂ : Dioxygène.

OPU : Ovum Pick Up.

PBS : Phosphate-Buffered Saline ou solution tamponnée au phosphate.

pH : Potentiel Hydrogène.

PIV : Production d'embryon *In Vitro*.

ROS : Réactive Oxygenspecies SM.

SOF : Synthetic Oviduct Fluid.

SVF : Sérum de Veau Fœtal.

TCM199 : Tissue Culture Medium 199.

TC : Lymphocytes T

ZP : Zone pellucide.

3B HSD : 3bêta Hydrox stéroïde Déshydrogénase.

Résumé

Notre étude a été réalisée afin de choisir un milieu favorable pour la maturation *in vitro* des ovocytes bovins par trois milieux différents, les ovocytes ont été récoltés après la ponction des ovaires d'abattoir, ces derniers ont été prélevés à partir des vaches abattues et acheminés dans une solution saline (NaCl 0,9%) seule à une température comprise entre 20 à 25°C, nous avons testé 03 milieux de maturation *in vitro* des ovocytes bovins, nous avons choisi le milieu TCM199 comme milieu de base.

D'après nos résultats, le taux global de maturation 65,16%. Dans le premier milieu, nous avons testé le milieu de base seule (TCM199) et a donné un taux de maturation égal à 65,21%, Dans le deuxième milieu, nous avons enrichi le milieu de base avec 10% de liquide folliculaire, ce qui a donné un taux de maturation égal 58,62%. Dans le troisième milieu nous avons enrichi le milieu de base avec 50% de liquide folliculaire ce qui a donné un taux de maturation de 72,54% le taux le plus élevé.

à partir de ces résultats, nous avons constaté la nécessité de développer certaines techniques de manipulation et d'enrichissement du milieu de base afin d'améliorer la qualité ovocytaire et augmenter les taux de maturation *in vitro*.

Mots clés : maturation des ovocytes, ovocyte, *in vitro*, bovin, milieu de culture

Abstract

Our study was carried out in order to choose a favorable medium for the *in vitro* maturation of bovine oocytes by three different media. The oocytes were collected after the puncture of the slaughterhouse ovaries, the latter taken from slaughterhouse cows and were transported in a saline solution (NaCl 0.9%) at a temperature between 20-20°C. We tested 03 *in vitro* maturation media of bovine oocytes. We chose the TCM199 medium as the base medium.

Based on our results, the overall maturation rate is 65.16%. In the first medium, we tested the basal medium alone (TCM199) and gave a maturation rate of 65.21%. In the second medium, we enriched the basal medium with 10% follicular fluid, which gave a maturation rate of 58.62%, In the third medium, 50% follicular fluid was added to the basal medium which gave a maturation rate of 72.54% the highest rate.

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

Key words: maturation of oocytes, oocytes, *in vitro*, bovine, medium cultur

ملخص

أجريت دراستنا من أجل اختيار وسط مناسب للنضج المختبري لبويضات الأبقار من خلال ثلاث اوساط (0.9% كلوريد الصوديوم) مختلفة ، وكانت الأخيرة تم أخذها من الأبقار المذبوحة ونقلها في محلول ملحي اوسط نضج في المختبر 03 درجة مئوية ، قمنا باختبار 25 إلى 20 وحده عند درجة حرارة تتراوح بين . باعتباره الوسط الأساسي TCM199 من البويضات البقري ، لكننا اخترنا وسط

في الوسط الأول ، اخترنا الوسط القاعدي وحده .65.16% وبحسب نتائجنا فإن المعدل الإجمالي للنضج في الوسط الثاني، قمنا بإثراء الوسط الاساسي بسائل .65.21% وأعطينا معدل نضج يساوي (TCM199) ، في الوسط الثالث قمنا بإثراء الوسط الاساسي %58.62، مما اعطى معدل نضج يساوي %10 جريبي بنسبة . القيمة الاعلى %72.54 من السائل الجريبي و الذي اعطى معدل نضوج %50 ب . من هذه النتائج ، وجدنا الحاجة إلى تطوير تقنيات معينة لمعالجة وإثراء الوسط القاعدي لتحسين جودة ..البويضات وزيادة معدلات النضج في المختبر

كلمات مفتاحية: نضج البويضات، بويضات، ابقار، وسط

Introduction

La reproduction joue un rôle fondamental dans la production animale, non seulement elle multiplie les animaux à élever, mais elle est aussi l'instrument principale sur lequel se base l'amélioration génétique et la sélection. Les progrès récents de la biotechnologie nous ont permis de produire des bovins clonés et génétiquement modifiés en manipulant des embryons produits *in vitro* (Al-Zi'abi et al., 2002). Cependant, l'efficacité est encore extrêmement faible, principalement en raison de la faible compétence du développement des embryons manipulés. Pour améliorer cette situation, les systèmes IVM (maturation *in vitro*) pour les ovocytes bovins dans les systèmes de production d'embryons *in vitro* doivent être améliorés.

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

Le but de notre étude est d'améliorer les techniques et choisir les milieux adéquats pour avoir un taux de maturation élevé par la sélection des ovaires avec des follicules compétents dans un abattoir et de la vue attachée des ovocytes dans un laboratoire, et de l'IVM des ovocytes sous état redox pour améliorer la compétence développementale des ovocytes IVM chez les bovins.

L'étude de notre travail a été divisée en quatre parties :

Une première partie, consacrée à une revue bibliographique sur le sujet

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans le cadre de cette étude.

La troisième partie contient les principaux résultats obtenus.

La quatrième partie contient une discussion, conclusion générale, avec les références bibliographiques et une partie des annexes clôturent ce manuscrit.

Partie

bibliographique

1. Anatomie et histologie de l'ovaire

L'ovaire est la gonade femelle. C'est un organe pair en forme d'amande aplatie mesurant entre 2 et 5 cm de long, 1,5 et 4 cm de haut et 1,5 à 3 cm de large (Fig.1). Ils sont situés en position latérale dans la cavité pelvienne avec un poids variable dépendant de l'âge de l'animal (1 à 2 g à la naissance, 4 à 6 g à la puberté et une quinzaine de grammes chez l'adulte) et la localisation (l'ovaire droit est de 2 à 3 g plus lourd que l'ovaire gauche) (Hanzen, 1995).

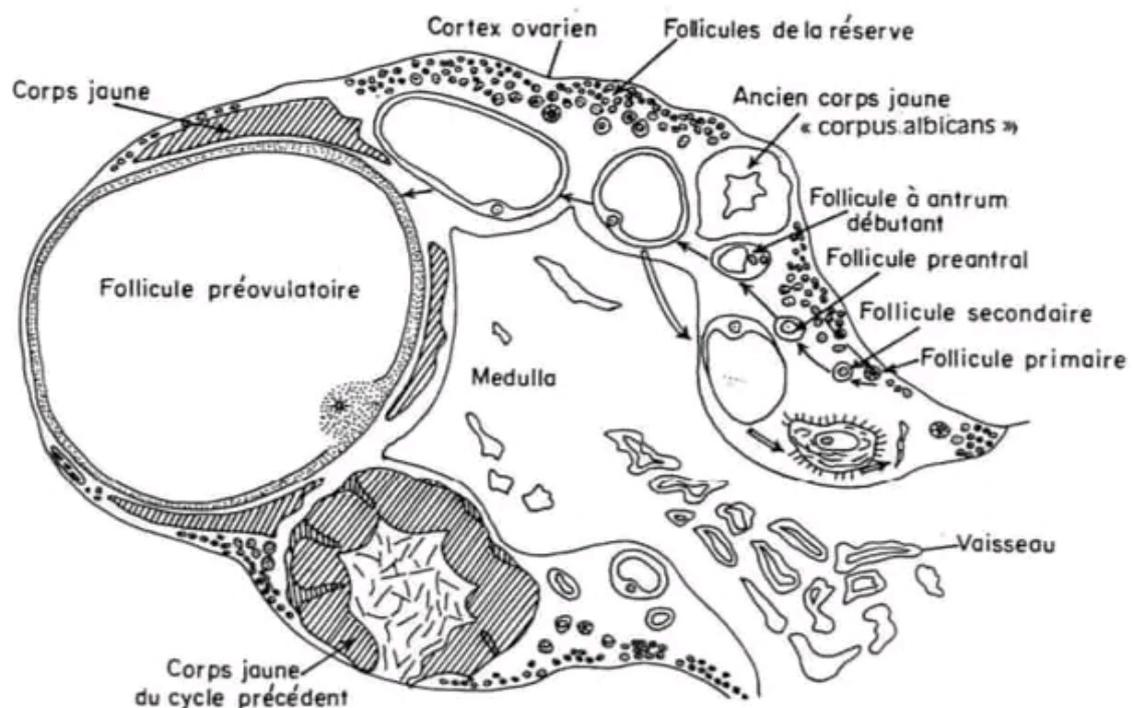


Figure1 : Représentation d'un ovaire de mammifère (Driancourt et *al.*, 2001a)

L'origine embryonnaire de l'ovaire est mixte. Des cellules extra-embryonnaires (cellules souches germinales) migrent au travers de l'embryon pour coloniser une zone dense de tissu mésenchymateux supra-néphrotique recouverte d'épithélium cœlomique : les corps de Wolff (Drion et *al.*, 1996).

Les ovaires résultent de la différenciation spontanée des corps de Wolff qui s'opère à partir de la septième semaine du développement embryonnaire. Les corps de Wolff vont proliférer et se condenser pour former une crête longitudinale.

2. Ovogenèse

L'ovogenèse, la folliculogenèse et le cycle ovarien, sont trois processus interreliés. L'ovogenèse est un processus de développement long et discontinu qui aboutit à la formation, la croissance et la maturation des gamètes femelles (Moniaux et al., 2009).

Les cellules germinales primordiales sont à l'origine des gamètes et vont migrer entre les jours 30 et 64 de développement, de la paroi du gros intestin et du mésentère dorsal vers les crêtes génitales (Aerts et al., 2008). Ces cellules se multiplient par mitose, vont s'intégrer au sein du cortex et devenir des ovogonies. À partir du 45^{ème} jour de gestation environ, les ovogonies se multiplient exponentiellement par mitose, (Smitz et Cortvrindt, 2002) et les ovaires fœtaux en contiennent jusqu'à deux millions chez le bovin (Vanden Hurk et Zhao, 2005). Lorsque ce processus est terminé, la méiose commence, elle s'arrête au stade diplotène, les ovocytes sont de type 1, bloqués en prophase de première division méiotique (Byskov, 1986). Le nombre des follicules primordiaux 235000 à la naissance chez la vache (Mialot et al., 2001), diminuera avec l'âge par dégénérescence au cours de la succession des cycles, certains ovocytes iront jusqu'à la maturation et la ponte ovulaire, tandis que la majorité dégènera dans les follicules atrophiques.

Seulement quelques certaines follicules primordiaux achèveront ainsi la première division de la méiose pour évoluer en ovocyte 2 avec émission des premiers globules polaires, suivie de la seconde division méiotique. C'est au stade métaphase de cette division, qu'a lieu l'ovulation et la maturation finale se déroulera lors de la fécondation, avec émission du second globule polaire.

3. Folliculogenèse

Au niveau endocrinien le développement et la croissance des follicules sont régulés non seulement par les gonadotrophines FSH (Hormone folliculo-stimulante) et LH (Hormone lutéinisante), mais également par des nombreuses hormones et

facteurs de croissance produits localement (Zamberlam, 2013).

Le follicule et l'ovocyte entretiennent de liens étroits. Le follicule apporte à l'ovocyte un microenvironnement nécessaire à sa croissance ainsi qu'à l'acquisition de sa compétence à la fécondation et au développement embryonnaire (Gordon, 2003). À l'inverse, l'ovocyte joue un rôle important dans le développement folliculaire (Matzuk et *al.*, 2002; Knight et Glister, 2006) montrant ainsi les liens indissociables entre ovogenèse et folliculogenèse (Monniaux et *al.*, 2009).

Le développement folliculaire ou folliculogenèse est un processus continu qui débute au stade foetal par le démarrage de la croissance du follicule primordial et se termine après la puberté par l'ovulation pour une très faible proportion de follicule stockées car plus de 99% des follicules en croissance vont dégénérer (atrésie) (Moniaux et *al.*, 1996).

La description des modifications observées à chaque stade de croissance a abouti à la classification des follicules en primordial, primaire, secondaire et tertiaire (Fig. 2). Certains auteurs subdivisent les follicules antraux en petits et grands follicules antraux sans pour autant que des différences sur le plan de leur morphologie ou de leur réceptivité ne soient observées (Scaramuzzi et *al.*, 2011).

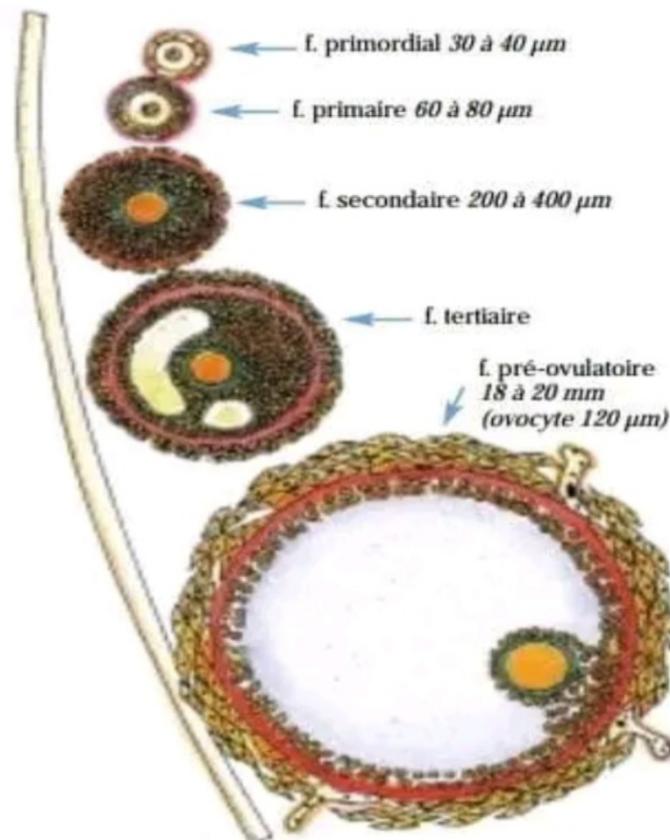


Figure 2 :Représentation schématique de l'évolution d'un follicule chez les bovins (Drion et *al.*,1996)

Follicules primordiaux

Les follicules primordiaux sont les endroits où les ovocytes femelles sont stockés. Leur formation intervient durant la période fœtale chez de très nombreux mammifères tandis que chez les rongeurs le processus ne commence qu'après la naissance.

Le follicule primordial comprend une membrane basale externe et contient un ovocyte de premier ordre ou ovocyte 1 (2n chromosomes) bloqué au stade de la prophase de la 1^{ère} méiose (diplotène) (Sirard et *al.*, 1989). À ce stade, l'ovocyte est lui-même entouré d'une couche de 4-8 cellules somatiques aplaties à l'origine des cellules de la granulosa. L'association entre l'ovocyte et avec ces cellules est essentielle à l'arrêt de la méiose. Les follicules primordiaux représentent donc un stade de quiescence dans la folliculogénèse. Chez la vache, ils se forment autour de

90 jours de la vie foetale (Fig.2)

Follicules primaires

Le stade primaire débute avec la croissance du follicule primordial. Le délai entre apparition du follicule primordial et celle du premier follicule primaire étant de 50 jours, cette activation intervient donc autour de 140 jours de gestation chez les bovins (Fortune et *al.*, 2000). Le développement de ces follicules se fait indépendamment de l'action de la FSH et de la LH mais sous le contrôle de facteurs sécrétés par l'ovocyte (Fortune et *al.*, 2010).

L'ovocyte augmente de volume et les cellules aplaties de la granulosa prennent un aspect cuboïde et se multiplient (Braw-Tal et Yossefi, 1997 ; Fortune et *al.*, 2010). Ce stade voit l'apparition de la ZP (zone pellucide) et l'activation de très nombreux gènes (Rodgers et Irving-Rodgers, 2010). L'âge, l'espèce et l'importance de la réserve influencent le nombre de follicules quittant chaque jour la réserve.

Chez les bovins, ce nombre est estimé à 50-80 peu après la naissance. Il augmente par la suite à 120 par jour puis décline pour se stabiliser autour de 80 au moment de la puberté (Erickson, 1966a, 1966b).

Follicules secondaires

La formation des follicules secondaires débute avec l'apparition d'une deuxième couche de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte. Le diamètre de l'ovocyte s'accroît et une petite cavité remplie de liquide apparaît en son sein. Les follicules secondaires sont décrits comme étant de larges follicules préantraux entourés de deux à six couches de cellules de la granulosa et dont leur thèque interne (formée à partir des cellules stromales) et leur ZP (ayant pour origine des glycoprotéines synthétisées et sécrétées par l'ovocyte) sont très clairement délimités.

L'épaississement de la zone pellucide (corona radiata) ainsi constituée n'empêche en rien le contact étroit déjà établi entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui lui sont accolées (Rüsse, 1983; Fair et *al.*, 1995). Ce contact permettra d'ailleurs des échanges d'ions et de petites molécules (poids moléculaire <1kD) entre ces deux structures (Monniaux et *al.*, 2009).

Les follicules secondaires sont réceptifs aux gonadotrophines : les cellules de la

granulosa vont répondre à la FSH et celles de la thèque interne à la LH

Le follicule secondaire va acquérir des enzymes nécessaires à la production d'androgènes par les cellules de la thèque avant sa transformation en follicule antral (McNatty et *al.*, 2006).

Follicules tertiaires

Le follicule appelé aussi follicule tertiaire est à l'origine du développement de l'antra (ou antrum) sous l'influence de la FSH. Tout les produits issus des sécrétions des cellules de la granulosa et de la thèque ainsi que les substances plasmatiques (acides aminés, lipides et autres petites molécules dérivant du plasma) vont s'accumuler dans l'antrum.

La formation de l'antrum va entraîner la ségrégation des cellules de la granulosa en deux types de cellules différents sur le plan anatomique et fonctionnel : les cellules murales de la granulosa tapissant la paroi du follicule et jouant un rôle dans la stéroïdogénèse et les cellules du cumulus entourant intimement l'ovocyte. À ce stade du développement du follicule, la taille de l'ovocyte n'augmente plus guère.

La prolifération des cellules de la granulosa diminue et la croissance du follicule s'effectue essentiellement par l'augmentation du liquide de l'antra (Monniaux et *al.*, 2009). La très grande partie des follicules tertiaires n'atteint toutefois jamais le stade préovulatoire, ils deviennent atrétiques et dégénèrent.

3.1. Vagues folliculaires

Chez les mammifères, il existe deux phases dans la croissance des follicules dont les mécanismes de régulation sont différents (Driancourt et *al.*, 2001b) (Fig.3).

3.1.1. Folliculogénèse basale

(Du stade primordial au stade pré-antral) se déroule en l'absence de FSH mais sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance GDF-9 (Growth differentiation factor 9), steel, IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) ou endocriniens (insuline) (Canty et *al.*, 2003). Provenant de l'ovocyte et des cellules somatiques. C'est au cours de cette phase que l'ovocyte acquiert sa compétence méiotique.

3.1.2. Folliculogenèse terminale

c'est-à-dire du stade cavitaire qui varie en générale chez les mammifères entre 2 et 5mm, en particulier chez la vache 2 à 3mm à l'ovulation (Austin et *al.*, 2002).elle correspond à la durée de la phase folliculaire du cycle 5 jours chez la vache.

D'énormes progrès dans la connaissance de la folliculogenèse ont été accomplis grâce à l'utilisation de l'échographie. Cette technique a permis de démontrer l'existence de deux ou trois vagues folliculaires au cours du cycle œstral chez la vache. Chez cette espèce, chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7-9 jours de plusieurs follicules de diamètre supérieur ou égal à 5 mm

Parmi ces follicules, se formera au bout de quelques jours un follicule dit dominant (Sirois et Fortune, 1988). Ainsi donc, la première vague décrite débute le jour suivant l'ovulation. La deuxième intervient environ neuf jours plus tard et la troisième, quand elle se produit, est décrite autour de 15 jours après l'ovulation (Adams et *al.*, 2008).

Une vague folliculaire est décrite, de nos jours, comme étant la croissance synchronisée d'un groupe de follicules antraux à intervalles réguliers lors du cycle ovarien. Les follicules composant la vague se ressemblent sans être identiques car de tailles inégales (Adams et *al.*, 2012).

Durant la vague folliculaire, un tri va s'effectuer afin de sélectionner le ou les follicules ovulatoires. La sélection s'effectuera en trois étapes successives : le recrutement, la sélection et la dominance (Fig.3).

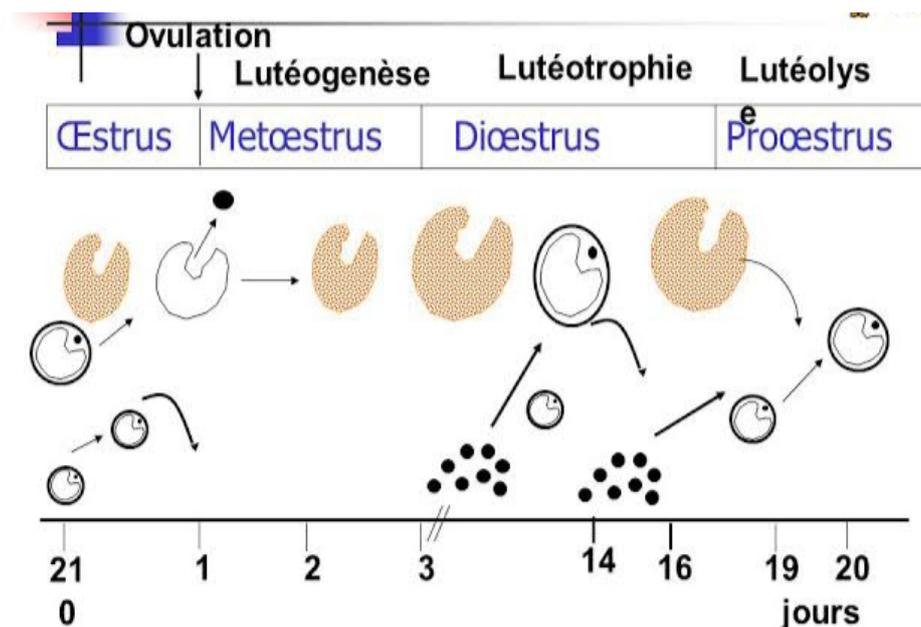


Figure 3 : Vague de croissance folliculaire au cours du cycle oestral de la vache

(Gayrard, 2007)

- **Recrutement**

Le recrutement représente l'entrée en phase terminale d'un groupe de follicules ayant une dépendance aux gonadotrophines (Bao et Garverick, 1998). Il s'applique à tout follicule ayant été épargné par le processus d'atrésie (Fortune, 1994).

Quelle que soit l'espèce, le nombre de follicules concernés est toujours supérieur au nombre de follicules ovulatoires, assurant ainsi la possibilité qu'au moins un follicule se trouve dans les conditions optimales lui permettant de compléter la folliculogénèse (Fortune, 1994).

Pour cette raison, la destruction du follicule dominant en début de vague va entraîner un ralentissement du processus de régression affectant les follicules de taille directement inférieure alors que la destruction du follicule dominant en fin de vague va entraîner un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante (Ko et *al.*, 1991).

Le recrutement s'effectue sous l'effet de la FSH en synergie avec divers facteurs d'origine locale ou endocrine tels les FGFs (Fibroblast growth factor), EGF (Epidermal growth factor) et IGF1 (insulin growth factor 1) (McGee et Hsueh, 2000; Mihm et *al.*, 2000). Le rôle de la FSH est très important dans le processus de recrutement : chacun de ses pics au cours du cycle va permettre le recrutement de follicules antraux sensibles à la FSH, amorçant ainsi une nouvelle vague folliculaire. Cela explique le phénomène décrit par Fortune (Fortune, 1994) où la disparition d'un follicule dominant va entraîner une hausse de FSH afin de permettre au follicule second en taille de devenir à son tour dominant. Le processus de recrutement débute avec l'augmentation transitoire de la FSH suite à l'ovulation ou à la suite de l'atrésie du follicule dominant de la vague précédente (Adams et *al.*, 2012).

Chez la vache, durant la phase de croissance, la cohorte de follicules va passer de 5 à 8 mm de diamètre et les cellules de la granulosa expriment Bostaurus CYP19A1 (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1) et deux types d'ARNm (Guerrero Netto, 2013).

Cela laisse supposer que les cellules de la granulosa commencent à métaboliser les androgènes produits par la TC (lymphocyte T) en œstradiol et le cholestérol en prégnénone mais pas la prégnénone en progestérone du fait de

l'absence de 3 β HSD (3b β ta Hydrox st \acute{e} roïde D \acute{e} shydrog \acute{e} nase) (Bao et Garverick, 1998).

À ce stade de d \acute{e} veloppement, les follicules pr \acute{e} sents sont tous au stade antral et une grande majorit \acute{e} d'entre eux deviendra atr \acute{e} tiques et d \acute{e} g \acute{e} n \acute{e} re alors que le follicule dominant atteindra le stade pr \acute{e} ovulatoire (Bao et Garverick, 1998; McGee et Hsueh, 2000).

- **S \acute{e} lection**

Chez les esp \acute{e} ces monoovulantes, la s \acute{e} lection est le processus par lequel un follicule unique est choisi au sein de la cohorte de follicules en croissance pour poursuivre son d \acute{e} veloppement alors que le reste des follicules deviendra atr \acute{e} tiques (Fortune et al.,2004). Chez les esp \acute{e} ces polyovulantes, plusieurs follicules sont s \acute{e} lectionn \acute{e} s et se d \acute{e} veloppent en synchronie jusqu'À l'ovulation.

La diff \acute{e} rence en taille entre le (ou les) follicule destin \acute{e} À \hat{e} tre dominant et le reste de la cohorte des follicules en croissance est connue sous le terme de 'd \acute{e} viation' et intervient chez la vache lorsque le plus gros follicule mesure 8,5 mm de diam \acute{e} tre (Ginther et al.,1997). Les follicules non s \acute{e} lectionn \acute{e} s (follicules dits 'subordonn \acute{e} s') du fait de la perte de support li \acute{e} e À la diminution de production de FSH, deviennent atr \acute{e} tiques et r \acute{e} gressent. Le nombre de follicule atteignant le stade pr \acute{e} ovulatoire sera fonction de l'esp \acute{e} ce ou de la race mais des variations seront \acute{e} galement observ \acute{e} es en fonction du niveau de la r \acute{e} serve ovarienne : ils seront plus nombreux chez la jeune femelle que chez la femelle \hat{a} g \acute{e} e. Le processus exact de s \acute{e} lection demeure À ce jour inconnu m \hat{e} me s'il a \acute{e} t \acute{e} sugg \acute{e} r \acute{e} que le (ou les) follicule s \acute{e} lectionn \acute{e} d \acute{e} montrait une augmentation de l'expression de FSHR, LHCGR(Luteinzing hormone/ choriogonadotropinreceptor) et 3 β HSD dans les cellules de la granulosa lui permettant d' \hat{e} tre plus r \acute{e} ceptif À la LH et de continuer son d \acute{e} veloppement malgr \acute{e} la diminution importante de FSH (Aerts et Bols, 2010a). Une autre hypoth \acute{e} se avance que la croissance serait due À une augmentation du niveau d'IGF1 dans le follicule dominant (Lucy, 2007).

- **Dominance**

La notion de dominance est bien connue dans l'esp \acute{e} ce bovine. Le follicule dominant est d \acute{e} fini comme \acute{e} tant le follicule ayant un diam \acute{e} tre sup \acute{e} rieur de plus de

2 mm par rapport aux follicules du reste de la cohorte (Sirois et Fortune, 1990) et doté d'une grande capacité à produire des œstrogènes (œstradiol).

La dominance du follicule est décrite comme étant morphologique et fonctionnelle (Lavoie et Fortune, 1990) : morphologique car exercée par le follicule dominant et fonctionnelle car le follicule dominant a la capacité de provoquer la régression des follicules en croissance, de prévenir l'émergence d'une nouvelle cohorte de follicules ayant une dépendance aux gonadotrophines (Ko et *al.*, 1991; Sirois et Fortune, 1990) ou d'ovuler lorsque les conditions appropriées sont réunies (Gong et *al.*, 1993).

Chez la vache, il est établi qu'il faudra 42 jours à un follicule antral pour devenir dominant (Aerts et Bols, 2010b). Les caractéristiques principales du follicule dominant seront une forte concentration d'œstradiol dans le liquide folliculaire, des niveaux élevés de l'ARNm codant pour LHCGR (Hormone lutéinisante cellule de granulosa récepteur) dans les TC et CG (cellule de granulosa) ainsi qu'un niveau plus élevé de 17 α hydroxylase et d'aromatase dans les GC en comparaison avec les follicules subordonnés (Fortune et *al.*, 2004).

- **Follicule ovulatoire**

Lorsque le follicule dominant atteint le stade préovulatoire, une cascade d'évènements débutant par un pic de LH va résulter en l'ovulation. La LH va être à l'origine de l'augmentation de la synthèse des récepteurs de la progestérone, des prostaglandines ainsi que des EGFl-like facteurs dans les GC. Ce pic va également permettre à l'ovocyte primaire de compléter la méiose I.

- **Atrésie folliculaire**

L'atrésie folliculaire (ou involution folliculaire) constitue le devenir de la majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle est contrôlée par un mécanisme de mort cellulaire programmée encore appelée apoptose. Ce phénomène survient tout au long de la folliculogénèse et affecte tous les follicules antraux avant la puberté. Cette situation induit une atteinte de plus de 99% de follicules (Sirois et Fortune, 1990 ; Hsueh et *al.*, 1994; Hussein, 2005).

Même si décrite à différents stades du développement folliculaire, l'atrésie affecterait beaucoup plus les follicules ayant atteint le stade antral (Irving et *al.*, 2001;

Scaramuzzi et *al.*, 2011).

Le phénomène d'atrésie folliculaire a été associé à la diminution de la concentration d'œstrogènes dans le liquide folliculaire ainsi qu'à la chute du niveau de CYP19A1(Cytochrome p450,family19 SubfamilyA) (Bao et Garverick, 1998). Parmi les principaux effecteurs intracellulaires de l'atrésie, l'on peut citer la protéine appelée B cellLymphoma 2 (anti apoptotique) (Hsueh et *al.*, 1994) et les caspases (Hengartner, 2000).

- **Ovulation**

L'ovulation est le processus au cours duquel l'ovocyte, entouré des cellules du cumulus va être libéré suite à la rupture de la paroi folliculaire en son pôle apical. Elle s'accompagne d'importants changements parmi lesquels la maturation du complexe ovocyte cumulus se traduisant par la reprise de la méiose de l'ovocyte et l'expansion du cumulus qui l'entoure ainsi que la modification du profil de sécrétion des stéroïdes se traduisant par une diminution brutale des niveau sériques d'œstrogènes et d'androgènes au profit de la progestérone (Bridges et Fortune, 2007).

L'ovulation est initiée par une très importante augmentation des taux circulants de LH sécrétée par l'hypophyse antérieure et résulterait de l'action coordonnée des gonadotrophines, des hormones stéroïdiennes ainsi que des médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire (telles les prostaglandines).

La LH stimule directement les TC et GC mais ses effets sur les CC(cellule du cumulus) et l'ovocyte se font probablement de manière indirecte du fait que ces derniers ne possèdent que très peu ou pas du tout de récepteurs LH et ne répondent pas lorsqu'ils sont stimulés directement par la LH (Russell et Robker, 2007).

Le pic de LH va entraîner la surexpression rapide et transitoire de plusieurs gènes dans les heures, voire les minutes suivant le pic de LH qui vont être à l'origine des changements physiologiques et phénotypiques au niveau du follicule aboutissant à l'ovulation et la lutéinisation.

- **Corps jaune**

Après la rupture du follicule, les cellules de granulosa, nouvellement vascularisées, s'hypertrophient et prolifèrent in situ pour former le corps jaune, alors que les cellules de la thèque s'incorporent dans le tissu interstitiel de l'ovaire et

participent à la sécrétion des androgène ovariens(Hunter,1980) chez la plupart des mammifères, le corps jaune formé après l'ovulation a une durée de vie limitée entre 4 et 21 jours si la femelle n'a pas été fécondée.Sa régression ou lutéolyse permet l'apparition d'un nouveau cycle ovulatoire.la gestation induit un blocage de la lutéolyse et la persistance du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif dont la sécrétion de progestérone est indispensable à l'établissement de gestation (Leymarie et Martal, 2001). D'autre part, cette lutéinisation qui coïncide avec une augmentation très importante de la sécrétion de progestérone est accompagnée dans toutes les espèces, sauf les primates, de la disparition des sécrétions d'androgènes et œstrogène(Niswender et *al.*, 2000).

3.2. Régulation hormonale de la fonction ovarienne

La maturation folliculaire et l'ovulation sont contrôlées par le système hypothalamo-hypophysaire qui intègre les informations de différents facteurs endogènes (signaux hormonaux et nutritionnels) et exogènes (photopériode, température, stress...) (Monniaux et *al.*, 2009). Il existe une interaction globale entre les activités du système hypothalamo-hypophysaire et celles des ovaires. Le contrôle de l'activité endocrine de l'ovaire est basé sur un ensemble de rétrocontrôle entre l'ovaire et le système hypothalamo-hypophysaire qui fait intervenir des hormones (Marieb, 1999).

L'hypophyse et plus précisément l'adénohypophyse secrète les gonadotropines, LH et FSH. La sécrétion de ces hormones est sous le contrôle de la GnRH, une neurohormone sécrétée directement dans les capillaires sanguins de la tige pituitaire. La GnRH synthétisé par les neurones de l'hypothalamus stimule la synthèse et la sécrétion de FSH et LH en se fixant sur les récepteurs situés à la surface des cellules gonadotropes. La LH permet la luteinisation des cellules du follicule et stimule le follicule à produire les androgènes. La FSH stimule l'aromatisation des androgènes en oestrogènes et stimule la croissance folliculaire. Son action s'exerce plus sur les follicules antraux que sur les follicules pré-antraux présents au sein de la même cohorte de recrutement (Richards et *al.*, 1987).

Les stéroïdes, en particulier l'oestradiol d'origine ovarienne, inhibent la sécrétion pulsatile de la GnRH par un rétrocontrôle négatif. Cependant en fin de la croissance folliculaire terminale et au-delà d'une concentration seuil, l'oestradiol

exerce une action positive sur le système hypothalamo-hypophysaire. Il provoque à la fois une augmentation des pulses de la GnRH, puis une libération massive de ce dernier, et une augmentation importante de la sensibilité hypophysaire. L'association de ces effets conduit à une décharge massive de LH qui déclenchera l'ovulation des follicules pré-ovulatoires présents sur l'ovaire. Après l'ovulation, le corps jaune se forme, croît et secrète la progestérone qui exerce une rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui empêche toute libération massive des gonadotropines hypophysaires. En fin de la phase lutéale et en absence d'embryon dans l'utérus, les prostaglandines secrétées induisent la lutéolyse. La régression du corps jaune lève l'action inhibitrice de la progestérone et un nouveau cycle commence (Marieb, 1999).

Maturation *in vitro* des ovocytes bovins

De nombreuses études s'appliquent à reproduire *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste la production d'embryons bovins. Certaines poursuivent le processus jusqu'au transfert de l'embryon chez une femelle réceptrice. Mais malgré ces essais, le taux de production *in vivo* n'a toujours pas été approché à plus de 30-40% (Peterson et Lee, 2003 ; Sirard et Blondin, 1996), si ce n'est en ayant recours à des traitements de superovulation augmentant le taux de réussite à 80 % (Blondin et *al.*, 2002).

Les étapes de la production d'embryons bovins *in vitro*, soit la collecte des ovocytes, la mise en maturation, la fécondation, le développement et le transfert de l'embryon, illustrent les niveaux d'intervention ciblés par les projets de recherche.

4. Collecte des ovocytes bovins *in vivo*

Collecte sur animal vivant, la collecte est réalisée à l'aide d'une aiguille introduite par le vagin sur l'animal debout et sous simple tranquillisant et anesthésie locale. L'opération peut être répétée une ou deux fois par semaine pendant plusieurs mois (jusqu'à cinq) sans affecter apparemment la fertilité ultérieure des animaux (Nibart et Marquant-Leguienne, 1995). Cette technique présente deux avantages par rapport à la collecte d'embryons *in vivo*. Tout d'abord, elle permet de produire des blastocystes à partir de femelles considérées comme infertiles ou n'ayant pas répondu des traitements de super ovulation, donc de maintenir l'ensemble du pool de gènes forme par les animaux engagés dans un programme de sélection (ou de conservation) génétique.

Ensuite, elle peut être employée tout au long des trois premiers mois de la gestation (génisses ou vaches), donc ne pas interférer avec la conduite de la reproduction des animaux au sein d'un troupeau. En pratique, les sessions d'OPU (Ovum Pick-up) sont aujourd'hui réalisées soit une fois par semaine avec des animaux super ovules, soit deux fois par semaine, sans super ovulation. Dans tous les cas, le nombre d'ovocytes et donc d'embryons viables produits par collecte est très variable d'un animal à l'autre.

Sur l'animal vivant, la laparoscopie (Sirard et Lambert, 1986) permet de visualiser l'intérieur de l'abdomen alors que la technique (ovum pick-up) (OPU) (Kruip

et *al.*, 1991) (Fig.4).

Les ovocytes immatures peuvent aussi être collectés par ponction des follicules ovariens visualisés sur l'écran d'un échographe sur des vaches vivantes. Elle est réalisée par voie transvaginale à l'aide d'un pistolet muni d'une sonde à ultrasons et d'une aiguille rétractable reliée à un système d'aspiration (Fig.5).



Figure4 :Technique de ponction echo-guide chez le bovin (Hanzen, 2016)

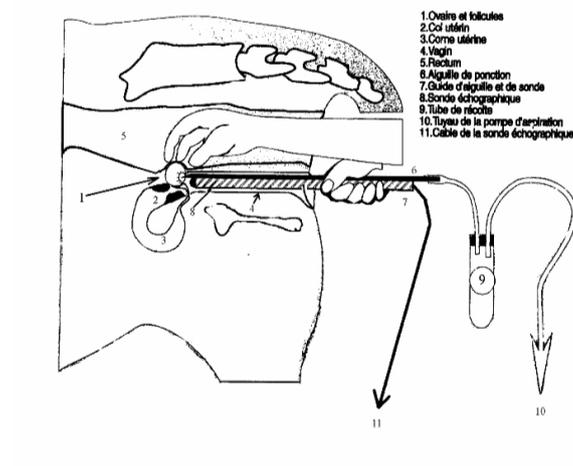


Figure 5:Technique de ponction echo-guide chez le bovin (Hanzen, 2016)

5. Collecte des ovocytes à partir des ovaires prélevés sur des animaux abattus (*exvivo*)

Les ovocytes peuvent être récoltés à moindre coût pour la production *in vitro* d'embryons à grande échelle (Agrawal et *al.*, 1995) à partir d'ovaires des vaches de

tout âge y compris les fœtus collectés après abattage (Natumanya et *al.*, 2008)

5.1. Collecte et acheminement des ovaires

La collecte *in vitro* des ovocytes est effectuée après prélèvement des ovaires au niveau de l'abattoir. Il importe de réduire autant que faire se peut le temps de stockage des ovaires est de veilles à respecter des conditions de température optimales.

En 2004, Klumpp a prouvé que les ovaires tenus à 22°C ont donné lieu à un plus grand nombre d'ovocytes suite à une maturation par rapport à des ovaires stockés à 5 et 37°C. À partir de ces résultats, la température optimale pour stocker les ovaires jusqu'à l'aspiration est proche de la température ambiante (22°C). Les ovocytes, les ovaires qui ont été transportés à 20°C au laboratoire, présentaient une plus grande expansion des cellules de cumulus et des taux de maturation en comparaison avec les ovocytes prélevés sur des ovaires qui avaient transporté à 30 jusqu'à 37°C avec un taux significatif d'ovocytes qui ont atteint la métaphase 2 (d'ovaires ont été transportés à 20°C) (Rosenkranz, 1993). D'après ce résultat la température élevée pendant le transport des ovaires pourrait provoquer des effets néfastes sur la qualité des ovocytes maturés *in vitro*.

Les ovaires doivent être prélevés dans les deux heures suivant l'abattage de l'animale. Ils seront stockés à une température comprise entre 24 et 30°C. Le prélèvement des ovocytes sera effectué dans les 4h suivant le prélèvement des ovaires.

D'après Shioya et *al.* (1988), le temps plus court entre l'abattage et l'aspiration a donné lieu à une augmentation de la production de blastocytes.

5.2. Ponction des follicules

Le diamètre folliculaire a été largement utilisé comme un paramètre de sélection des ovocytes. Des études ont établi une relation entre la taille du follicule et la compétence au développement de l'ovocyte. La ponction des follicules antraux est utilisée chez la vache à partir des follicules de diamètre compris entre 3 et 8 mm (Abraham et *al.*, 2012). Ce qui a été prouvé par Kouamo et *al.* (2014) que les follicules sont sélectionnés selon leurs diamètres mesurés en 03 catégories, les petits (dont le diamètre est inférieur à 3mm), les moyens (entre 3 à 8mm) et les grands (dont le diamètre supérieur à 8mm). En effet, les follicules en dessous de 3 mm de diamètre

donnent un faible pourcentage d'ovocytes aptes à acquérir la compétence méiotique. De même, la dégénérescence des ovocytes suite à l'atrésie des follicules est plus fréquente dans les follicules de diamètre inférieur à 3 mm et supérieure à 6 mm (Anguita et *al.*, 2007).

5.2.1. Ponction par aspiration

Dans cette technique, les follicules visibles à l'œil nu (de 2 à 8 mm de diamètre) sur l'ovaire sont aspirés à l'aide d'une aiguille 18G (**Gauge**) et d'un système d'aspiration (± 1 bar) ou d'une pompe à vide (100-150 mm Hg) (Satrapa et *al.*, 2010). On évalue entre 30 et 60% le pourcentage d'ovocytes récoltés à partir des follicules ponctionnés (Rivera et *al.*, 2000) (Fig.6).



Figure 6 : Ponction des follicules d'ovaires bovins par la technique d'aspiration d'après Hanzen (2016)

5.2.2. Slicing des ovaires (tranchage)

Selon cette technique, les ovaires sont placés dans une boîte de pétri contenant 5 ml du Dubelcco Phosphate Buffered Saline (DPBS). Des sections multiples sont faites sur la surface ovarienne avec une lame de bistouri (Wang et *al.*, 2007). Cette technique permet de récupérer les ovocytes présents dans tous les follicules quelle que soit leur localisation au niveau du cortex ovarien, augmentant ainsi le rendement en ovocytes.

Le rendement avec cette technique est de 3,10 passe à 6,25 par les techniques respectivement de ponction et le slicing (Kumar et *al.*, 1997), ce qui a été prouvé par Dolakasaria et *al.* (2013) qui ont obtenu un nombre d'ovocytes récoltés par technique de tranchage significativement plus élevé par rapport à la technique d'aspiration.

Elle a pour inconvénient de produire beaucoup de débris tissulaires, ce qui

rend la recherche des ovocytes difficile (Wani et *al.*, 1999).

5.2.3. Digestion enzymatique

C'est la technique la plus développée et plus rentable quantitativement et qualitativement, elle base sur l'utilisation d'enzymes. Cette technique base sur la digestion trypsique de tissu ovarien dans 1heure. Les ovocytes obtenues sont de bonnes qualité avec un rendement maximale (200 COCs par ovaire) (Fouladi *et al.*, 1994). Ainsi que la collagénase, issue de *Clostridium hystoliticum*, à l'état physiologique, cette enzyme joue un rôle lors de l'ovulation dans la fragilisation et la dissociation du tissu ovarien périfolliculaire qui est de sa nature riche en collagène. Le cortex ovarien doit être découpé en plusieurs fragments d'environ 01 à 2mm qui seront par la suite mis en incubation durant 20 minutes dans une solution contenant 150UI de collagénase par millilitre de milieu de culture, composé de 95% de TCM199 (Tissue Culture Medium 199) et 05% de sérum de lapin inactivé par la chaleur ainsi que des antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Cependant, il ne faut pas laisser l'enzyme agir plus de 30 minutes afin de ne pas modifier la structure des COCs et leur qualité par la suite.

6. Classification des ovocytes récoltés

6.1. Evaluation sur la base des caractéristiques morphologiques du cumulus oophorus

Après collecte *exvivo* ou *invivo*, les ovocytes peuvent être dénudés ; mais, ils sont généralement entourés d'une quantité plus ou moins abondante de cellules de la corona radiata et du cumulus oophorus. Les ovocytes sont classés selon la morphologie des COCs(complexe ovocyte/cumulus) c'est-à-dire le nombre de couches de cellules du cumulus oophorus et l'aspect du cytoplasme évalué sur la base de l'aspect des noyaux.

Les ovocytes présentant un cytoplasme homogène sont davantage associés à des COCs compacts. Inversement, un cytoplasme d'aspect granuleux et polarisé, correspondant à une distribution irrégulière de gouttelettes lipidiques et d'organelles intracellulaires, est davantage associé à des follicules atrétiques et à des COCs expansés (Salomone et *al.*, 1999).

Selon ces critères, les ovocytes sont classés en quatre classes (De Loose et

al., 1989 ; Alves et *al.*, 2014) (Fig.7).

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

Classe 2 : Cumulus compacté à une ou deux couches et un cytoplasme moins homogène.

Classe 3 : Couche des cellules irrégulières avec un peu du cumulus oophorus moins compacté et un cytoplasme moins régulier avec des zones sombres.

Classe 4 : Absence de cumulus oophorus ou expansé, cytoplasme irrégulier avec des zones sombres.

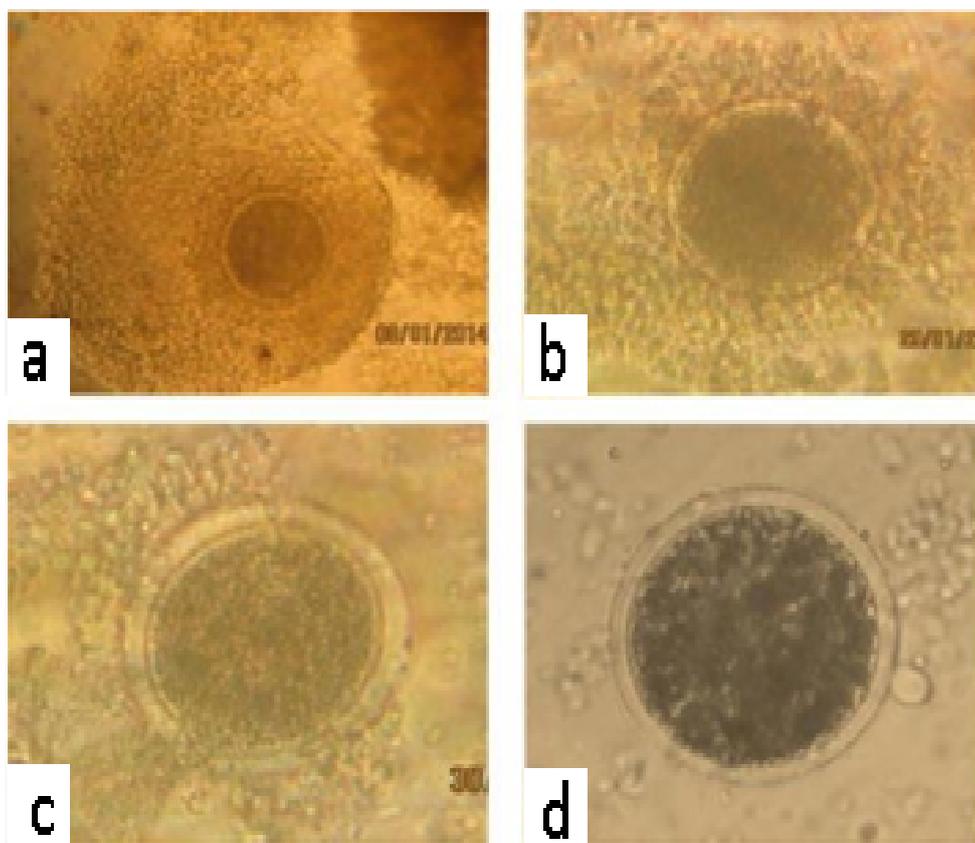


Figure 7: Classification ovocytaire chez le bovin selon Kouamo et *al.* (2014), a) ovocyte qualité 01, b) ovocyte qualité 02, c) ovocyte qualité 03, d) ovocyte qualité 04 (DeLoose et *al.*, 1989)

D'après Hanzen (2016), les critères des différentes classes sont :

Classe 1 : le COC a un aspect transparent. Le cumulus (cellules de la granuleuse) est compact et entoure complètement l'ovocyte. L'ooplasm ovocytaire a un aspect homogène.

Classe 2 : le COC a le même aspect que dans la classe 1 mais on l'oo plasme a un aspect plus irrégulier, une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie.

Classe 3 : l'ensemble du COC est sombre, le cumulus est moins compact, l'oo plasme est plus irrégulier et présente des amas plus sombres.

Classe 4 : le cumulus est complètement expansé voire absent (ovocyte nu) (Fig. 8).

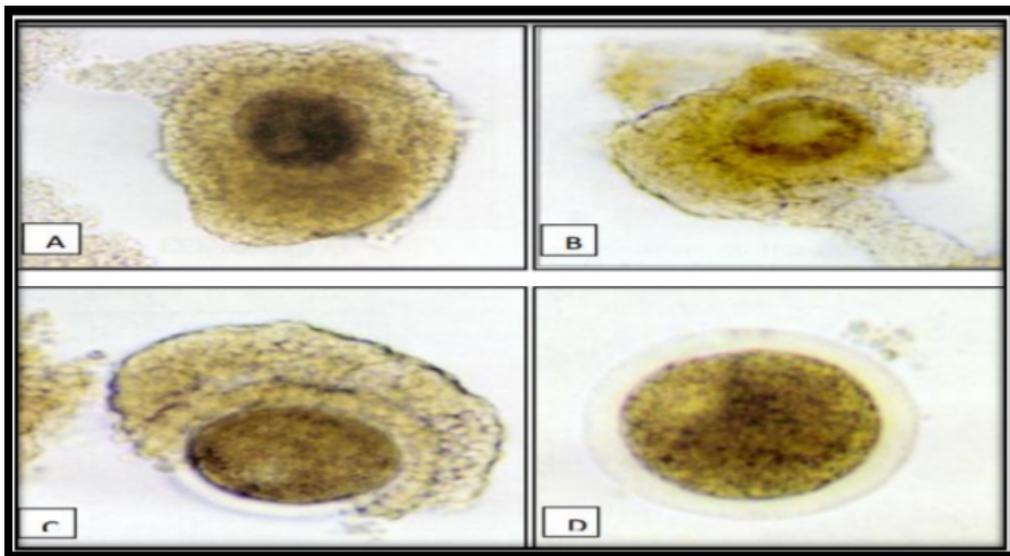


Figure 8 : Classification des ovocytes bovins après la récolte selon Hanzen(2016), A) ovocyte classe 01, B) ovocyte classe 02, C) ovocyte classe 03, D) ovocyte classe 04(Hanzen, 2016)

6.2. Evaluation l'aspect de la chromatine de la vésicule germinale

L'organisation et l'architecture de la chromatine sont des éléments caractéristiques du processus de différenciation des ovocytes chez les mammifères. Le développement de l'ovocyte se caractérise par des changements impressionnants dans la structure et la fonction de la chromatine dans le noyau, à savoir la vésicule germinale (Luciano et *al.*, 2014).

Selon Lodde et *al.* (2007), les follicules prélevés des follicules antraux présentent quatre modèles de configuration de la chromatine de GV0 (Vésicule germinale) à GV3 caractérisée par augmentation progressive de la condensation (Fig.9).

- Stade GV0 : Chromatine filamenteuse et diffuse dans toute la zone nucléaire.
- Stade GV1 : Représentent le stade précoce du remodelage de la chromatine, un

procédé qui commence par l'apparition de quelques foyers de condensation dans les ovocytes.

- Stade GV2 : Intermédiaires du remodelage de la chromatine, avec formation d'amas distincts de la chromatine condensée dans les ovocytes.
- Stade GV3 : Est le stade où le plus haut niveau de condensation est atteint avec la chromatine organisée en un seul bouquet (Lodde et al., 2007).

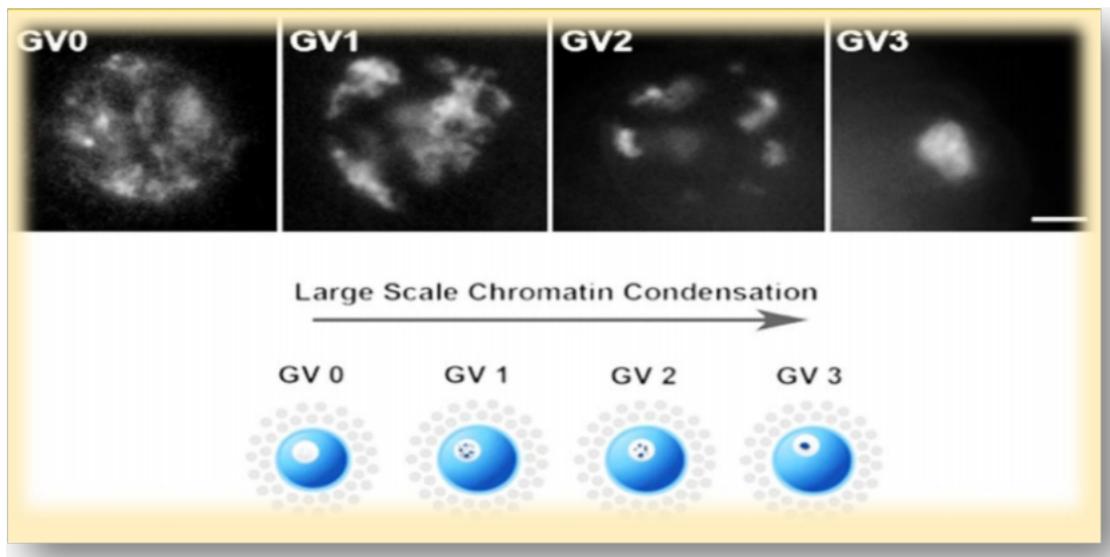


Figure 9: Changements dynamiques de la configuration de la chromatine dans la vésicule germinale du stade GV0 au stade GV3 d'après Luciano et al. (2012).

Les ovocytes avec une configuration de GV0 ont montré une capacité très limitée de reprendre la méiose I complète après maturation *in vitro*, alors que la quasi-totalité des ovocytes GV1, GV2 et GV3 ont pu atteindre le stade Métaphase II. Au contraire, seul un pourcentage limité d'ovocytes GV1 atteint le stade blastocyte, après la fécondation *in vitro*, tandis que GV2 et GV3 ovocytes ont montré un potentiel élevé de développement embryonnaire (Lodde et al., 2007). Ces résultats confirment que le remodelage de la chromatine peut être considéré comme un marqueur de la différenciation de l'ovocyte et de la compétence au développement.

7. Maturation *in vitro* des ovocytes sélectionnées après classification

7.1. Choix des ovocytes pour la maturation et la fécondation *in vitro*

L'efficacité de PIV (la production *in vitro* d'embryons) est influencée significativement par la qualité des ovocytes. Les COCs utilisés pour la PIV sont les COCs de qualité 1 et 2, c'est-à-dire entourés d'un cumulus compact (composé de 3 à 4 couches de cellules couvrant la zone pellucide) et ayant un cytoplasme homogène (Cetica et *al.*, 1999 ; Wang et *al.*, 2007).

Selon les études de Cetica et *al.* (1999), ils ont montré que la compétence au développement est proportionnelle à la qualité du complexe cumulus oophorus ovocyte avec une différence des taux de développement significatif entre les COCs des classes 1 et 2 acceptables d'une part et d'autre part les COCs de classes 3 et 4.

7.2. Milieux de maturation

7.2.1. Milieux de base

L'environnement et la composition du milieu de maturation lors d'une PIV doivent donc être choisis avec attention. Les milieux de culture classique (MEM, TCM199, TALP, Waymouth, Ham-F12, SOF, B2...) ont été utilisés pour la maturation mais peu d'études les ont systématiquement comparés (Ali, 2003). Le milieu le plus généralement utilisé pour la maturation est le TCM199 (Tissue Culture Medium), un milieu tamponné au bicarbonate, contenant des sels minéraux (servent de cofacteurs d'enzymes, jouent un rôle dans la pression osmotique, le potentiel de membrane, les communications, les transports, la régulation du pH et dans l'attachement des cellules), des sources de carbone et d'énergie (glucose, glutamine) ainsi que des acides aminés (sous unités constitutives des protéines) et des vitamines (cofacteurs d'enzymes ou précurseurs pour la synthèse de molécules). La présence d'acides aminés paraît indispensable à la qualité de la maturation, ceci étant particulièrement vrai pour les acides aminés soufrés (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).

Une étude récente menée par Loreno et *al.* (1993), que l'indice de la métaphase 2 ne diffère pas significativement entre les milieux. Cette étude a été confirmée par Baruma, 1995 qui n'a pas observé une différence significative entre les milieux.

Il a été montré que le pourcentage d'ovocytes avec des cellules du cumulus expansées varierait considérablement entre les différents milieux utilisés avec les mêmes additifs. Cette variation pourrait être attribuée à la variation de la composition des milieux de base qui ont été utilisés pour la maturation *invitro* (Hussain et *al.*, 2015).

D'après les l'expérience pratiqué par Hussain (2015) où il a utilisé le milieu de base TCM199 avec des additifs en pratiquant les techniques d'aspiration, il a obtenu un incidence d'ovocytes avec expansion des cellules du cumulus plus élevé en comparant avec l'utilisation de milieu de base HAM F-10 avec les mêmes additifs et la même technique . Cette variation pourrait être dûe à des différences dans l'efficacité des milieux pour l'MIV. En effet, cette variation des taux est due à la différence dans la composition de base des milieux utilisés pour l'MIV, ainsi que la durée et la température de l'incubation (Hussain et *al.*, 2015)

L'ajoute de pyruvate de sodium, gentamicine, glutamine, liquide folliculaire, FSHp et HIOCS (hydrophobic ionizable organic compounds) et autres additifs au milieu TCM199 peut donner une meilleure performance de l'MIV d'ovocytes récupérés de bovins en comparant entre les milieux Ham F-10 et Ham F-12 avec les mêmes additifs.

7.2.2 . Milieux de maturation et additifs

C'est pourquoi certains laboratoires préfèrent plutôt enrichir le milieu spécifiquement avec par exemple des acides aminés, vitamines, gonadotrophines, hormones stéroïdes, antioxydants et facteurs de croissance. Les projets de recherche basés sur des milieux complètement définis ou semi définis (ajout de BSA Bovine Serum Albumin) peuvent ainsi étudier les effets précis de chaque constituant sur le déroulement de la PIV.

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. La BSA est souvent utilisée à cet effet, ainsi que des liquides biologiques complexes (sérum bovin fœtal, sérum de femelle en œstrus, 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 des

besoins réels de l'ovocyte(Ponsart et Pozzi, 2013).

- **Antibiotiques**

Les antibiotiques peuvent être ajoutés pour prévenir les contaminations ainsi que des composants complexes comme du sérum, des cellules folliculaires ou du fluide folliculaire pour leur apport en éléments variés. L'ajout de ces trois derniers composants complexes empêche néanmoins le milieu d'être complètement défini puisque la composition précise demeure inconnue.

- **Liquide Folliculaire**

Le liquide folliculaire compose le micro-environnement de l'ovocyte. De ce fait, il est au moins partiellement responsable de la qualité et du développement ultérieur de l'embryon (McNatty, 1978). Effectivement, des études suggèrent que la compétence des ovocytes est acquise au cours du processus de la folliculogénèse (Blondin et *al.*, 1997 ; Mermillod et *al.*, 1999 ; Sutton et *al.*, 2003).

Le liquide folliculaire procure à l'ovocyte une protection contre la protéolyse et l'extrusion pendant l'ovulation (Espey et Lipner, 1994) et agit comme un tampon de l'environnement intrafolliculaire contre l'influence des conditions externes présentées par le flux sanguin (Gosden et *al.*, 1988). Le liquide folliculaire contient à la fois des constituants du plasma sanguin qui traversent la barrière folliculaire et des produits issus de l'activité sécrétoire des cellules de la granulosa et de la thèque (Gosden et *al.*, 1988 ; Fortune,1994).

La composition du liquide folliculaire varie au cours du cycle et selon la taille des follicules (Leroy et *al.*, 2004b ; Orsi et *al.*, 2005). La variation des apports alimentaires peut aussi faire varier les concentrations intra-folliculaires de différentes hormones et métabolites : hormones stéroïdes (Rhind et McNeilly, 1998 ; O'Callaghan et *al.*, 2000 ; Armstrong et *al.*, 2002c ; Comin et *al.*, 2002), IGF1 (O'Callaghan et *al.*, 2000) et IGFBP (Insulin-like growth factor-binding protein) (Comin et *al.*, 2002), glucose et insuline (Landau et *al.*, 2000), AGNE (Acides Gras Non Estérifiés) (Comin et *al.*, 2002 ; Jorritsma et *al.*, 2003). Il a été montré chez les vaches en post-partum une étroite corrélation entre les niveaux plasmatiques et folliculaires pour certains métabolites (Leroy et *al.*, 2004b ; Bender et *al.*, 2010).

D'après les études de Romero et Seidel (1996), ils ont démontré que le milieu

de maturation complété avec le FF (fluid follicular) fournit un environnement approprié au développement de l'ovocyte bovine, car il augmente le degré de l'expansion des cellules du cumulus (Aguilar et *al.*, 2001) et augmente le développement embryonnaire (Algriany et *al.*, 2004)

Certaines études ont rapporté que les divers éléments du liquide folliculaire sont semblables à ceux trouvés dans le sérum, avec seulement quelques différences (Edwards, 1974; Greve et *al.*, 1989; Chance et *al.*, 2001).

Afin de déterminer l'influence de la taille des follicules sur la compétence des ovocytes bovins, Pavlok et *al.* (1992) ont classé les follicules en trois groupes selon leur taille 4 à 8 mm (grand), 2 à 4 mm (moyen) et 1 à 2 mm de diamètre (petit). Après la fécondation *in vitro*, le développement embryonnaire était enregistré et il a été noté qu'il y avait significativement plus d'embryons clivés à partir ovocytes récupérés de grands follicules (68,9%) par rapport à ceux récupérés à partir moyen (64,3%) ou faible (19,7%).

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

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

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

- **Hormones**

Dans des conditions *in vivo*, le COC(complexe ovocyte cumulus) baigne dans le fluide folliculaire tout au long de la maturation. Alors que la présence de LH et FSH dans le milieu de maturation n'est pas indispensable pour une PIV(production *in vitro*) (Trounson et *al.*, 1994), les laboratoires de recherche se basent sur la littérature pour constituer le milieu de maturation dans le but d'augmenter la compétence au développement de l'ovocyte.

L'œstradiol est produite à partir d'une conversion enzymatique des androgènes dans les cellules de la granulosa du follicule tandis que les gonadotrophines LH et FSH sont des glycoprotéines produites par l'hypophyse et composées de deux sous-unités.

Le rôle de LH dans l'induction de l'ovulation et le maintien du corps jaune au cours du cycle œstral tout comme celui de FSH dans la stimulation et le soutien de la croissance folliculaire et dans la sélection du follicule dominant le sont également (Thibault et Levasseur, 2000).

Par contre, le rôle de ces trois hormones au niveau de la maturation ovocytaire est moins connu et plus ou moins controversé. *In vivo*, la concentration de E2(oestradiol) dans le fluide folliculaire reste élevée jusqu'à une durée de 6 h après le pic de LH (Dieleman et *al.* 1983). Ainsi, sa présence dans le milieu de maturation peut avoir un effet nul (Beker-van Woudenberg et *al.*, 2006) ou positif lorsque sa concentration équivaut à celle présente dans le fluide folliculaire après le pic de LH (Ali et Sirard, 2002b)

Ainsi dans un milieu de maturation complètement défini, LH n'a pas montré d'effet positif sur la compétence au développement de l'ovocyte (Ali et Sirard, 2002b). Notons par ailleurs que l'ajout de LH est souvent couplé à FSH, ce qui ne permet pas de tirer de conclusion sur les rôles précis et distincts de LH et FSH (Saeki et *al.*, 1991).

En outre, certaines sources de LH (glande pituitaire, sérum ou urine) peuvent être contaminées par FSH. L'effet observé attribué à LH pourrait ainsi résulter en réalité d'un effet de FSH. C'est probablement ce qui a mené Zuelke et Brackett (1990) à attribuer un rôle positif à l'ajout de LH pendant la MIV puisqu'ils ont utilisé une LH de source pituitaire à une concentration de 100 ug/mL alors qu'à une telle concentration, la quantité de FSH apportée n'est pas anodine. Pour toutes ces

raisons, l'hormone LH commence à être éliminée du milieu de maturation.

Le rôle de FSH dans l'acquisition d'un potentiel au développement lors de la maturation *in vitro* est fréquemment cité (Izadyar et *al.*, 1998 ; Ali et Sirard, 2002b).

- **Facteurs de croissance**

Certain ont tenté d'élaborer des milieux définis, sans sérum, en ajoutant différents facteurs de croissance, tels que l'EGF (epidermal growth factors) (Yang Sh et *al.*, 2005) ou l'IGF-1 (Wynn P et *al.*, 1998), des résultats très encourageants.

Les facteurs de croissance de la famille de l'insuline (Insuline-like growth factor 1 et 2 : IGF-1 et IGF-2) pourraient jouer un rôle dans la régulation intra-ovarienne de la folliculogénèse et donc dans la maturation ovocytaire. Ils ont été testés *in vitro* à différentes concentrations sans succès (Carolan et *al.*, 1997), selon Lonergan et *al.* (1995), l'EGF (epidermal growth factor ou facteur de croissance épidermique) a montré un effet similaire à celui du sérum, dès la concentration minimale testée (1 mg/ml).

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

Il a été montré que l'EGF est naturellement présent dans le liquide folliculaire de plusieurs espèces (Lonergan et *al.*, 1996), et ont montré que l'effet positif du liquide folliculaire sur l'MIV des ovocytes de souris est en grande partie en raison de la présence d'EGF. L'ajout de l'EGF dans le milieu de culture entraîné un développement des capacités plus élevé que d'autres facteurs de croissance utilisés (Mtango et *al.*, 2003), ce qui a démontré par Sadeesh et *al.* (2014), qui ont résulté que le facteur de croissance l'EGF améliore l'expansion du cumulus des complexes ovocyte cumulus du buffle.

- **Sérum**

Ces milieux ont supplémentés avec autre composants pour calquer la composition de milieu étudié *in vivo*. Comme l'adjonction de protéines qui, dans les publications anciennes, étaient apportées surtout par du sérum de veau fœtal

(Trousone *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 1996) du liquide folliculaire provenant de follicule matures (Cha *et al.*, 1991) ou du sérum de cordon foetal (Veeck *et al.*, 1983; Cha *et al.*, 1991).

Garcia *et al.* (1988), ont enregistré un degré d'MIV d'ovocytes en utilisant le milieu TCM199 et ont obtenu 85,70% d'ovocytes maturés alors qu'il était de 90,60% en utilisant le TCM199+FCS.

Le pourcentage d'ovocytes matures était significativement plus élevée dans les milieux supplémentés avec de l'ECS (sérum de vache en chaleur) (78%), FBS (Foetale Bovine Serum) (79%) et le BAF (Bovine Aminoionic Fluid) (77%) par rapport à bFF (52%).

D'après les résultats de Lonergan *et al.* (1996) après l'ajout de plusieurs additifs, les meilleurs résultats sont obtenus avec le milieu additionné de sérum seul (TCM199+FCS).

Certain étude a marquée des résultats similaires à ceux habituellement obtenu après l'utilisation d'un milieu chimiquement défini (sans sérum ni protéine d'origine animale) telle que le BSA ou la SVF (sérum de veau foetal) avec une supplementation du milieu de base TCM199 en PVA (polyvinyle alcool) et en hypotaurine et B-mecarptoéthanol (Miushima *et al.*, 2000).

7.3. conditions de la mise en incubation et maturation *in vitro*

Les COCs sont transférés dans un milieu de maturation où ils sont incubés pendant 24 h dans une atmosphère humide à 39°C contenant 5% de CO₂ (Mermillod *et al.*, 1992a). Il s'agit du temps nécessaire pour l'accomplissement de la maturation nucléaire. Les variantes de cette étape permettent entre autres de tester l'efficacité de différents milieux définis ou non (Rosé *et al.*, 1992), l'effet de co-cultures ou de remettre en question un matériel ou un choix protocolaire.

Le système tampon utilisé pour la MIV est un système naturel où le gaz CO₂ équilibre le contenu en CO₂/HCO₃ du milieu de culture (Rothblat *et al.*, 1972).

Il y'a aussi un autre facteur, l'osmolarité que doit être contrôlée, car à partir de 315m Osmoles/Kg d'eau, il y'a mort des ovocytes bovins (Guyader, 1998).

La durée de MIV est de 24h (certains se limitent à 22h) chez les ruminants dans un environnement faiblement exposé à la lumière. L'utilisation inactif permet de

limiter le stress induit par l'exposition des cellules à la lumière (Bruyere, 2000).

Selon Bruyere (2002), le volume du milieu de maturation varie 1ml (plaque multi-puits) à 10 μ l sous huile minérale (l'huile minérale(paraffine) évite l'évaporation et les modifications de la pression osmotique consécutive).

7.4. Evaluation et classification des ovocytes après maturation *in vitro*

L'objectif est d'obtenir la maturation nucléaire et surtout cytoplasmique des ovocytes ayant déjà acquis la compétence complète pour reprendre la méiose.

7.4.1. Degré d'expansion du cumulus

Parmi les aspects moléculaires qu'on observe au cours de la maturation ovocytaire, il y a l'expansion du cumulus (Humblot et *al.*, 2005), sur laquelle on peut se baser pour juger de la maturation des ovocytes.

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

7.4.2. Maturation nucléaire

La maturation nucléaire désigne les modifications observées à l'intérieure du noyau de l'ovocyte arrêté en prophase 1 jusqu'en métaphase 2 (M2). Le processus dure 24h. il commence après 4 à 8h après le pic de LH (Hyttel et *al.*, 1997) ou *in vitro* 4 à 8h après l'extraction du COC hors du follicule. La première étape visible est le stade GVB (Germinale Vesicle Break) avec rupture de la membrane nucléaire et la condensation de la chromatine environ après 6h de maturation le stade M1 est atteint après 12 à 19h de maturation.

Au bout de 20h de maturation, la majorité des ovocytes sont au stade M2 (Sirard et *al.*, 1989).

7.4.3. Maturation cytoplasmique

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

8. Fécondation et mise en culture

Après lavage, les COCs mûris sont transférés dans un milieu de fécondation où ils restent en présence de spermatozoïdes pendant 16 à 18 h. Cette étape permet de tester la qualité de la semence de différentes provenances. Une importante caractéristique recherchée chez la semence est sa capacité à supporter la congélation.

De nouvelles compositions des milieux ou encore des techniques d'assistance à la fécondation peuvent également être testées à cette étape. Après élimination des spermatozoïdes par lavage, les ovocytes fécondés sont transférés dans un milieu adapté au développement de l'embryon où la composition, la pression osmotique et la fréquence de changement des milieux sont notamment étudiées (Wirtu et *al.*, 2003).

Tout comme pendant la maturation, la nutrition durant les premières étapes du développement est capitale. En effet, l'embryon a vite fait d'épuiser ses réserves pour dépendre complètement du milieu où il baigne.

9. Transfert d'embryon

La dernière étape de la PIV est le transfert de l'embryon chez une femelle réceptrice pour le temps de la gestation. Les données de mort post-transfert présentées chez le bovin par Peterson et Lee (2003) montrent le faible rendement des méthodes utilisées. Il est encore aujourd'hui difficile de comprendre précisément la cause de ce manque d'efficacité. Outre les pertes in utero, de nombreux animaux naissent avec des malformations dont une manifestation fréquente est le syndrome

du gros veau (Young et *al.*, 1998).

Dans ce dernier cas, un défaut d'empreinte génétique semble être mis en cause (Khosla et *al.*, 2001), mais le mécanisme n'est encore que partiellement compris.

Partie expérimentale

Matériel méthode

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

La maturation des ovocytes bovins *in vitro* se passe par plusieurs étapes : le prélèvement des ovaires à partir des vaches abattus, transport des ovaires jusqu'au laboratoire, ponction des follicules, collecte des ovocytes et la mise en culture. Cette étape est influencée par plusieurs facteurs : les conditions d'acheminement des ovaires, techniques de récolte des ovocytes, les milieux et les conditions utilisés lors de l'incubation,

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

181 ovaires ont été prélevés à partir des vaches abattus au niveau de l'abattoir d'Eucalyptus (Alger) et acheminé jusqu'au laboratoire.

1.2 Matériel de collecte et d'observation

Dans notre étude nous avons utilisés le matériel suivant

- 1 : Gants d'examen(stériles).
- 2 : boites en plastique.
- 3 : Paire de ciseaux.
- 4 : NaCl 0,9%.
- 5 : Seringues : 2,5ml, 5ml, 10ml, 50ml.
- 6 : Aiguilles 18G.
- 7 : Alcool 70%.
- 8 : Compresses stériles.
- 9 : Essuie tout.
- 10 : Eau de javel.
- 11 : Boites de pétri quadrillées.
- 12: Sacs en plastique réformables.
- 13 : Tubes secs
- 14 : étiquettes.
- 15 : Microscope inversé.
- 16: Bain marie.
- 17 : Centrifugeuse.

Figure 11:Matériel et produits utilisés pour la récolte des ovaires (a) paire de ciseau, b)solution saline NaCl 0,9% , seringue lier avec une aiguille, gants, boîte en plastique contenant les ovaires) (original,2022)

Le lieu de travaille (paillasse de laboratoire) doit être désinfecter à l'aide de d'eau de javel pur appliqué sur la paillasse avec un papier (essuie tout) avant et après chaque manipulation.

les ovaires ont été rincés 2 à 3 fois avec une solution saline (NaCl 0,9%) après lesdésinfecter à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool 70% pour éliminer toute trace de sang et les impuretés (**Fig.12**).

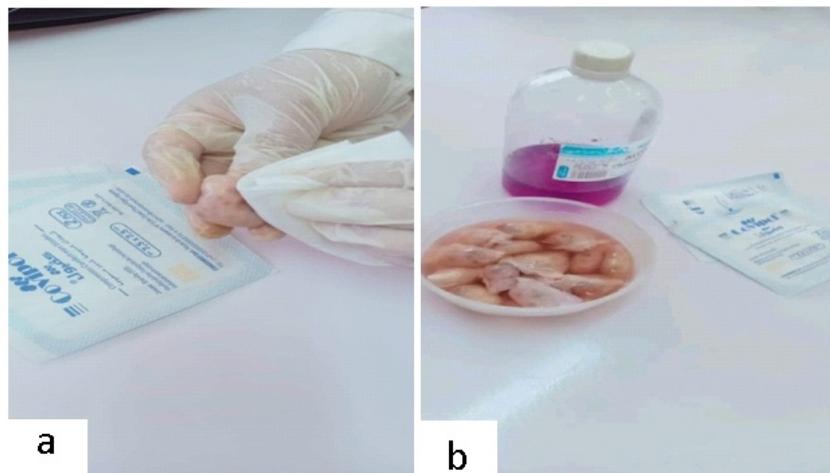


Figure 12 :Matériels et produits utilisés pour la préparation des ovaires à la ponction (a) désinfection des ovaires avec une compresse, b) alcool 70%, compresse, boîte en plastique contenant les ovaires et NaCl 0.9%)(original,2022)

2.2. Ponction des follicules

Après la préparation des ovaires nous avons passés à la ponction des follicules pour le prélèvement des ovocytes et le liquide folliculaire (**Fig.13**)



Figure 13:Materiels et produits utilises pour la ponction des follicules (tubes

sec, PBS, seringues luer avec des aiguilles 18G)(original,2022)

Les follicules en surface ont été classés en 2 catégories :

. La première : pour les follicules de diamètre inférieur à 5mm, ont été ponctionnés pour le prélèvement des COCs.

. La deuxième : pour les follicules de diamètre supérieur à 5mm, ont été ponctionnés pour le prélèvement du liquide folliculaire.

La ponction des follicules a été faite à l'aide d'une aiguille de 18G liée avec une seringue de 5ml ou 10ml remplie par 0.5ml de PBS (Satrapaetal, 2010).

Nous avons appliqués la méthode de ponction par aspiration (Fig.14).



Figure14 :Ponction des follicules en surface(original,2022)

Le liquide obtenu à partir du premier groupe des follicules a été mis dans une boîte de pétri quadrillées préalablement remplies à $\frac{1}{4}$ avec du PBS (**Fig.15**).

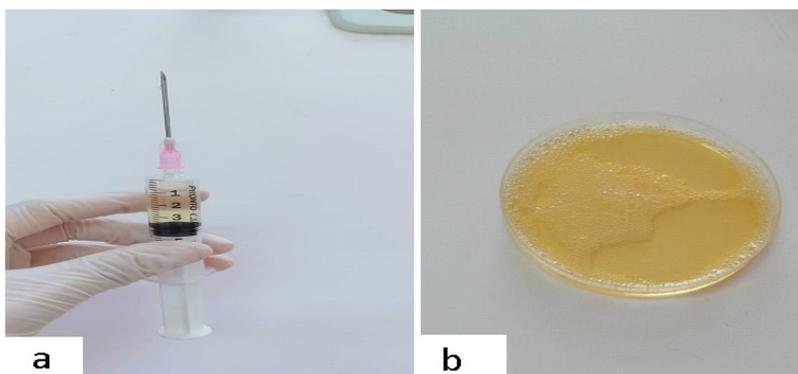


Figure 15 :Liquide prélevé à partir de la ponction des follicules du premier groupe (a) seringue contenant le liquide aspiré, b) boîte pétrie carillée contenant le liquide aspiré) (original,2022)

2.3. Préparation du liquide folliculaire

Concernant le liquide aspiré du deuxième groupe, nous l'avons mis dans des

tubes secs pour le centrifuger à 2000 tours pendant 10 minutes, après la première centrifugation le surnageant a été prélevé pour le re-centrifuger une deuxième fois de la même manière. Le deuxième surnageant est prélevé et placé dans des autres tubes secs étiquetés avec la date du prélèvement, le liquide soit utilisé pour la MIV dans le même jour, soit congelé à 20°C pour une utilisation ultérieure.

Le jour de l'utilisation du liquide folliculaire, le liquide doit être décongelé puis le maintenir au bain-marie à 50°C pendant 30 minutes (Kamari *et al.*, 2010) (**Fig.16**).

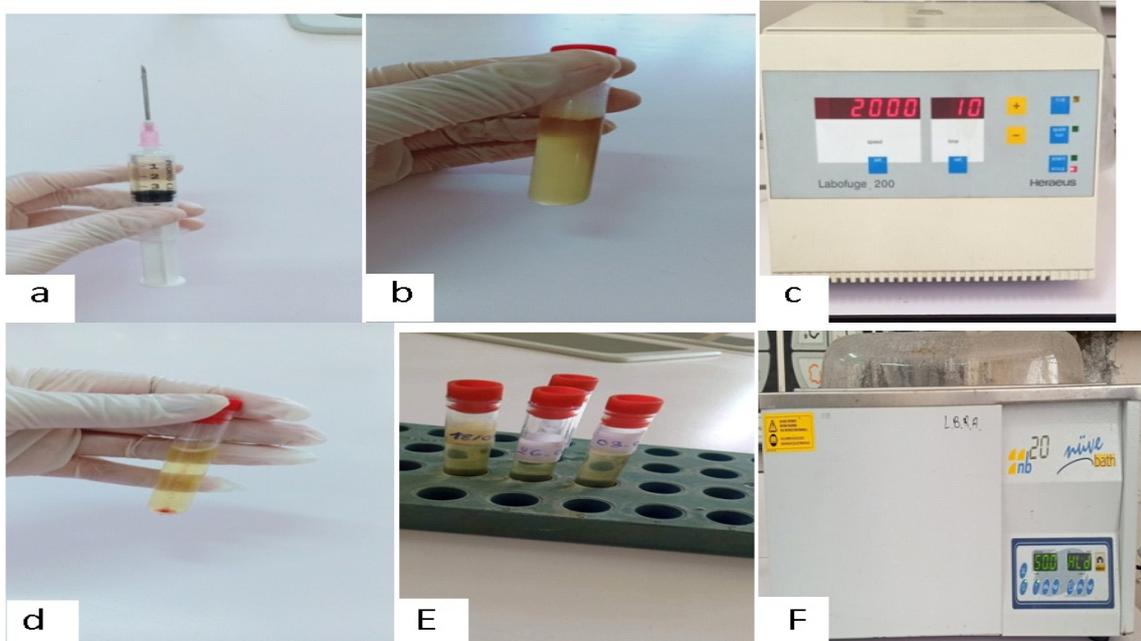


Figure 16 : Matériel utilisé pour la préparation du liquide folliculaire (a) seringue contenant le liquide aspiré, b) tube sec contenant le liquide aspiré, c) centrifugeuse, d) le liquide après la centrifugation, e) tubes secs étiquetés contenant le liquide après la 2^{ème} centrifugation, f) bain-marie) (original, 2022)

2.4. Observation de la boîte de pétri

Avec un microscope inversé au objectif $\times 4$ nous avons observés les boîtes de pétri (**Fig.17**).



Figure17 :Observation des cocs sous le microscope inverse au objectif×4.(original,2022)

2.5. Collecte et rinçage des COCs

Les COCs de classe 3 et 4 sont éliminés de l'étude , et pour les COCs de classe 1 et 2 (de bonne qualité) ont été prélevées à l'aide d'une seringue de 5 ml liée avec une aiguille (Fig 19) pour être rincer 3 fois dans 2 ou 2,5 ml de PBS(Cetica et *al.*,1999 ;Wangetal, 2007)(Fig.18 ; 19).

Dans cette étape, nous n'avons pas utilisés les gants car ils nous dérangent mais à condition de nous désinfecter les mains avant chaque manipulation.



Figure 18 : Prélèvement des COCs classe 1 et 2 (original,2022)



Figure 19 : 3 rinçage. (original,2022)

NB:le nombre total des cocs a été diminué après chaque rinçage en raison des conditions de travail.

2.6. Milieux utilisés pour la maturation *in vitro*

Pour les milieux de culture nous avons testé 3 milieux :

Milieu 1: milieu de base TCM199 seul.

Milieu 2: milieu de base TCM199 avec 10% de liquide folliculaire.

Milieu 3: milieu de base TCM199 avec 50% de liquide folliculaire.

2.7. Mise en culture des COCs

Après le troisième rinçage, les COCs sont prélevés à l'aide d'une seringue 5ml liée avec une aiguille et placés dans une boîte de pétri contenant 0.5ml des 03 milieux de maturation(chaque milieu dans une boîte différente). Les boîtes ont été introduites dans un sac en plastique fermé hermétiquement. Afin d'assurer une humidité suffisante dans le sac, une boîte de pétri remplie d'eau ou NaCl 0,9% est placée dans le sac avec la boîte du milieu de culture. Ensuite, à l'aide d'une seringue de 50ml liée avec une aiguille, 5% de CO₂ a été prélevé de la bonbonne à CO₂ et insufflé dans le sac avant sa fermeture (Bal Pénélope, 2004) (Fig.20).

Après 24h de mise en maturation à une température de 38°C, les COCs observés à l'aide d'un microscope inversé au objectif ×4.

Nb:

Après la première culture nous avons remarqués que le milieu de base TCM199 a été contaminé, après nous avons essayé de le filtrer.

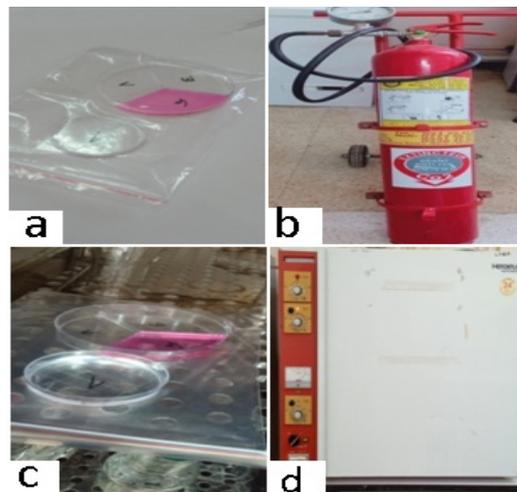


Figure 20: matériels et produits utilisés pour l'incubation : a) boîte de pétri, sac en plastique refemable, boîte de pétri remplie par NaCl 9%, b) bonbonne à CO₂, c) la mise en incubation des COCs pendant 24h, d) étuve réglée à 38°C. (original, 202

le seul aspect morphologique qu'on observe est l'expansion de cellules de cumulus.

Résultats

les COCs trouvés sont classés en 4 classes selon leur morphologie(DeLoose et *al.*,1989 ;Alveset*al.*,2014) (fig.21).

classe1: Cumulus pluristratifié (plus de trois couches) compacté et un cytoplasme homogène.

classe2: Cumulus compacté à une ou deux couches et un cytoplasme moins homogène.

classe 3 : couche des cellules irrégulières avec un peu du cumulus oophorus moins compacté et un cytoplasme moins régulier avec des zones sombres.

classe 4 : absence de cumulus oophorus ou expansé, cytoplasme irrégulier avec des zones sombres

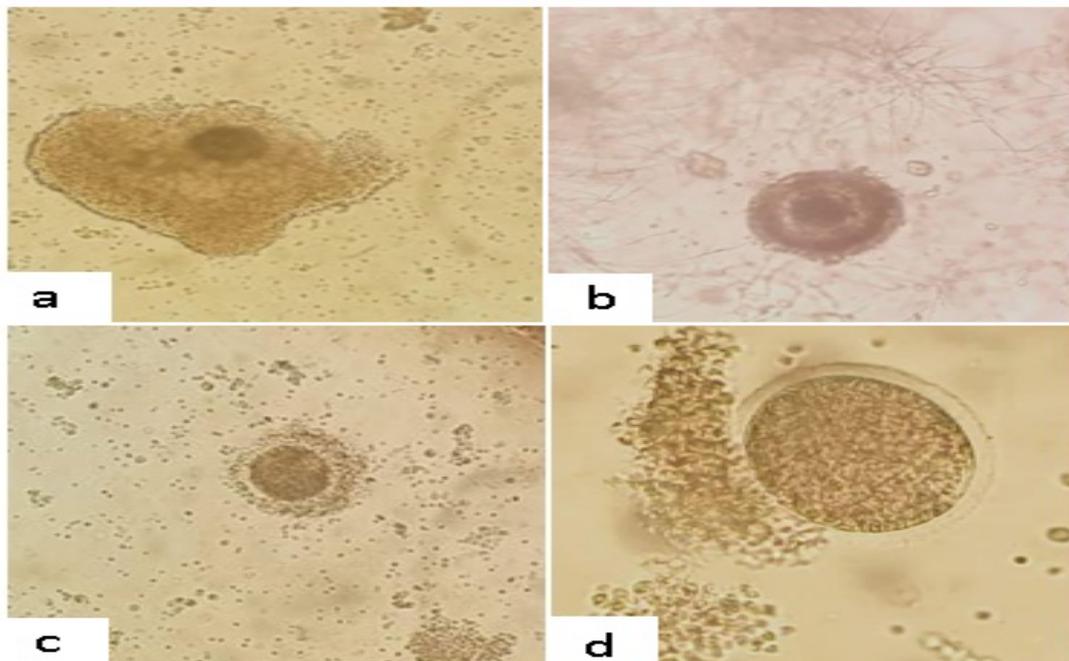


Figure21 : Classification des COCs observés sous un microscope inversé au objectif x4 :**a)** ovocyteclasse 1, **b)**ovocyte classe 2, **c)**ovocyteclasse3, **d)**ovocyteclasse4.

(original,2022)

Après l'observation des ovocytes mature sous le microscope, le seul aspect morphologique qu'on observe est l'expansion de cellules de cumulus (Fig.22).

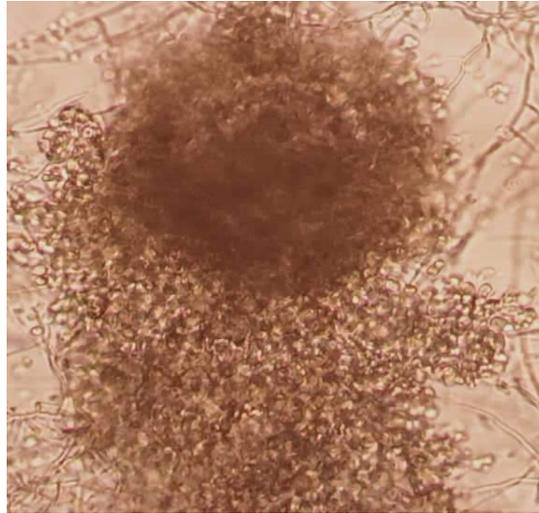


Figure 22 :Ovocyte expansé après la maturation observée sous un microscope inversé au grossissement 4 (original,2022)

Après la collecte des ovocytes par la méthode de ponction et aspiration, nous avons obtenu un taux de récupération de 3,18 COCs par ovaire (Tab. 1).

Tableau 1 :Taux de récupération des COCs dans les 03 expérimentation

Prélèvements	Nbre d'ovaires	Nbre de follicules	Nbre d'ovocytes récoltés	Taux d'ovocytes récupérés
Prélèvement 1	30	744	96	3,2
Prélèvement 2	21	521	88	4,19
Prélèvement 3	30	518	74	2,14
totale	81	1783	258	3,18

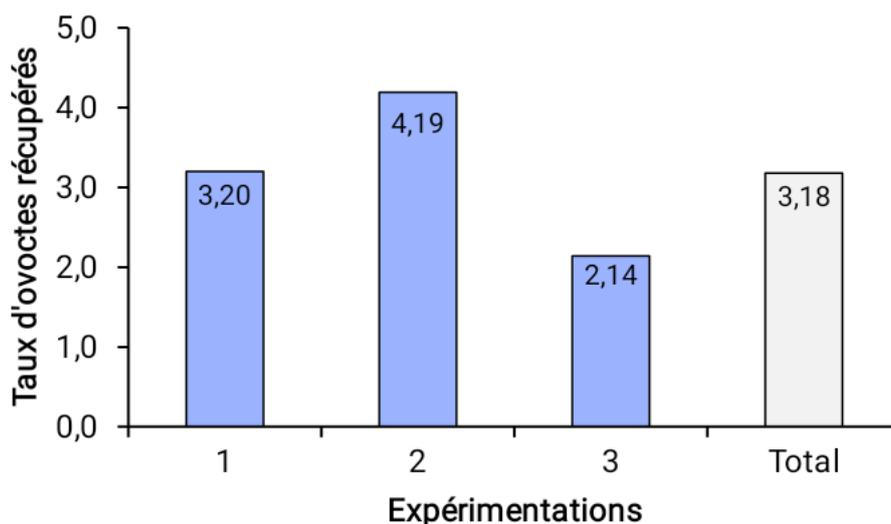


Figure 23 : Diagramme de taux de récupération des COCs dans les 03 expérimentations

Tableau2 : Pourcentage des cocs selon leurs classes

Après la collecte des COCs nous les avons classés en 04 classe : classe 01 et 02 avec un taux de 68.99% et classe 03 et 04 avec un taux de 34.10%.

Nbre de COCs classe 01 et 02	Nbre de COCs classe 03 et 04	Nbre total d'ovocytes
178 (Nbre d'ovocyte)	80	258
68.99%	34.10%	100%

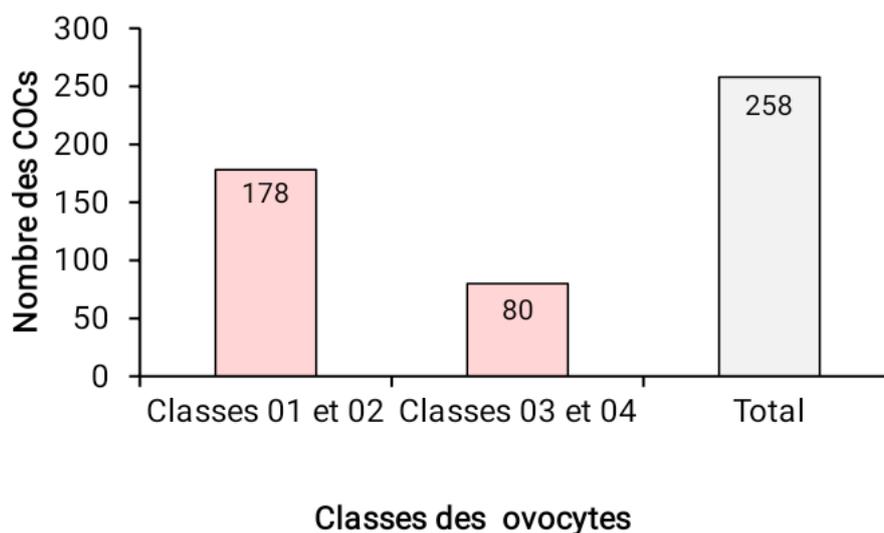


Figure 24 : Diagramme de nombre des cocs selon leurs classes

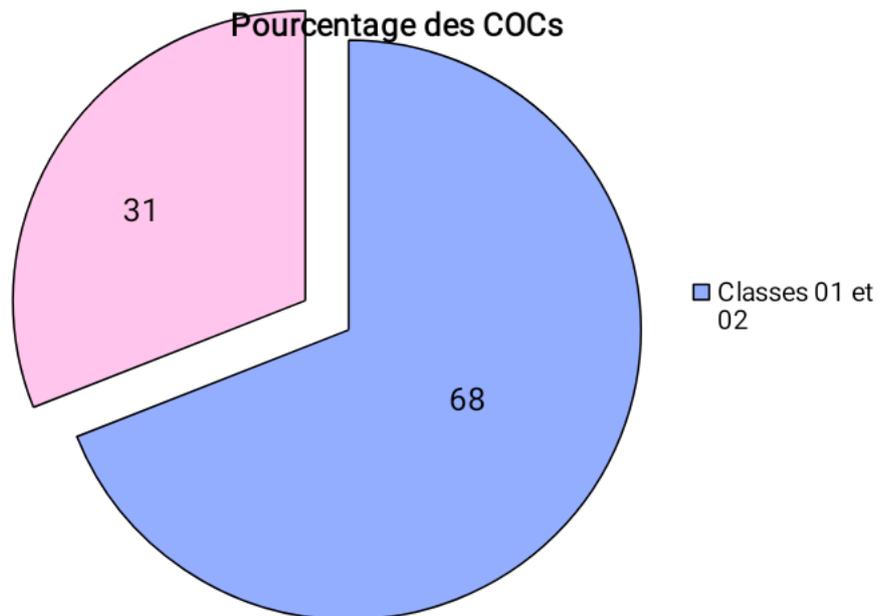


Figure 25 : Cercle relatif représente le pourcentage des COCs selon leurs classes
Les résultats de la MIV sont présentés dans 04 tableaux

Milieu 1 :

Nous avons mis 69cocs en culture dans le milieu 1 qui constitue de milieu de base TCM199 seule, nous avons observe une expansion du cumulus sur 45cocs soit un taux de65.21% et 24cocs sont restes immatures

Tableau 3 :Résultats du premier milieu après MIV

composition	Nbred'ovocytes mis en culture	Nbred'ovocytes expansés	Nbred'ovocytes non expansées	Taux d'expansion
Milieu de base TCM199 seule	69	45	24	65.21%

Milieu de base TCM-199 seul	100%	65,21%	34,78%	65,21%
--------------------------------	------	--------	--------	--------

Milieu 2 :

Nous avons mis 58COCs en culture dans le milieu 2 qui constitué de milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire, nous avons observé une expansion du cumulus sur 34 COCs soit un taux de 58,62% et 24 COCs sont restés immatures.

Tableau4 :Résultats du deuxieme milieu après MIV

composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes non expansées	Taux d'expansion
Milieu de base TCM199 + 10% de LF	58	34	24	58,62%
Milieu de base TCM199 + 10% de LF	100%	58,62%	41,37%	58,62%

Milieu 3 :

Nous avons mis 51 COCs en culture dans le milieu 3 qui constitué de milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire, nous avons observé une expansion du cumulus sur 37 COCs soit un taux de 72,54% et 14 COCs sont restés immatures.

Tableau 5:Résultat du troisieme milieu après MIV

composition	Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expansés	Nbre d'ovocytes non expansées	Taux d'expansion
Milieu de base				

TCM199 + 50% de LF	51	37	14	72,54%
Milieu de base TCM199 + 50% de LF	100%	72,54%	27,45%	72,54%

Tableau6 :Tauxglobal de MIV

Nbre d'ovocytes mis en culture	Nbre d'ovocytes expanses	Nbre d'ovocytes non expansées	Taux d'expansion
178	116	62	65,16%
100%	65,16%	34,83%	65,16%

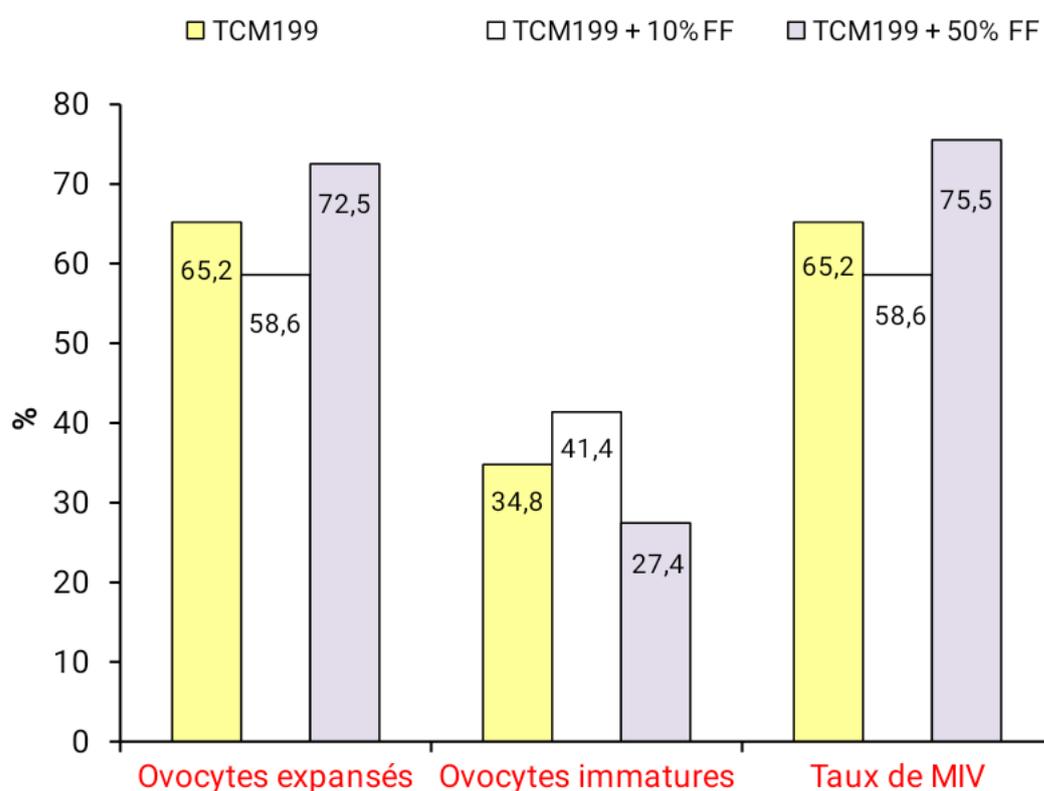


Figure 26: Diagramme de MIV des 03 milieux

Discussion

Notre étude a été faite entre l'abattoir d'Eucalyptus (Alger) et laboratoire de l'Institut des sciences de vétérinaire de Blida.

Dans notre étude 181 ovaires ont été collectés de l'abattoir et transportés jusqu'au laboratoire dans des conditions de température ambiantes selon Klumpp (2004) qui a prouvé que la température optimale pour stocker les ovaires pendant l'acheminement jusqu'au laboratoire est la température ambiante, c'a été montré par Rosenkranz (1993) qui a remarqué dans ses études que les ovaires qui ont été transportés à 20°C ont marqués une plus grande expansion du cumulus par rapport à ceux qui ont transportés à 30 et 37°C.

Le choix des follicules aspirés pour les ovocytes utilisés était en fonction de leur diamètres (inférieur ou égale 4mm) suivants les résultats obtenus par Longergan et *al.* (1994). Notre choix de ce diamètre folliculaire a été aussi selon Abraham et *al.* (2012) qui ont prouvé que la ponction des follicules antraux est utilisé chez la vache à partir des follicules de diamètre compris entre 3 et 8mm, ce qui a été également montré à partir de l'étude réalisée par Hendriksen et *al.* (2000) qui ont conclu que les ovocytes bovins acquièrent la capacité de développement après FIV à un diamètre folliculaire égale à 3mm.

La technique utilisée dans la ponction des follicules est par aspiration, cette technique pratiquée par Love et *al.* (2000) et aussi par Rivera et *al.* (2003) qui ont trouvé que cette technique est la moins onéreuse.

Dans notre étude 1783 follicules ont été ponctionnés par aspiration à partir desquels nous avons récolté 258 COCs de différentes classes soit un taux de récolte de 14.46% avec une moyenne de 3,18 ovocyte par ovaire a été obtenu, ce résultat est proche de celui de Kumar et *al.* (1997) qui est 3,10, mais inférieur à celui de Belarouci et Tafet (2017) qui est de 5,75 COCs par ovaire malgré l'utilisation de la même technique de ponction. Cela peut être dû à des défauts de manipulation, notamment lors du transfert des ovocytes pour le rinçage dans les 03 milieux de PBS. La différence du rendement en ovocytes par aspiration ou ponction pourrait résulter partiellement de la pression négative appliquée aux follicules au moment de la collecte des ovocytes. En effet, Cognié et Baril, (2002) ont remarqué qu'un supplément de 4 à 5 ovocytes peut être obtenu après découpage de l'ovaire en fines

lames (slicing) à l'aide d'une lame de rasoir.

Dans notre travail les COCs récoltés ont été classés en 4 classes en basant sur le degré d'expansion du cumulus et l'homogénéité du cytoplasme suivant la classification retenue par Kouamo et *al.* (2014). Cependant, les COCs de la classe 1 et 2 représentent 68,99% des ovocytes récoltés, les classes 3 et 4 représentent 34,10% des ovocytes récoltés.

Dans notre étude nous avons testés 3 milieux de culture différents. Le premier représenté par le milieu de base TCM199 seule, le deuxième ; milieu de base TCM199 enrichi avec 10% de liquide folliculaire et en dernier ; milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire.

Nous avons fait l'objet de 03 rinçages selon Barcelo-Fimbres et *al.* (2015) et Satitmanwiwat et *al.* (2015).

Dans notre travail, nous avons marqués un taux global de maturation des 03 milieux utilisés est de 65,16%, cependant, l'addition de différents éléments tel que les sérums, les hormones, les facteurs de croissance et les antibiotiques améliore ce taux (Sadeesh et *al.*, 2014 ; Hussain et *al.*, 2015).

Selon les auteurs, le taux de maturation peut être influencé par la température de transport des ovaires et la durée entre l'abattage des vaches et la ponction des follicules qui peut influencer la qualité ovocytaire et leur maturation *in vitro*, en comparant avec les résultats de Love et *al.* (2003) qui ont obtenu un taux égale 72% lorsque les ovocytes ont été récoltés immédiatement après l'abattage des animaux, supérieur au taux obtenu dans notre travail où la durée était importante (2 à 3h).

Dans notre étude les effets de l'ovaire (localisation, présence de corps jaune, taille et poids de l'ovaire) et les facteurs non ovariens (la race, l'âge, l'état corporel, la gestation) n'ont pas été pris en considération ce qui a diminuer le taux de maturation.

Le choix de milieu de base utilisé c'était à partir les résultats de Garcia et *al.* (1988) et Hussain et *al.* (2015) qui ont marqué une plus grande expansion du cumulus en utilisant le milieu de base TCM199.

Dans notre expérimentation, nous avons marqué un taux de maturation de 65,21% dans le premier milieu où on a utilisé le milieu de base TCM199 seul, un taux supérieur à ceux obtenu par Belarouci et Tafat (2017) qui ont obtenu un taux de 52,54% et supérieur à ceux obtenu par Satitmanwiwat et *al.* (2015) et Foote et Thibault. (1969) qui ont enrichi le même milieu de base avec 10 et 15% de SVF et ont obtenu des taux respectivement de 53,50% et 37,64%. ce taux peut être augmenté

significativement après un enrichissement du milieu de base.

Dans le deuxième milieu où on a utilisé le milieu de base enrichi avec 10% de liquide folliculaire nous avons marqué un taux de maturation de 58,62%, un taux inférieur par rapport ceux qui a été marqué dans le premier milieu cela peut être causé par la contamination du milieu de base, cette baisse de taux a été également constaté par Ayoub et Hunter (1993) du fait que le liquide folliculaire conduit à un retard de la maturation nucléaire (Du Colomb et *al.*, 2013) et inhibe cette dernière chez la vache(Gallardo et Coll, 2001). D'après Dostal et *al.* (1996) et Choi et *al.* (1998), le liquide folliculaire des grands follicules comme on a utilisé dans notre étude a un effet inhibiteur réduit sur la maturation ovocytaire par rapport au liquide folliculaire récolté à partir de petites et moyennes follicules. Une étude récente a révélé que le liquide folliculaire favorise la maturation ovocytaire cytoplasmique lors de l'MIV et suggéré que son rôle majeur est de fournir une protection contre le stress oxydatif (Grupen et Armstrong, 2010).D'autres études ont identifié plusieurs substances dans le liquide folliculaire qui ont empêché la reprise de la méiose dans les ovocytes. Des substances inhibitrices mullériennes, des sous-produits des cellules de la granulosa, ont été trouvés pour inhiber la maturation des ovocytes de rats (Takahashi et al, 1986). L'acide linoléique, l'acide gras le plus abondant trouvé dans le liquide folliculaire, était révélé inhiber reprise de la méiose des ovocytes bovins dénudées (Homa et Brown, 1992). En outre, une autre substance, appelée Ovocyte Maturation Inhibitor (OMI), a été rapportée à supprimer la maturation des ovocytes de rats et de porcs (Tzafiriri et al, 1982). La source originale de l'OMI a été pensé pour être les cellules granuleuses (Klumpp, 2004).Cela montre que le liquide folliculaire peut être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation.

En dernier, le troisième milieu qui se compose de milieu de base TCM199 enrichi avec 50% de liquide folliculaire. Dans ce milieu nous avons marqué un taux de maturation 72,54% ce taux est supérieur à ceux obtenus dans le deuxième milieu, Certaines études ont démontré que milieu de maturation complété avec le FF fournit un environnement approprié au développement de l'ovocyte bovine (Romero-Arredondo et Seidel, 1996), car il augmente le degré de l'expansion des cellules du cumulus (Aguilar et al, 2001) et augmente le développement embryonnaire (Algriany et al., 2004). un taux proche à ceux obtenu par Cruz et *al.* (2014) de 70,11% et inférieure à ceux obtenu par Gupta et *al.* (2001) de 81,30% avec l'ajout de glutamine. D'après Waston et *al.* (2000), quand il a ajouté le liquide folliculaire il a obtenu un

faible taux de maturation (52%) par rapport à l'enrichissement avec l'ECS(sérum de vache en chaleur) (78%), FBS (sérum de veau foetale) (79%) et le BAF (fluide AminioticSerum) (77%), ces résultats confirme la nécessité de présence des sérums dans le milieu de maturation.

Conclusion

Cette étude a été menée pour développer les techniques pratiquées durant la maturation des ovocytes bovins *in vitro*, applicable au laboratoire de l'institut des sciences vétérinaires de Blida à partir des ovaires récoltés au niveau de l'abattoir. Afin de tester l'efficacité d'enrichissement de milieu de culture avec différentes concentrations de liquide folliculaire à augmenter le taux de la MIV.

Notre étude a donné des résultats encourageants par l'enrichissement de milieu de culture TCM199 avec des protéines, des hormones et des facteurs de croissance indispensables pour la MIV tel que sa présence au cours de la maturation *in vivo*.

Le respect de la composition et de la température du milieu de récolte des ovaires ainsi que leur durée de transport sont indispensables pour une bonne conservation des ovaires avant la récolte des ovocytes.

Le taux de récolte obtenu peut être amélioré par l'utilisation des moyens techniques plus adaptés pour l'aspiration et récolte des ovocytes.

L'utilisation d'un milieu de base (TCM199) enrichi de 50% de fluide folliculaire a permis d'obtenir un taux de maturation ovocytaire plus élevé.

Il doit tenir compte de certains facteurs qui influencent sur le rendement et la qualité des ovocytes tels que l'âge de la vache donneuse, la gestation, l'état physiologique, le poids et le volume des ovaires, la technique utilisée pour la récolte des COCs et les conditions de mise en maturation.

Notre perspective :

1/ Essayer de réaliser toutes les étapes restantes de la technique de P.I.Vd'embryons: la capacitation des spermatozoïdes, la fécondation des ovocytes maturés *in vitro* et le développement des œufs jusqu'au stade blastocyste.

2/ Utiliser cette technique pour promouvoir les races Algériennes en voie d'extinction.

3/ Instaurer cette technique dans l'enseignement pratique (niveau Master).

Références bibliographiques

Abraham, M.C.; Gustafsson, H.; Ruete, A.; Brandt, Y.C. Breed influences on in vitro development of abattoir-derived bovine oocytes. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2012., 54, 1-6.

Adamiak, S.J.; Mackie, .K.; Watt R.G.; Webb, R.; Sinclair, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality : cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol.Reprod.* 2005 , 73, 918- 926.

Adams, G.; Jaiswal, R.; Singh, J.; Malhi, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008, 69(1), 72- 80.

Adams, G.; Singh, J.; Baerwald, A. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology*. 2012, 78(8), 1733- 1748.

Aerts, J.; Bols, P. Ovarian Follicular Dynamics : A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I :Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod in dom anim.* 2010a 45(1), 171-179.

Aerts, J.; Bols, P. Ovarian follicular dynamics : A review with emphasis on the bovine species. Part II :Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod in domc anim.* 2010b, 45(1), 180- 187.

Agrawal, K.P.; Sharma, T.; Sexana, C.; Sharma, N. Chronology of first meiotic events of caprine oocytes matured in vitro. *Indian J. Anim. Sci.*. 1995 65, 285-288.

Ali, A.; Sirard, M.A. The effects of 17 β -estradiol and protein supplément on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote* . 2002b, 10(1), 65-71.

Ali A. 2003. Optimizing a complète defined médium for maturing bovine oocytes. Département des Sciences Animales. Sainte Foy: Université Laval. 238 p.

Alves, B.G.; Alves, A.K.; Lucio, A.C.; Martins, C.M.; Silva, T.H. and Santos, R.M. Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profil of serum and follicular fluid from girolando dairy cows postpartum. *Anim. Reprod.Sci.* <http://.dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.019>.

Anguita, B.; Vandaele, L.; Mateusen, B.; Maes, D.; Soom, A.V. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* .2007, 67, 537-549.

Bao, B.; Garverick, H. A. . Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves : a review. *J. Anim.Sci.* 1998, 76(7), 1903-1921.

Beker-van Woudenberg, A.R.; Zeinstra, E.C.; Roelen, B.A.J.; Colenbrander, B.; Bevers,

M.M. Developmental compétence of bovine oocytes after spécifique inhibition of MPF kinaseactivity : Effect of estradiol supplementation and follicle size. *Anim.Reprod.Sci* ,. 2006, 92(3-4) :231-240.

Bender, K.; Walsh, S.; Evans, A.C.; Fair T.; Brennan, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction*, 2010, 139, 1047-1055.

Blondin, P.; Bousquet, D.; Twagiramungu, H.; Barnes, F.; Sirard, M.A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes.*Biol.Reprod.* 2002, 66, 38-43.

Blondin, P.; Coenen, K.; Guilbault, L.A.; Sirard, M.A. In vitro production of bovine embryos : developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 1997, 47, 1061-1075

Boni, R. Origins and effects of oocyte quality in cattle.*Anim.Reprod.* 2012, 9, 333-340.

Braw, T.R.; Youssef, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary.*J. reprod.fertil.* 1997, 109(1), 165-171.

Bridges, P.J.; Fortune, J.E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle.*Mol.cell.endoc.* 2007, 263(1), 1-9.

Bruyer (2002) thèse: maturation ovocytaire in vitro chez la vache thèse de docteur vétérinaire

Carolan,C.P.; Lonergan P.A. Mermillod, P. caractezation of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes, *j. reprod. fertil.* 1997, 111, 267-275

Cetica, P.D.; Dalvit, G.C.; Beconi, M.T. Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell.* 1999, 23, 125-133.

Cha, K.Y.; Koo, j.j.; Ko jj.; Choi, D.H.; Han, S.y.; Yoon T.k. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocyte collected from nonstimulated cycles their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Les organes génitaux de la femme zbu. Rev. Elev. Méd. Vét pays trop.* 28, 331-403.

Comin A., Gerin D., Cappa A., Marchi V., Renaville R., Motta M., Fazzini U. &Prandi A..The effect of an acute energy deficit on the hormone.of dominant follicles in dairy cows.*Theriogenology*, 2002, 58 (5), 899- 910.

De Loose, F.; Vliet, P.V.; Maurik, P.V.; Kruij, T.A. Morphology of immature bovine oocytes.*Gamete Res.* 1989, 24, 197-204.

Dieleman, S.J.; Kruij, T.A.; Fontijne P.; de Jong W.H, van der Weyden, G.C. Changes in

oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol.* 1983, 97(1), 31-42.

Drion, P.V.; Beckers, J.F.; Ectors, F.J.; Hanzen, C.; Houtain, J.Y.; Lonergan, P. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale. *Le Point Veterinaire*, 1996, 28, 811-891.

Erickson, B. Development and radio response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod Fertil*, 1966a, 11(1), 97-105.

Erickson, B. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim Sci.* 1966b, 25(3), 800-805.

Espey, L.L.; Lipner, H. Ovulation. In *The Physiology of Reproduction*, Raven Press., 2ed. New York, Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds), 1994, Pp. 725-780

Fagbohun et Downs (1990). Collecte et maturation des ovocytes bovins 39p. projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire présenté par Belarouci Fatma zohra et TafetNaouel institut des sciences vétérinaires-Blida

Fair, T.; Hyttel, P.; Greve, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. reprod. deve.* 1995, 42(4), 437-442.

Fassi Fihri Aicha., (2006) Collecte et maturation des ovocytes bovins : effet de l'état nutritionnel sur le rendement et la qualité des ovocytes, THÈSE Présentée pour obtenir le Diplôme de Doctorat d'Etat Es-Sciences Biologiques

Fortune, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol.Reprod.* 1994, 50(2), 225-232.

Fortune, J.E.; Yang, M.Y.; Muruvi, W. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reprod, Fertil.Develop.* 2010, 23(1), 15-22.

Fortune, J.E.; Cushman, R.A.; Wahl, C.M.; Kito, S. The primordial to primary follicle transition. *Mol.cell.endo.* 2000, 163(1), 53-60.

Fortune, J.E.; Rivera, G.M.; Yang, M.Y. Follicular development : the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *anim. reprod. Sci.* 2004, 82, 109-126.

Foudani, A.A., Waddington, D., Cambell, K.H.S.. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro : A comparative evaluation of antral follicle culture with other method. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 255-262.

Ginther, O.J.; Kot, K.; Kulick, L.J.; Wiltbank, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology.* 1997, 48(1), 75-

87.

Gong, J.G.; Bramley, T.A.; Webb, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J.reprod. fertil.* 1993, 97(1), 247-254.

Gordon, I, (2003). *Laboratory production of cattle embryos*.CABI.

Gosden, R.G.; Hunter, R.H.; Telfer E.; Torrance, C.; Brown, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 1988, 82, 813-825.

Guerrero Netro, H.M. (2013). Differential regulation of early response genes by fibroblast growth factor (fgf) 8 and fgf18 in bovine granulosa cells in vitro. (Universite de Montreal). Repéré à https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10583/Guerrero_Netro_Hilda_Morayma_2013_memoire.pdf?sequence=2

Hanzen, C.H. (1994). Etude des facteurs de risque de l'infertilité et des pathologies puerpérales et du postpartum chez la vache laitière et la vache viandeuse. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade d'agrégé de l'enseignement supérieur. Université de Liège faculté de médecine vétérinaire service de thériogenologie des animaux de production.p. 172.

Hanzen C.H, Lourtie O, Drion P. Le développement folliculaire chez la vache aspects morphologiques et cinétiques. *Biol. Reprod*, 2000, 144, 223-235.

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407(6805), 770-776.

Hsueh, A.J.; Billig, H.; Tsafiriri, A. Ovarian Follicle Atresia : A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocr Rev.* 1994, 15(6), 707-724.

Humblot P.; Holm P.; Lonergan P.; Wrezycki C.; Lequarré A.S.; Guyader C.; Hermann D.; Lopes A.; Rizos D.; Niemann H.; Callesen H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2005, 63, 1149- 1166.

Hunter R.H.F. *Physiology and Technology of reproduction in Female Domestic Animals*. New York, Academic Press in, (Eds)1980, pp. 1- 225.

Hussein, M.R. Apoptosis in the ovary : molecular mechanisms. *Hum. reprod.update*, 2005, 11(2), 162-178.

. Hussain, M.R.; Chakravarty, P.; Soren, S.; Deori, S.; Begum, S. Effect of recovery technique Mand culture media on in vitro maturation of indigenous cattle oocytes of Assam, *J. Anim. Res.* 2013, 49, 51-54

Irving-Rodgers, H.F.; Van Wezel, I.I.; Mussard, M.L.; Kinder, J.E.; Rodgers, R.J.

.Atresiarevisited : two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reprod.* 2001, 122(5), 761-775.

Izadyar F.; Zeinstra E.; Bevers M.M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51(3), 339-345.

.Kouamo, J.; Dawaye, S.M.; Zoli, A.P.; Bah, G.S ; Evaluation of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential for in vitro embryo production in the Adamawa plateau (Cameroon)], *Open. Vet. J.* 2014, 4(2):128-36.

Jorritsma, R.U, (2003). Negative energy balance in dairy cows as related to fertility. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, PhD thesis.

Khosla, S.A.; Dean, W.E.; Reik, W.O.; Feil, R.O. Epigenetic and experimental modifications in early mammalian development : Part II – Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum. Reprod. Upd.* 2001, 7, 419-427

Knight, P.G.; Glister, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Repro*, 2006, 132(2), 191-206.

Ko, J.C.; Kastelic, J.P.; Del Campo, M.R.; Ginther, O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. reprod. Fertile.* 1991, 91(2), 511-519.

Lavoir, M.; Fortune, J.E. Follicular dynamics in heifers after injection of PGF α during the first wave of follicular development. *Theriogenology*, 1990, 33(1), 270.

Leroy, J.L.; Vanholder, T.; Delanghe J.R.; Opsomer, G. Van Soom, A.; Bols, P.E.; de Kruif, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from differentsized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 2004b, 80 (3-4), 201-211.

Leymarie, P. ; Martal, J. Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. Dans: Thibault et Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris. Intra Ellipses. (Eds)2001, pp, 477- 503

Lodde et al., 2007. Essais de la maturation ovocytaire in vitro chez la vache présenté par belarouci fatma zohra et tafatnaouel(2017).

Luciano, A.M.; franciosi, f.; dieci, c.; tessaro, i.; terzaghi, l.; modina, s.c.; Lode, v. large-scale chromatine structure and function changes during oogenesis ; the interplay

between oocyte and companion cumulus cells, *Anim. Reprod.* 2014 v.11, n.3, p.141-149

Lucy, M. .The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. sci*, 2007, 85(13 suppl), E89-E99.

Marieb, N.E. *Anatomie et physiologie humaine*, éditions du nouveau pédagogique inc. the benjamin/cumming publishing company inc, 1999, 1-1204.

Matzuk, M. ; Burns, K.H.; Viveiros, M.; Eppig, J. Intercellular communication in the mammalian ovary :oocytes carry the conversation. *Science*. 2002, 296(5576), 2178-2180.

McGee, E.; Hsueh, A. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles 1. *Endocrine reviews*. 2000, 21(2), 200-214.

McNatty, K.; Smith, D.; Makris, A.; Osathanondh, R.; Ryan, K. The microenvironment of the human antralfollicle : interrelationships among the steroid levels in the antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 1978, 49, 851-860.

McNatty, K.; Reader, K.; Smith, P.; Heath, D.; Juengel, J. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase : a 2006 perspective. *Soci Reprod a Fertil suppl*. 2006, 64, 55-68.

MeenakshiArora Ph. D., 2013 Milieu de culture: Une Revue, 2013;3:175.

Mermillod, P.; Massip, A.; Dessy, F.; Int. Production in vitro d'embryons bovins, ovins et caprins:le point et les perspectives. *J. Dev. Biol.*, 1992a ,36, 185-195.

Mermillod, P.; Oussaid, B.; Cognie, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos.*J ReprodFertilSuppl*, 1999, 54, 449-460.

Mermillod, P. Croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. Dans: Thibault et Levasseur (Edits). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses, INRA, Paris, 2001 pp. 348- 366

Mihm, M.; Austin, E.; Good, T.; Ireland, J.; Knight, P.; Roche, J.; Ireland, J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. reprod.* 2000, 63(3), 811-819.

Monniaux, D.;Caraty, A.; Clément, F. ; Dalbiès-TranR. ; Dupont, J.: Fabre, S.; Gérard, N. ; Mermillod, P. ; Monget, P. ; UzbekovaS. Développement LPfolliculaire ovarienet ovulation chez les mammifères. *Inra Prod. Anim.* 2009, 22(2), 59-76.

Monniaux, D.; Huet, C.; Besnard, N. ; Clement, F. ; Bosc, M. ; Pisselet, C. ; Mariana, J.

Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J.reprod.fertil.Suppl.* 1996, 51, 3-23.

Natumanya, R.; Owiny, D.; Kugonza, R. The potential of Ankole cattle abattoir ovaries for in vitro embryo production. *Af. j.Anim. Biome.Sci.* 2008, 3(1), 1819-4214.

Nibart, M. ; Marquant-Leguienne, B. Productions d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. *Elevageetinsmination.* 1995, 266, 1-23.

Niswender, G.; Juengel J.; Silva, P. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *PhysiolRev.* 2000, 80, 1-29.

Nivet, A.-L. (2014). La voie génomique de la qualité ovocytaire chez la vache et chez la femme. (Universite de Laval). Repéré à www.theses.ulaval.ca/2014/30498/30498.pdf

Norris, R. ; Freudzon, M. ; Mehlmann, L.; Cowan, A.; Lampe, P.; Jaffe, L. Luteinizing hormone causes map kinase-dependent phosphorylation and closure of connexion 43 gap junctions in mouse ovarian follicles : One of two paths to meiotic resumption. *Development.* 2008, 135, 3229-3238.

O'Callaghan, D.; Yaakub, H.; Hyttel, P.; Spicer, L.; Boland, M. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J ReprodFertil.* 2000, 118 (2), 303-313.

Orsi, N.; Gopichandran, N.; Leese, H.; Picton, H.; Harris, S. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrouscycle. *Reprod.* 2005, 129 (2), 219-228.

Ponsart, C.; Pozzi, N. Sanitary requirements for bovine gametes and embryos in international trade *Anim. Reprod.* 2013, v.10,n.3,p.283-296.

Rhind, S.; McNeilly, A. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Anim Reprod Sci.* 1998, 52 (2), 131-138.

Richards, J.S.; Janhseh, T.; Hedin, L.; Lifka, J.; Ratoosh, S.; Durica, J.M.; Golding, N.B. Ovarian follicular development from physiology to molecular biology. *Recent Prog. Horm. Res.* 1987. 43: 231-276.

Rodgers, R.; Irving-Rodgers, H. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reprod.* 2010, 139(2), 309-318.

Rodriguez, K.; Farin, C. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *Theriogenology.* 2004, 61, 1499-1511.

Rüsse, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliothecaanatomica*, 1983, 24, 77.

Russell, D.; Robker, R. Molecular mechanisms of ovulation : coordination through the cumulus complex. *Hum.reprod. upd.* 2007, 13(3), 289-312.

Saeki, K.; Hoshi, M.; Leibfriedrutledge, M.; First, N. In vitro Fertilization and Development of Bovine Oocytes Matured in Serum-Free Médium. *Biol.Reprod.* 1991, 44(2), 256-260.

Salomone, D.; Adams, G.; Mapletoft, R. Changes in the cumulus-oocytecomplex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle.*Theriogenology.* 1999, 52, 549-561.

Sartori, R.; Bastos, M.; Baruselli, P.; Gimenes, L.; Ereno, R.; Barros, C. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bostaurus* and *Bosindicus* cattle in a tropical environment.In: Lucy MC, Pate JL, Smith MF, Spencer TE (Org.). *Reproduction in Domestic Ruminants VII.* Nottingham, UK: Nottingham University Press. 2010, V.1, pp. 357-375.

Satrapa, R.; Nabhan, T.; SILVA, C.; Simões, R.; Razza, E.; Puelker, R.; Trinc, L.; Barros, C. Influence of sire breed (*Bosindicus* versus *Bostaurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2010, 76, 1162-1167.

Scaramuzzi, R.; Baird, D.; Campbell, B.; Driancourt, M.A.; Dupont, J.; Fortune, J.; McNeilly, A. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertil. Devel.* 2011, 23(3), 444-467.

Sirard, M.A.; Blondin, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42, 417- 426.

Sirard, M.; Florman, H.; Leibfried-Rutledge, M.; Barnes, F.; Sims, M.; First N. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes.*Biol.reprod.* 1989, 40(6), 1257-1263.

Sirard, M.; Richard, F.; Blondin, P.; Robert, C. Contribution of the oocyte to embryo quality.*Theriogenology.* 2006, 65, 126-136.

Sirois, J.; Fortune, J. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography.*Biol.Reprod.* 1988, 39(2), 308-317.

Sirois J.; Fortune J. Lengthening the Bovine Estrous Cycle with Low Levels of Exogenous Progesterone : A Model for Studying Ovarian Follicular Dominance. *Endoc.* 1990, 127(2), 916-925.

Sutton-McDowall, M.; Gilchrist, R.; Thompson, J. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on

oocytedevelopmental capacity. Hum. Reprod. Update. 2003, 9, 35- 48.

Thibault, C. ; Levasseur, M. 2000. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA, editor : Ellipses, p 928

Trounson, A.; Pushett, D.; Maclellan, L.J.; Lewis, I.; Gardner, D. Current Status of Ivm/Ivf and Embryo Culture in Humans and Farm-Animals. Therio. 1994, 41(I), 57-66.

Trounson, A.; Wood, C.; Kausche, A. in vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertile. steril. 1994, 62, 353-62.

Veeck, L; Wortham, J.; Witmyer, J.; Sandow, B.; Acosta, A.; Garcia, J.; Jones, G.; Jones, H. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. Fertile stil. 1983, 39, 594-602.

Wang, Z.; Song-Dong, Y.; Zi-Rong, X. Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in Holstein cow. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2007, 20(4), 496 – 500.

Wani, N.; Wani, G.; Khana, M.; Sidiqi, M. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilization procedures in sheep. Sma.Rum.Res. 1999, 34, 71-76.

Wirtu, G.; Pope, C.; Damiani, P.; Miller, F.; Dresser, B.; Short, C.; Godke, R.; Bavister, B. Development of in-vitro-derived bovine embryos in protein-free media : effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. Reprod Fert Develop. 2003, 15(8), 439-449

Yang, S.h.; Son W.y.; Yoon S.h.; Ko, Y.; Lim, J.h. correlation between in vitro maturation and expression of lh receptor in cumulus cells of the oocytes collected from pcos patients in hcg-primed ivm cycles. Hum reprod. 2005, 20, 2097-103

Young, L.E.; Sinclair, K.D.; Wilmut, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. Rev.Reprod. 1998, 3(3), 155-163.

Zamberlam, G.d.O. (2013).The involvement of nitric oxide in bovine follicular development and ovulation. (Universite de Montreal). Repéré à https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10517/Zamberlam_Gustavo_2013_these.pdf?sequence=6

Zuelke, K.; Brackett, B. Luteinizing Hormone-Enhanced In vitro Maturation of Bovine Oocytes with and without Protein Supplement. Biol Reprod. 1990, 43(5), 784-787.

Annexes

Annexe 01

Tableau 7 : Tableau synthétiques de ponction des ovaires, des milieux et des conditions de leur transport.

Etude	Milieu de transport des ovaires	Température et durée de transport	Technique de ponction des follicules	Milieu de base pour MIV	Taux de MIV
Belarouci et Tafate (2017)	-Une solution saline(NaCl 9%) seule	- température ambiante -1 à 2h	Aspiration	TCM199	56.89
				SMM	56.11
Bahlouli et al. (2015)	K Simplex OptimizatioMédium (KSOM)	-4°C -2 à 3h	Tranchage	TCM199	80.2% (MIV) 43.2% (embryonsclivés)
	Pijako-ZiomekBavister (CZB)				41.1% (embryonsclivés)
	Charles Rosenkrans 1 (CR1)				80.5% (MIV) 43.6% (embryonsclivés)
Hussain et al. (2013)	- solution saline normale - Pénicilline G (0.06g/100ml)	-26 à 37°C -2 à 3h	Aspiration	TCM199	86.90%
			Dissection		90.24%
			Aspiration	Ham's F-12	68.33%
			Dissection		77.58%
			Aspiration	Ham's F-10	36.66%
			Dissection		40.00%
Adel et al. (2007)	/	-30 à 35°C -2h	Aspiration	TCM199	55.55%
				MEM	50%

Annexe 02

Tableau 8 :Tableau synthétique des milieux et des conditions de la maturation ovocytaire in vitro .

Etude	Milieu de base	hormones	Supplémentation en protéine/énergie	Antibiotiques	Conditions et durée d'incubation	Taux de MIV
Hussain et al. (2015)	TCM 199	FSH porcine (0.05ug/ml)	_Pyruvate de sodium (0.0009g/ml)	Gentamycine (50ug/ml)	_5% Co2	86.90%
	Ham's F-10				_38.5C°	36.66%
	Ham's F-12		_L-glutamine (0.0001g/ml) _FF(1ml/10ml) _HIOCS(1ml/10ml)		_Pendant 24h	68.33%
Satitmanwiwat Et al. (2015)	TCM 199		SVF(10%)		_5% CO2	79,80%
		PFSH(10mg/ml)	SVF(10%)		_38 C°	53,50%
		LH (5mg/ml)	SVF(10%) FF brut (10%)		_pendant 24h	78,80%
		Oestradiol (1ng/ml)	SVF(10%) Fraction basique du FF(10%)			66,30%
						79,30%
Sadeesh et al. (2014)	TCM199	_pMSG	_FBS(10%) _Pyruvate de sodium(0,80 Mm) _L-glutamine (2Mm)			65.7% Expansion 57.5% (1erGP)

		(20UI/ml) Hcg(10UI/ml)	_ECG(10ng/ml) _B- mercaptoéthanol(2 5Um) _EGF(20ng/ml) _B-mercaptoéthanol (100Um) _EGF(100ng/ml) _B- mercaptoéthanol(5 00uM)	Gentamycine (50pg/ml)	_5%CO2 _38,5C° _pendant 24h	81.5% Expansi on 67.5% (1erGP) 94.4% Expansi on 83.5% (1erGP) 79.6% Expansi on 62.5% (1erGP)
Adel et <i>al.</i> (2007)	TCM199	HCG (40UI)	_SVF (1.5ml) _Glutamine(2%)	_pénicilline _Streptomycin e (200ul)	_5%CO2 _100% humidité _38C° _pandant 24h	54.92%
	MEM					50%
	MEM					63.64%

Fassi (2006)	199 Hepes (8.5ml)	_E2 17B (10UI) _FSH/LH (100ul)	_SVF (1.5ml) _Cellules de la granulosa (6×10 ⁶ /ml)	Gentamycine (100UI)	_5%CO2 _39C° _pendant 24 a 26h	20.7%
/	/	/ estradiol	/ 70 _SVF(2ml) _Faible [FF]	/	/	/
Bruyere (2002)	TCM199 (18ml)	_(20ug) _FSH(200ug)	_produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			22.2%
		cestradiol (20ug) _FSH(200ug) _LH(40ug)	_EGF(100ng) _Faible[FF] _Produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			87.5%
	TCM199 18ml				_5% CO2 _Air saturé en eau	

					_38.5C° _pendant 24 h	83.87%
		_FSH(200ug) _LH(40ug)	_SVF (2ml) _EGF(100ng) _Faible[FF] _produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes	_Antibiotique _antifingique (200ul)		
		_FSH(200ug) _LH(100ug)	_SVF(2ml) _EGF(200ng) _Glutamine (4mg) _Gystéine (0,6mg) _Glycine(6mg) _Taurine (4mg) _Hypotaurine (4mg) _produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			76.66%
		_FSH(200ug) _LH(100ug)	_BSA(4.7g/l) _EGF(200ng) _Glutamine (4mg) _Gystéine (0,6mg) _Glycine(6mg) _Taurine (4mg) _Hypotaurine (4mg) _produits du métabolisme des cellules du cumulus et des ovocytes			66.66%

Gupta et al. (2001)	TCM199	/	_Seteer sérum (10%v/v)	Gentamycine (50ug/ml)	_5% CO2 _39C° _pendant 24h	34.7%
		PMSG(40UI/ml)	_Glutamine (100ug/ml)			82.3%
		/	_Huile minérale (50ul)			64.3%
		PMSG(40UI/ml)	_ [FF] de buffle (10%v/v%)			92.4%
		/	_Huile minérale(50ul) _Glutamine (100ug/ml)			
		PMSG(40UI/ml)	_FF de buffle (50%v/v) _Huile minérale(50ul) _Glutamine (100ug/ml)			81.3%
		/	_ [FF] de buffle (50%v/v)			97.3%
		PMSG(40UI/ml)	_Huile minérale(50ul) _Glutamine (100ug/ml)			90.8%
						92.4%

Foote et thibault (1969)	TCM199	/	_Sérum de veau (15%)	Streptomycine (100ug/ml)	_5% CO2	37.64 %
		/	_Sérum de veau (15%) _insuline 5ug/ml		_pendant 30h	41.7%
		_FSH(10ug/ml) _LH (2ug/ml)	_Sérum de veau(15%) _Poulain (15%)		_5CO2_ Pendant 29 a 30h	40.38 %
		/	_[[FF]]		_5%CO2 _pendant 26h	0%

