



**HAL**  
open science

## Maturation in vitro d'ovocytes bovins : effet de la conservation dans le milieu EMP3

Margaux Pellet

► **To cite this version:**

Margaux Pellet. Maturation in vitro d'ovocytes bovins : effet de la conservation dans le milieu EMP3. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03777850

**HAL Id: dumas-03777850**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03777850v1>**

Submitted on 15 Sep 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# MATURATION *IN VITRO* D'OVOCYTES BOVINS : EFFET DE LA CONSERVATION DANS LE MILIEU EMP3

---

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**PELLET Margaux, Anne, Patricia, Marie**

**Directrice de thèse : Mme Nicole HAGEN**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Roger LEANDRI**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURES :

**Mme Nicole HAGEN**

**Mme Caroline LACROUX**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**M. Mouhamadou DIAW**

Professeur à la Faculté vétérinaire de Saint-Hyacinthe de MONTREAL  
(CANADA)



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

## **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

## **MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## **INGENIEURS DE RECHERCHE**

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*



## REMERCIEMENTS

---

**A Monsieur le Professeur Roger LEANDRI,**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Médecine de la reproduction*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse,

Hommages et remerciements.

**A Madame le Professeur Nicole HAGEN,**

Professeure de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie de la reproduction*

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse,

Qui m'a encadrée et accompagnée dans ce travail,

Sincères remerciements.

**A Madame le Professeur Caroline LACROUX,**

Professeure de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Anatomie pathologique et Directrice de l'enseignement et de la vie étudiante*

Qui me fait l'honneur de prendre part au jury de cette thèse,

Sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Mouhamadou DIAW,**

Professeur à la Faculté Vétérinaire de Montréal (Canada)

*Reproduction des équidés*

Qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire,

Qui m'a encadrée et accompagnée dans ce travail,

Reconnaissance et remerciements les plus sincères.

**A toute l'équipe du laboratoire de Sainte Hyacinthe, Elena et Lauriane,**

Qui m'ont encadrée et soutenue dans ce travail,

Reconnaissance et remerciements les plus sincères.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>PARTIE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA GAMETOGENESE CHEZ LA VACHE.....</b>	<b>9</b>
I.    LE CYCLE ŒSTRAL DE LA VACHE .....	9
II.   L’OVOGENESE (MONNIAUX ET AL., 2009) .....	9
1) <i>Croissance ovocytaire.....</i>	9
2) <i>Maturation ovocytaire .....</i>	10
3) <i>Reprise de la méiose.....</i>	10
III.  LA FOLLICULOGENESE.....	10
IV.   L’OVULATION.....	15
V.    INTERACTIONS ENTRE L’OVOCYTE ET LES CELLULES SOMATIQUES AU COURS DE LA FOLLICULOGENESE.....	16
<b>PARTIE 2 : LES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION CHEZ LES BOVINS.....</b>	<b>20</b>
I.    PRESENTATION DES DIFFERENTES GENERATIONS DES BRA .....	20
1) <i>L’insémination artificielle .....</i>	20
2) <i>La production d’embryons in vivo .....</i>	21
3) <i>La production d’embryons in vitro.....</i>	21
4) <i>Le clonage somatique, la transgénèse et la réécriture du génome .....</i>	22
II.   LA PRODUCTION D’EMBRYONS IN VITRO CHEZ LA VACHE : L’OPU-FIV .....	23
1) <i>La récolte d’ovocytes par OPU .....</i>	23
2) <i>La maturation in vitro (MIV) .....</i>	24
3) <i>La fécondation in vitro .....</i>	26
4) <i>Le développement embryonnaire in vitro (DIV) .....</i>	26
5) <i>Intérêts de la technique de production d’embryons in vitro chez la vache .....</i>	27
6) <i>Bilan sur l’utilisation de la PIV en 2020 (Rapport IETS 2021) .....</i>	28
<b>PARTIE 3 : ÉVALUATION DE LA CONSERVATION D’OVOCYTES BOVIN DANS L’EMP3 .....</b>	<b>30</b>
I.    MATERIEL ET METHODES.....	30
1) <i>Composition de l’emp3.....</i>	30
2) <i>Récolte des ovocytes .....</i>	30
3) <i>Maturation des ovocytes :.....</i>	33
4) <i>Évaluation de la maturation in vitro .....</i>	34
5) <i>Séparation des cellules du cumulus et des ovocytes .....</i>	35
6) <i>Évaluation des caractéristiques des ovocytes .....</i>	36
7) <i>Expression du gène StAR .....</i>	37
8) <i>Analyse statistique .....</i>	39
II.   RESULTATS .....	40
1) <i>Expansion des cellules du cumulus .....</i>	40
2) <i>Maturation nucléaire des ovocytes in vitro.....</i>	43
3) <i>Expression du gène StAR dans les cellules du cumulus .....</i>	44
III.  DISCUSSION.....	46
1) <i>Conditions de l’expérience.....</i>	46
2) <i>Marqueurs de la maturation ovocytaire in vitro chez la vache .....</i>	48
3) <i>Bilan des résultats .....</i>	50
4) <i>Perspectives du projet.....</i>	50
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>51</b>



<b>LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXE N°1 : COMPOSITION DU MILIEU EMP3.....</b>	<b>58</b>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1:</b> Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire ...	11
<b>Figure 2:</b> Représentation des différents stades de croissance des follicules.....	12
<b>Figure 3:</b> Les vagues folliculaires durant le cycle oestral de la vache, recrutement, sélection et dominance.....	14
<b>Figure 4:</b> Représentation schématique des interactions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus pendant la croissance folliculaire.....	19
<b>Figure 5:</b> Technique de prélèvement d'ovocyte par OPU chez la vache .....	24
<b>Figure 6:</b> Nombre d'embryons bovins produits in vivo ou produits in vitro et nombre total enregistrés sur la période 2001-2020.....	28
<b>Figure 7:</b> Classification morphologique des complexes ovocytes- cellules du cumulus .....	32
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique de la maturation des ovocytes en boîte de Petri .....	34
<b>Figure 9:</b> Gradation des ovocytes après la maturation in vitro .....	35
<b>Figure 10:</b> Stades de maturation nucléaire des ovocytes de bovin observés au microscope à fluorescence.....	37
<b>Figure 11:</b> Répartition des COC des groupes contrôles suivant leur grade d'expansion avant et après maturation in vitro (les groupes contrôles n'ont pas subi de conservation dans l'emP3).....	41
<b>Figure 12:</b> Répartition des COC suivant leur grade d'expansion avant et après maturation in vitro en fonction des conditions de conservation dans l'emP3 soit 24h à 4°C, 24h à 22°C, 12h à 4°C, et 12h à 22°C. Les COC du groupe contrôle n'ont pas subi d'étape de conservation dans l'emP3 .....	42
<b>Figure 13:</b> Abondance relative des ARNm codant pour la protéine StAR ( $\pm$ S.E.M) dans les cellules du cumulus après conservation dans l'emP3 pendant 12h ou 24h et à 22°C ou à 4°C après maturation in vitro.....	44
<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques morphologiques du follicule bovin selon le stade de développement .....	13
<b>Tableau 2:</b> Nombre de femelles de différentes espèces domestiques inséminées en France pour la campagne 2019-2020 .....	20
<b>Tableau 3:</b> Nombre d'embryons produits in vivo et transférés en 2020 selon les continents et les espèces.....	21
<b>Tableau 4:</b> Nombre d'embryons produits in vitro et transférés en 2020.....	22
<b>Tableau 5:</b> Nombre d'embryons bovins produits et transférés en 2020.....	29
<b>Tableau 6:</b> Conditions expérimentales pour les différents groupes d'ovocytes d'un lot. Cette étude a été répétée 3 fois (3 lots différents).....	33
<b>Tableau 7:</b> Composition du milieu de maturation des ovocytes.....	33
<b>Tableau 8:</b> Amorces utilisées pour évaluer l'expression du gène StAR .....	38
<b>Tableau 9:</b> Répartition des COC selon les grades d'expansion avant et après la maturation in vitro et en fonction des conditions de conservation (contrôle : sans conservation ou emP3), de la température (4°C ou 22°C), de la durée (12h ou 24h).....	40
<b>Tableau 10:</b> Pourcentage des ovocytes en métaphase II après maturation in vitro, en fonction des conditions de conservation dans l'emP3 (12h ou 24h et à une température de 4°C ou 22°C). Le groupe contrôle n'a pas subi de conservation dans l'emP3 et a été placé en maturation in vitro directement après récolte des ovocytes. ....	43
<b>Tableau 11:</b> Comparaisons du pourcentage d'ovocytes en métaphase II en fonction des conditions de conservation. Résultats de la régression logistique mixte, risque alpha ajusté avec la procédure séquentielle Benjamini-Hochberg .....	43

<b>Tableau 12:</b> Comparaison de l'expression du gène de l'enzyme StAR pour les différents groupes de cellules du cumulus en fonction des conditions de conservation (Tests de Holm-Sidak) .....	45
<b>Photographie 1:</b> Méthode de prélèvement des ovocytes par ponction des follicules sur un ovaire de vache provenant de l'abattoir .....	31
<b>Photographie 2:</b> Observation à la loupe binoculaire des 15 ovocytes de bovin d'un groupe après maturation in vitro .....	35
<b>Photographies 3A et 3B:</b> Séparation mécanique des ovocytes et des cellules du cumulus avec la pipette Pasteur modifiée par aspiration et reflux de milieu contenant l'ovocyte .....	36

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADAMTS1 : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motif 1

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPc: Adénoside Monophosphate Cyclique

AREG : Amphiréguline

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

BMP15 : Bone morphogenetic Protein 15

BRA : Biotechnologies de la Reproduction Animale

BSA : Bovine Serum Albumine

BTC : Bêta celluline

CC : Cellules du Cumulus

COC : Complexe Ovocyte Cumulus

COX2 : Cyclo-oxygénase 2

Ct : Cycle Treshold

DIV : Développement *In vitro* de l'embryon

DPI : diagnostic pré-implantatoire

EGF : Facteur de Croissance Epidermique

EREG: Epiréguline

FBS: Sérum Foetal Bovin

FERT-TALP: Fertilization Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate medium

FIV: Fécondation *in vitro*

FSH: Hormone Folliculo-Stimulante

GDF9: Growth and Differentiation Factor 9

GMPc : Guanosine Monophosphate Cyclique

GnRH : Hormone Gonadolibérine

GPR3 : Récepteur aux Protéines G 3

GREM1: Gremlin 1

HAS2: Hyaluronic Acid Synthase 2

hCG : Hormone Chorionique Gonadotrope Humaine

IA : Insémination Artificielle

IETS: International Embryo Technology Society

INHbA: Inhibine Bêta A  
LH : Hormone Lutéinisante  
LHR : Récepteurs à LH  
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase  
MI : métaphase I de la division de méiose  
MII : métaphase II de la division de méiose  
MIV: Maturation *In Vitro*  
MPF: M-phase Promoting Factor  
OMI: Oocyte meiosis inhibitor  
OPU: Ovum Pic Up, récolte d'ovocytes  
PBS: Phosphate Buffered Saline/ Tampon Phosphate Salin  
PDE3A: Phosphodiesterase 3  
PIV: Production *in vitro* d'embryons  
PKA : protéine kinase A  
PR : Récepteur à la progestérone  
PTX3 : Pentraxine 3  
qTR PCR : quantitative Transcription Inverse Réaction en chaîne par polymérase  
S.E.M : Erreur Standard de la moyenne  
SPMO : Stimulation Physiologique de la Maturation Ovocytaire  
StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein  
VG: Vésicule Germinale

## INTRODUCTION

La fécondation *in vitro* (FIV) est une technique de reproduction assistée utilisée dans l'espèce bovine afin d'augmenter le potentiel de reproduction des femelles. Des ovocytes immatures sont récoltés par ponction transvaginale des ovaires. Les ovocytes sont ensuite maturés et fécondés *in vitro* et le développement embryonnaire est obtenu, sur culture cellulaire, jusqu'au stade blastocyste. Cette technique de production d'embryons *in vitro* permet de s'affranchir de la gestion de la reproduction et peut être réalisée quel que soit le stade du cycle et même en début de gestation. Des études ont montré que pour prévenir le vieillissement de l'ovocyte à l'origine d'une diminution du taux de maturation, il est essentiel de débiter la culture *in vitro* 5h après le stade ovocytaire de métaphase II (Fissore et al., 2002). Ainsi la durée de transport des ovocytes et l'éloignement entre la vache donneuse d'ovocytes et le laboratoire nécessitent de ralentir la progression de la méiose. Des inhibiteurs de la méiose ont été testés et abandonnés en raison de la difficulté d'approvisionnement de ces substances et de leur toxicité (Pascottini et al., 2017). Plusieurs études ont évalué l'effet de la température de transport sur la maturation ovocytaire, mais les conclusions sont contradictoires, la température idéale pour ralentir la maturation ovocytaire varie de 4°C à 20°C pour une durée moyenne de conservation de 10 heures (Lucci et al., 2004; Wang et al., 2011). Une étude récente a montré que la conservation d'ovocytes bovins immatures dans le milieu commercial Syngro EHM Bioniche, INC., n'affecte pas le taux de maturation des ovocytes s'ils sont conservés pendant 10h à température ambiante (Dini et al., 2016).

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'effet de la conservation des complexes ovocytes-cumulus oophorus (COC) dans un milieu commercial l'emP3 à 4°C ou 22°C, pendant 12h ou 24h sur la maturation ovocytaire.

Notre thèse présente d'abord une synthèse bibliographique sur l'ovogenèse et la folliculogenèse chez la vache, ainsi que le développement des biotechnologies de la reproduction chez cette espèce. Dans une deuxième partie expérimentale, nous avons évalué l'effet de la conservation des ovocytes immatures de bovin pendant 12h ou 24h à 22°C ou 4°C dans un nouveau milieu commercial : l'emP3. L'objectif de cette étude était de faciliter l'envoi des ovocytes après leur récolte à la ferme et d'améliorer ainsi l'organisation des procédures au laboratoire, tout en maintenant une qualité des ovocytes acceptable. Ce projet a été réalisé dans le Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité (CRRF) dirigé par le Professeur Mouhamadou Diaw, à la Faculté de médecine Vétérinaire de Montréal au Québec.

# **Partie 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA GAMETOGENESE CHEZ LA VACHE**

## **I. Le cycle œstral de la vache**

L'activité sexuelle de la vache démarre à la puberté soit entre 6-12 mois d'âge, c'est à dire quand la vache a atteint 40-50% de son poids adulte.

La vache est une espèce polyœstrienne de type continu, dont le cycle œstral dure en moyenne 21 jours (18 à 24 jours). On peut diviser le cycle œstral en 4 phases : le pro-œstrus, l'œstrus, le metoestrus et le dioestrus.

Les ovaires sont le lieu de la croissance, la maturation et la libération des gamètes femelles et ont pour rôle de sécréter les stéroïdes sexuels. La maturation de l'ovocyte est en lien étroit avec la folliculogénèse et le cycle ovarien.

## **II. L'ovogénèse (Monniaux et al., 2009)**

L'ovogénèse est un processus qui débute dès la vie embryonnaire et aboutit à la formation d'un ovocyte apte à être fécondé. Pendant la vie fœtale, les cellules germinales appelées ovogonies se multiplient par mitose dans les crêtes génitales. À la naissance l'ovaire contient un réservoir d'environ 133000 ovocytes bloqués au stade diplotène de la prophase de la première division de méiose et entourés d'une couche de cellules de granulosa, correspondant au follicule primordial. À la puberté, la femelle présente une activité ovarienne cyclique et des vagues de croissances folliculaires démarrent sous contrôle hormonal. À chaque cycle un seul ovocyte achèvera la première division de méiose pour devenir un ovocyte II avec émission du premier globule polaire. Ainsi au moment de l'ovulation, l'ovocyte est au stade métaphase de la deuxième division de méiose et la maturation finale de l'ovocyte aura lieu pendant la fécondation avec l'émission du second globule polaire.

### 1) Croissance ovocytaire

La croissance de l'ovocyte correspond à des changements morphologiques tels que l'augmentation du volume et du diamètre, la formation de la zone pellucide et la formation des granules corticaux. La zone pellucide est une enveloppe de glycoprotéines (ZP1, ZP2, ZP3) qui assure la spécificité de l'interaction entre l'ovocyte et le spermatozoïde et qui joue un rôle dans le passage de grosses molécules sécrétées par les cellules du cumulus. La croissance de l'ovocyte est aussi une période de forte transcription avec production d'ARN qui sont

indispensables à l'achèvement de la méiose et au développement du futur embryon après fécondation (Nothias et al., 1995). En effet, l'accumulation de transcrits et de protéines dans le cytoplasme de l'ovocyte est essentielle pour les premières divisions embryonnaires avant l'activation du génome embryonnaire à la fin du 4<sup>ème</sup> cycle cellulaire. Puis lorsque l'ovocyte a atteint sa taille maximale, la chromatine va se condenser et le noyau devient transcriptionnellement inactif.

## 2) Maturation ovocytaire

La maturation ovocytaire comprend des modifications morphologiques et moléculaires cytoplasmiques et la reprise de la méiose du stade vésicule germinative jusqu'au stade métaphase de la seconde division méiotique. En effet, avant l'ovulation, l'ovocyte est bloqué au stade diplotène de la prophase de la première division de méiose. Ce blocage est possible grâce au couplage avec les cellules de la granulosa via les jonctions communicantes, permettant le passage de l'AMPc (Adénoside Monophosphate Cyclique) produit par les cellules folliculaires à l'ovocyte. L'AMPc stimule l'activité de la protéine kinase A (PKA) qui inhibe l'action de MPF (M-phase Promoting Factor) et de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) qui sont deux acteurs majeurs de la reprise de la méiose.

## 3) Reprise de la méiose

L'expulsion de l'ovocyte est suivie d'une reprise de la méiose qui permet à l'ovocyte de passer du stade de vésicule germinale (VG) au stade métaphase II avec expulsion du premier globule polaire. Elle est initiée par l'activation du complexe M-phase promoting factor (MPF) via sa phosphorylation est permise par l'AMPc. Les cellules du cumulus sécrètent l'AMPc et le GMPc qui permet de garder l'AMPc sous forme active.

La reprise de la méiose a lieu après le pic de LH (hormone lutéinisante), qui va stimuler la production d'EGF par les cellules de la granulosa. La cassure des connexions entre les cellules du cumulus et l'ovocyte lève l'inhibition exercée par l'AMPc et permet donc la reprise de la méiose.

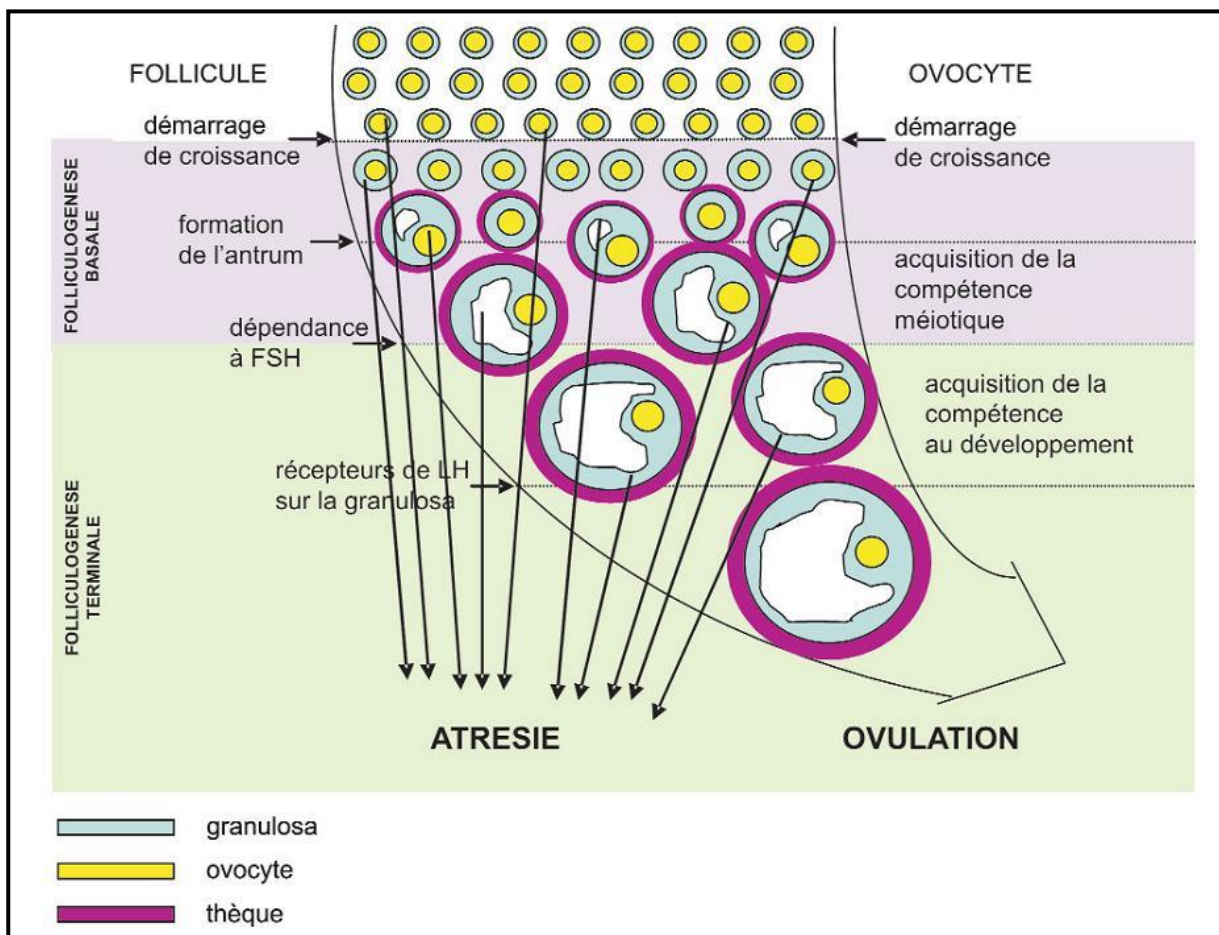
### **III. La folliculogénèse**

La folliculogénèse commence elle aussi pendant la vie embryonnaire, elle correspond au développement du follicule dans l'ovaire (de J18 à J20 du cycle) jusqu'à la libération de l'ovocyte lors de l'ovulation (Monniaux et al., 1997). Le follicule en développement passe par des stades de follicule primordial, primaire, secondaire et follicule tertiaire ou à antrum



(Tableau 1). Sur le plan endocrinien, la folliculogénèse est contrôlée par des facteurs endocrines (les gonadotrophines FSH et LH, notamment) et paracrines (Zamberlam, 2013)

L'entrée en croissance de follicules est un phénomène continu puisque chaque jour, des follicules entrent en croissance et qui débute dès la formation des follicules bien avant la puberté. Le nombre de follicules quittant la réserve chaque jour est de 50-80 chez les bovins (figure 1). La plupart des follicules qui entrent en croissance atteignent le stade antral à partir duquel ils deviennent atrétiques avant la puberté. . Après la puberté, un petit nombre de follicules antraux échappe à l'atrésie grâce à l'action des gonadotropines et poursuivent leur croissance (recrutement cyclique) et normalement, un seul follicule préovulatoire est formé tous les 21 jours chez la vache.

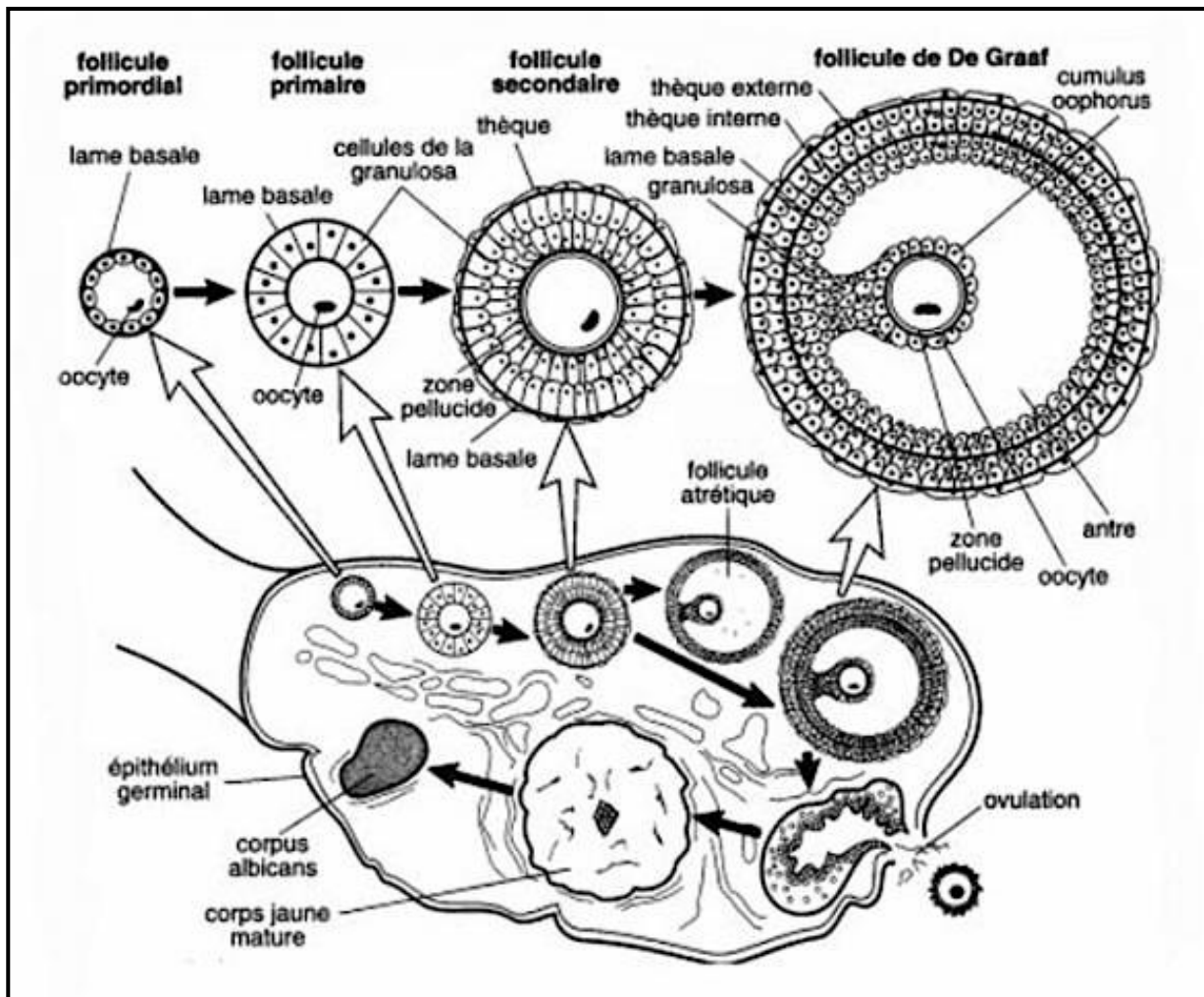


**Figure 1:** Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire

Source : Monniaux et al., 2009

Pendant la vie fœtale soit autour de 90 jours chez la vache. Chaque follicule primordial comprend une assise de cellules folliculaires, ébauche de la granulosa et contient un ovocyte primaire bloqué en prophase I au stade diplotène. Les cellules folliculaires établissent des jonctions perméables entre elles et avec l'ovocyte constituant un tissu avasculaire entouré de la lame basale. L'ensemble constitue le follicule primordial (diamètre de 0.03 à 0.05mm chez

toutes les espèces). Les cellules de la granulosa restent attachées à l'ovocyte tout au long de son développement et lui apportent des nutriments pour permettre la maturation folliculaire.



**Figure 2:** Représentation des différents stades de croissance des follicules

Source : (Guénard et al., 1996)

Le follicule primaire est un follicule primordial qui a commencé sa croissance, cette activation a lieu autour de 140 jours de vie fœtale chez le bovin (Fortune et al., 2000). La croissance est indépendante de l'action des gonadotrophines mais sous le contrôle de facteurs sécrétés par l'ovocyte (Fortune et al., 2011). L'ovocyte augmente son volume, la zone pellucide apparaît et les cellules de la granulosa prennent un aspect cuboïde et se multiplient.

Le follicule est dit secondaire lorsqu'une deuxième couche de cellule de la granulosa entourant l'ovocyte apparaît. Le diamètre de l'ovocyte augmente et une cavité liquidienne apparaît en son sein. Le follicule secondaire est décrit comme étant un follicule avec deux à six couches de

cellules de la granulosa, avec une thèque interne formée et délimitée, et l'apparition de la corona radiata, les cellules folliculeuses qui entourent l'ovocyte. Les follicules secondaires sont sensibles aux gonadotrophines, et les cellules de la granulosa vont répondre à la FSH et celles de la thèque interne à la LH. De plus les cellules de la thèque vont acquérir les enzymes nécessaires à la production d'androgènes (McNatty et al., 2007)

Enfin, le follicule prend le nom de follicule tertiaire ou antral avec l'apparition de l'antrum, dans lequel s'accumule les sécrétions des cellules folliculaires. A ce stade, l'antrum se dilate par accumulation d'un liquide résultant des sécrétions de la granulosa, des deux théques et d'une exsudation plasmatique. L'ovocyte est refoulé à un pôle de l'antrum, entouré de sa zone pellucide et de quelques assises de cellules folliculeuses. L'ensemble, qui fait saillie dans l'antrum, prend le nom de cumulus oophorus. Le follicule ovarien présente dès la formation de l'antrum un aspect caractéristique : la thèque externe, la thèque interne séparée de la granulosa par la lame basale, l'ovocyte et son noyau ou vésicule germinative au sein d'un massif de cellules de la granulosa appelé cumulus oophorus (figure 2). La cavité intrafolliculaire contient un liquide dont la composition est proche de celle du plasma sanguin (Monniaux et al., 2009)

**Tableau 1:** Caractéristiques morphologiques du follicule bovin selon le stade de développement

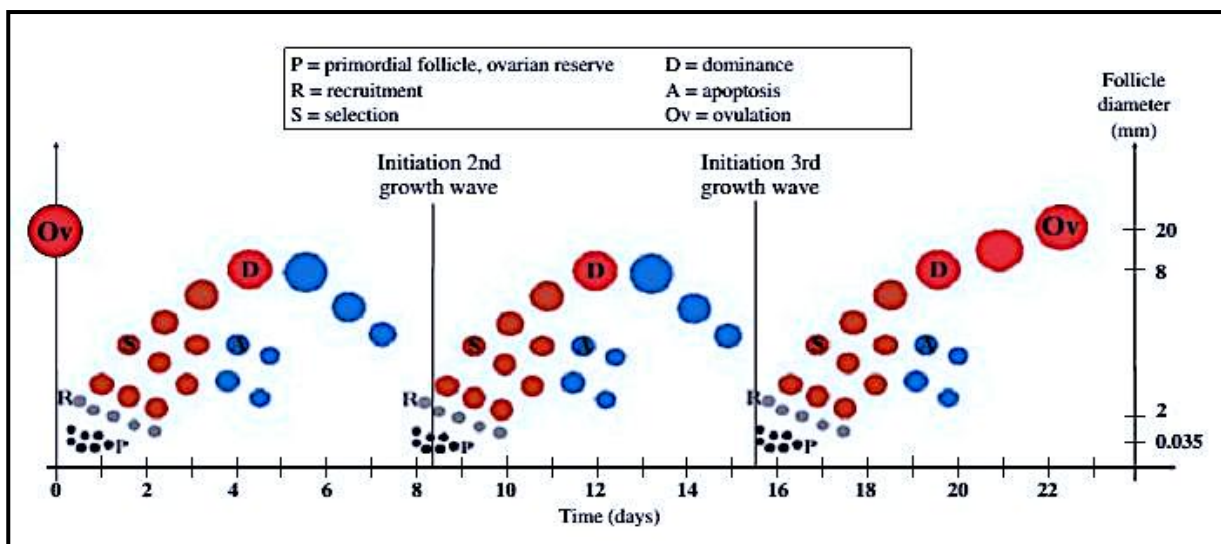
Source : (Drion et al., 1996)

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

La durée totale de la croissance folliculaire est d'environ 180 jours chez la vache. Elle se divise en deux phases successives : la folliculogénèse basale et la folliculogénèse terminale.

La folliculogénèse basale est peu dépendante des variations cycliques des sécrétions des hormones gonadotropes, mais elle est sous le contrôle de facteurs de croissance et de facteurs paracrines et autocrines provenant de l'ovocyte et des cellules somatiques. Des facteurs endocriniens interviennent également, comme l'AMH, sécrétée par les cellules de granulosa des follicules en croissance et qui jouerait un rôle déterminant de «gardien» de la réserve ovarienne.

La folliculogénèse terminale dépend de FSH, qui en est le chef d'orchestre. Elle se déroule sous forme de vagues folliculaire. Une vague folliculaire correspond à la croissance synchrone d'une cohorte de follicules ou recrutement, suivie de la sélection d'un ou plusieurs follicules appelés dominants, et de leur évolution vers l'ovulation (Sirois & Fortune, 1988) (Figure 3). Chez la vache, deux à quatre vagues de croissance sont observées au cours du cycle, la première débute le jour après l'ovulation, la deuxième environ 9 jours plus tard et la troisième 15 jours après l'ovulation (Adams et al., 2008).



**Figure 3:** Les vagues folliculaires durant le cycle oestral de la vache, recrutement, sélection et dominance

Source : (Aerts & Bols, 2010b)

Le recrutement est le développement de manière synchrone d'une cohorte de petits follicules de 5 mm de diamètre, dépendant des gonadotrophines. Outre les gonadotrophines, les principaux régulateurs de la croissance folliculaire terminale sont l'IGF1 et l'insuline, qui sensibilisent les follicules à FSH (McGee & Hsueh, 2000). La croissance des follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production folliculaire d'oestradiol et d'inhibine. L'expression de la rétroaction positive de l'oestradiol se traduit par une augmentation de la fréquence des pulses de LH qui stimule la synthèse d'androgènes par les cellules de la thèque. L'augmentation

résultante des sécrétions d'oestrogènes et la production accrue d'inhibine induit une augmentation de la rétroaction négative de l'oestradiol et de l'inhibine sur la sécrétion de FSH et donc une réduction des taux plasmatiques de l'hormone.

Ainsi, lors de chaque vague folliculaire, le démarrage synchrone d'un groupe de follicules en développement terminal est suivi d'une diminution des concentrations circulantes de FSH, en réponse à la rétroaction négative de l'oestradiol et de l'inhibine sécrétés par ces follicules sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La sélection est le processus par lequel un follicule est choisi au sein de la cohorte de follicules pour poursuivre son développement alors que les autres deviendront atrétiques et régresseront. Chez la vache, cette sélection a lieu lorsque le plus gros follicule a atteint un diamètre d'environ 8 mm (Ginther et al., 1997). L'action synergique de FSH et d'IGF1 joue un rôle déterminant dans l'émergence du futur follicule préovulatoire. Les follicules non sélectionnés du fait de la diminution de production de FSH, vont régresser et s'atrésier. Le processus exact de sélection est à ce jour inconnu, il a été suggéré que le follicule sélectionné devient plus réceptif à la LH et peut donc continuer son développement malgré la diminution importante de FSH (Aerts & Bols, 2010a).

Le follicule dominant est défini dans l'espèce bovine comme celui ayant un diamètre supérieur de plus de 2 mm par rapport aux autres follicules de la cohorte et capable de produire des œstrogènes (Sirois & Fortune, 1990). La dominance du follicule préovulatoire est assurée par la LH, hormone à laquelle ce follicule est progressivement devenu hypersensible et qui prend le relais de la FSH. L'acquisition des récepteurs à LH par les cellules de la granulosa constitue le signe de maturité du follicule et de son aptitude à ovuler (Fortune et al., 2004). Cette dernière survient au stade de 9 mm chez la vache. D'autres facteurs interviennent (facteurs de croissance, stéroïdes, protéases) pour réguler la croissance terminale des follicules et permettre la sélection du follicule destiné à ovuler grâce à des mécanismes qui permettent d'ajuster le nombre de follicules préovulatoires au nombre d'ovulations qui est une caractéristique de l'espèce. Chez la vache, les caractéristiques du follicule dominant sont une forte concentration en œstradiol dans le liquide folliculaire, des niveaux élevés en ARNm codant pour le récepteur de la LH dans les cellules de la thèque et de la granulosa (Fortune et al., 2004) et une forte expression de l'ARNm codant pour la protéine régulatrice de la stéroïdogénèse (Steroidogenic acute regulatory protein : StAR) dans les cellules de la thèque permettant le transport du cholestérol dans les mitochondries pour la production d'androgènes (Bao & Garverick, 1998).

#### **IV. L'ovulation**

C'est le processus par lequel le follicule mature va se rompre pour relâcher l'ovocyte, et cela 29 à 31h après le pic de LH (Charles Thibault, Marie-Claire Levasseur, 2001) . La rupture du follicule et l'expulsion de l'ovocyte résultent de la séquence d'événements suivants :

- Augmentation du flux sanguin
- Augmentation de la pression intra-folliculaire juste avant l'ovulation (Matousek et al., 2001) Dissociation des faisceaux de fibres de collagène de la thèque externe sous l'action d'une collagénase et d'une plasmine. Cette activité est surtout importante au niveau de l'apex du follicule (Curry et al., 1992).
- Les cellules de la granulosa se détachent de la lame basale. Seules les cellules qui ont assuré la jonction entre la granulosa et l'ovocyte restent plus ou moins longtemps attachées à l'ovocyte et forment la corona radiata.
- Rupture de la lame basale
- Mort des cellules de l'épithélium ovarien au niveau de l'apex.

La désintégration de l'apex du follicule provoque sa rupture. La contraction du follicule en réponse à la chute de pression hydrostatique permet l'expulsion de l'ovocyte et des cellules de la corona radiata. La décharge ovulante de LH/FSH induit à la fois la rupture du follicule, l'ovulation et la maturation de l'ovocyte (reprise de la méiose)..

## **V. Interactions entre l'ovocyte et les cellules somatiques au cours de la folliculogénèse**

La communication entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent, et particulièrement les cellules du cumulus a un rôle très important dans l'acquisition par l'ovocyte de sa compétence à la méiose et au développement embryonnaire. La communication est dite bidirectionnelle puisque d'une part l'ovocyte contrôle la prolifération et la différenciation des cellules du cumulus et d'autre part les cellules du cumulus sont les cibles des hormones gonadotropes et leur différenciation va influencer la maturation de l'ovocyte.

Il existe deux voies qui permettent à l'ovocyte et aux cellules du cumulus (CC) de communiquer.

La voie juxtacrine est permise par le contact direct entre les CC et l'ovocyte : les jonctions communicantes. A travers ces jonctions, de petites molécules peuvent transiter comme les substrats énergétiques des CC vers l'ovocyte (Buccione et al., 1990). Lors de la croissance folliculaire, la zone pellucide est sécrétée en même temps que des extensions cytoplasmiques appelées les projections transzonales qui permettent le transfert de petits substrats.

La voie paracrine est la deuxième voie de communication entre les CC et l'ovocyte. Contrairement à la précédente, cette voie ne nécessite pas un contact direct entre les cellules. Ce sont les facteurs de croissance sécrétés qui sont les médiateurs de cette communication.

Les facteurs exprimés par l'ovocyte ont un impact sur la croissance folliculaire, la prolifération et la différenciation des cellules du cumulus et sur l'ovulation.

Le gène Kit code pour le récepteur des protéines Kit-ligand est exprimé dès lors que la méiose est bloquée. Les Kit-ligand sont exprimés par les cellules de la granulosa. L'interaction Kit-Kit-ligand permet d'initier la croissance folliculaire de follicules primordiaux, la prolifération des cellules de la granulosa et leur différenciation, et initie la formation de l'antrum (Driancourt et al., 2000).

Figa est un gène nécessaire à la formation du follicule primordial exprimé par l'ovocyte, il régule chez la souris la production des protéines de la zone pellucide et des molécules d'adhésion permettant la cohésion entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui sont autour.

Dès le stade de follicule primaire, l'ovocyte exprime et sécrète deux facteurs, GDF9 (Growth and Differentiation Factor 9) et BMP15 (Bone morphogenetic Protein 15). Ces facteurs stimulent la prolifération des cellules de granulosa et favorisent leur survie. Chez le bovin l'immunisation active contre BMP15 et GDF9 entraîne un développement folliculaire anormal et une infertilité (Juengel et al., 2009). Ces deux facteurs ont aussi un effet pendant la période ovulatoire et permettent la différenciation des cellules de la granulosa et des CC et protègent les CC de l'apoptose.

Le récepteur aux protéines G, GPR3 est exprimé par l'ovocyte et permet le maintien de l'arrêt de la méiose.

Les phosphodiésterases jouent un rôle dans le contrôle de la maturité nucléaire de l'ovocyte. L'ovocyte sécrète PDE3A qui régule la dégradation de l'AMPc (Nogueira et al., 2006).

Les cellules somatiques entourant l'ovocyte expriment des facteurs impliqués dans la croissance folliculaire, le métabolisme, la maturation ovocytaire et l'ovulation.

Les CC expriment le gène Scf qui code pour le ligand du récepteur Kit (vu précédemment). L'expression du gène Scf est régulé par la voie BMP15/GDF9. Et la production du kit-ligand stimule l'expression du récepteur qui réprime à son tour l'expression de BMP15 et GDF9. Cette boucle de régulation essentielle est permise par les jonctions communicantes entre ovocyte et CC (Hutt et al., 2006).

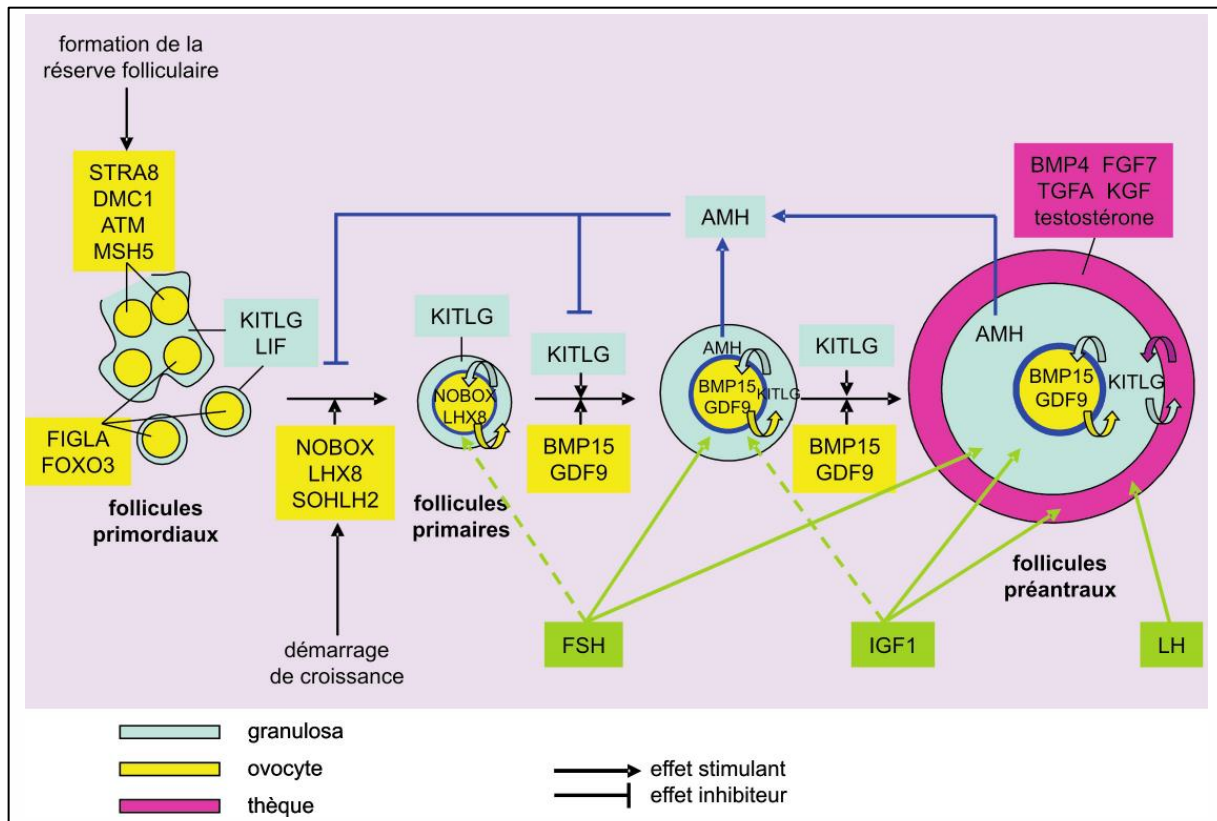
À la suite de l'activation des récepteurs à FSH (FSHR), les CC acquièrent des récepteurs à LH (LHR) et à la progestérone (PR). En période pré-ovulatoire, l'activation des LHR induit une augmentation du calcium intracellulaire dans les CC qui va se propager dans l'ovocyte via les jonctions communicantes. Ce mécanisme est essentiel pour la reprise de la méiose, le blocage de la polyspermie, et la capacité de décondenser le noyau mâle. De plus, la LH va induire l'expansion des CC, ainsi que la maturation et la rupture de la membrane nucléaire de l'ovocyte (via le calcium intracellulaire) (Canipari, 2000).

Des facteurs EGF-like interviennent dans la communication entre les cellules somatiques et l'ovocyte lors de l'ovulation. Ces facteurs sont EREG (Epiréguline), AREG (Amphiréguline) et BTC (Bêtacelluline). AREG et EREG sont exprimés dans les cellules de la granulosa et induisent une maturation méiotique de l'ovocyte identique à celle provoqué par la LH, et miment son action sur l'expression de certains gènes. EREG et AREG sont clivés par l'ADAMTS1 pour produire des facteurs de croissance qui se lient aux récepteurs des EGF et permettent l'expansion des CC (Park et al., 2004).

Les CC expriment aussi des gènes spécifiques tels que STaR (Steroidogenic Acute Regulatory), COX2 (Cyclooxygénase 2), HAS2 (Hyaluronic Acid Synthase 2), GREM1 (Gremlin 1) et PTX3. (Pentraxine 3).

StAR est une protéine impliquée dans la synthèse des hormones stéroïdes, elle facilite le transport du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie. L'expression de ce gène est régulée dans l'ovaire par le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1), c'est aussi une cible lors de l'activation des EGF-R. Son expression est importante lors de la croissance folliculaire surtout pour la synthèse de la progestérone (Stocco & Clark, 1996). La figure 4 résume la communication entre les CC et l'ovocyte.





**Figure 4:** Représentation schématique des interactions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus pendant la croissance folliculaire

Source : (Monniaux et al., 2009)

## **Partie 2 : LES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION CHEZ LES BOVINS**

Le développement des biotechnologies de la reproduction animale (BRA) s'est imposé pendant la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle. Les techniques ont évolué rapidement en raison de leurs intérêts sanitaire, génétique et économique, et leurs champs d'applications se sont élargis de la maîtrise des gamètes mâles à celle des embryons et des gamètes femelles. On peut diviser les techniques en plusieurs générations qui correspondent à leur chronologie d'apparition.

### **I. Présentation des différentes générations des BRA**

#### **1) L'insémination artificielle**

L'insémination artificielle est la plus ancienne des techniques de reproduction assistée, et de loin la plus répandue. Les premiers essais ont débuté dans les années 1935-1939, et elle est aujourd'hui la technique la plus développée en Europe et en Amérique du Nord. Elle consiste à récolter du sperme des mâles reproducteurs, généralement au vagin artificiel, à le préparer et le conserver pour le déposer dans les voies génitales de la femelle au moment de l'œstrus. Chez les bovins, la semence est très majoritairement utilisée après congélation dans l'azote liquide à -196°C. Depuis les années 1990, il est possible de sexer la semence par la technique de cytométrie de flux et donc de choisir le sexe de l'embryon avec une exactitude de 90% (Ponsart et al., 2014).

Pour pallier la difficulté de détection des chaleurs, l'insémination peut être associée à des méthodes de maîtrise des cycles, qui permettent de rationaliser la conduite de la reproduction. Les avantages de l'insémination sont le gain génétique généré par cette technique, la flexibilité de la technique (pas d'entretien d'un mâle), les garanties sanitaires à tous les stades de récolte ou de préparation de la semence et enfin un coût de la semence relativement peu élevé permettant l'accès aux meilleurs géniteurs.

**Tableau 2:** Nombre de femelles de différentes espèces domestiques inséminées en France pour la campagne 2019-2020

Source : Données IETS 2021 et IFCE 2021

Espèce	Bovin	Ovins	Caprins	Equins	Porcins
--------	-------	-------	---------	--------	---------

<b>Nombre de femelles inséminées</b>	6,69 millions	800 000	74 750	30 960	90% du cheptel
--------------------------------------	---------------	---------	--------	--------	----------------

### 2) La production d'embryons *in vivo*

Le transfert d'embryon a vu le jour en 1975, le principe est de prélever dans l'utérus de la femelle donneuse des embryons produits *in vivo*, d'évaluer leur qualité, et éventuellement de les conserver par congélation. Chaque embryon est ensuite transféré dans l'utérus d'une femelle receveuse dont le cycle a été préalablement synchronisé avec celui de la donneuse. Bien que le coût de cette technique soit 5 à 10 fois plus élevé que celui de l'insémination artificielle, elle a de nombreux avantages : elle permet de multiplier la génétique de la femelle donneuse, et la sécurité sanitaire est élevée (Ponsart et al., 2014). Cette biotechnologie est très majoritairement utilisée chez les bovins (Tableau 3).

**Tableau 3:** Nombre d'embryons produits *in vivo* et transférés en 2020 selon les continents et les espèces

Sources : Données IETS, 2021

Continent	Bovin	Équins	Ovins	Caprins
Afrique	2763	0	127	0
Europe	126 491	2 248	966	346
Amérique du Nord	196 704	851	9 204	10 757
Océanie	4 211	0	12 427	1 890
Amérique du Sud	31 559	22 120	7222	184
<b>Total</b>	<b>361 728</b>	<b>25 219</b>	<b>29 819</b>	<b>13 177</b>

### 3) La production d'embryons *in vitro*

La première fécondation *in vitro* publiée fut celle réalisée chez le lapin en 1954 par un Français, Charles Thibault (Thibault et al., 1954). Cette technique a connu un développement modéré chez les bovins au milieu des 1980, puis a été appliquée à d'autres espèces (chevaux, ovins, caprins).

La première étape, appelée OPU (Ovum Pic Up), consiste à récupérer des ovocytes chez une femelle donneuse par ponction folliculaire transvaginale et sous contrôle échographique. Les ovocytes ainsi récoltés sont maturés et fécondés par des spermatozoïdes préalablement

capacités *in vitro*. Les embryons produits sont mis en culture *in vitro* jusqu'au stade blastocyste, avant d'être remis en place dans l'utérus d'une femelle receveuse. Cette biotechnologie nécessite un équipement et un savoir-faire spécifique qui constituent un frein au développement de cette technique (Tableau 4). Les étapes de cette technique sont décrites ci-dessous.

**Tableau 4:** Nombre d'embryons produits *in vitro* et transférés en 2020

Source : données IETS, 2021

Contient	Bovins	Équins	Ovins	Caprins
Afrique	4 977	0	0	0
Europe	47 470	5 359	0	0
Amérique du Nord	578 995	1 126	141	2 275
Océanie	14 345	0	0	0
Amérique du Sud	500 397	2 156	0	0
Total	1 156 422	8 641	141	2 275

#### 4) Le clonage somatique, la transgénèse et la réécriture du génome

Cette génération de biotechnologies est surtout développée dans le cadre de la recherche. Le clonage somatique est utilisé ponctuellement pour des applications commerciales chez les bovins (à titre d'exemple, clonage de Starbucks) ou les équins, pour reproduire des individus présentant des caractères exceptionnels.

Le clonage somatique est fondé sur la programmation nucléaire d'une cellule obtenue après transfert d'un noyau de cellule somatique de l'individu à cloner dans un ovocyte mature énucléé.

La transgénèse consiste à intégrer dans le génome d'un embryon un gène étranger dans le but de faire produire des molécules d'intérêt pharmaceutique ou médical (par exemple l'albumine humaine). Le premier animal transgénique a été obtenu en 1982 chez la souris, puis vers la fin du XX<sup>e</sup> siècle. L'efficacité de cette technique était limitée en raison de la difficulté à intégrer le gène d'intérêt de manière ciblée au sein du génome. Le développement récent de la technique CRISPR-Cas9, qui permet d'intervenir de façon précise et spécifique sur un gène pour l'inactiver ou le remplacer permet d'accroître considérablement l'efficacité de la transgénèse et offre de grandes possibilités de réécriture du génome. Toutefois, ces techniques de clonage somatique, de transgénèse et de réécriture du génome, permettant de reproduire des individus

génétiqnement contrôlés, font l'objet d'une forte réticence sociétale, et ne sont pas utilisées en Europe sur les animaux de rente (Ponsart et al., 2014).

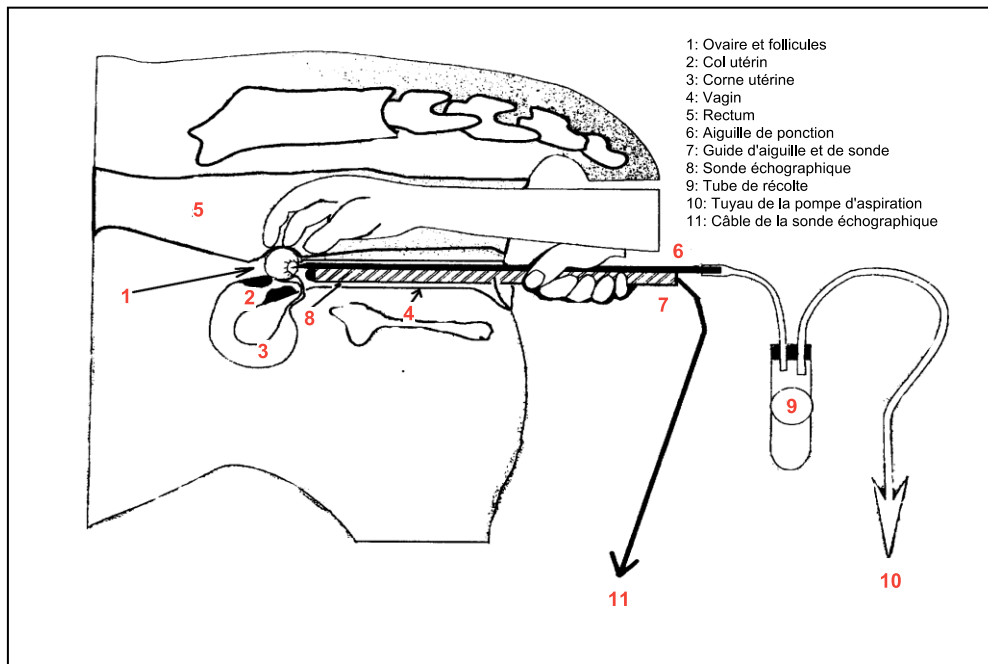
## **II. La production d'embryons *in vitro* chez la vache : l'OPU-FIV**

La production d'embryons *in vitro* chez la vache a connu des progrès techniques considérables ces dernières années, en partie parce que les éleveurs ont compris le potentiel d'amélioration génétique apporté par cette biotechnologie. La PIV vise à produire à partir des ovocytes d'une vache de haute valeur génétique des embryons. Elle comprend quatre étapes :

- La récolte d'ovocytes par OPU (Ovum Pic Up) qui est la ponction folliculaire échoguidée
- La maturation *in vitro* des ovocytes (MIV)
- La fécondation *in vitro* (FIV)
- Le développement *in vitro* de l'embryon (DIV)

### 1) La récolte d'ovocytes par OPU

La technique d'OPU dérive directement de la méthode de prélèvement d'ovocytes utilisée dans l'espèce humaine (Pieterse et al., 1988). La récolte consiste à ponctionner les follicules à l'aide d'une aiguille positionnée dans une gaine fixée à la sonde échographique et introduite dans le vagin. Avant la récolte, une anesthésie épidurale est réalisée pour limiter les contractions péristaltiques. La sonde échographique est introduite dans le vagin et permet de visualiser les follicules ovariens qui seront ensuite ponctionnés un à un. L'ovaire est maintenu par voie transrectale puis positionné en regard de l'aiguille de ponction (Figure 5). L'aspiration du liquide folliculaire permet de récupérer les complexes cellules du cumulus-ovocytes (COC), qui sont recueillis dans un milieu spécifique contenant du PBS (Tampon Phosphate contenant du chlorure de sodium) et de l'héparine.



**Figure 5:** Technique de prélèvement d'ovocyte par OPU chez la vache

Source : (Hanzén, 2009)

Les ovocytes peuvent être collectés deux fois par semaine, pendant plusieurs semaines sans effet secondaire sur les donneuses (Galli et al., 2001). Une récolte permet d'obtenir en moyenne 4 à 5 ovocytes utilisables (De Roover et al., 2005). Les follicules ponctionnés sont ceux mesurant 2 à 8 mm de diamètre, ils contiennent des ovocytes immatures (première division de méiose). Pour les génisses impubères, la récolte se fait comme chez les petits ruminants, par laparoscopie.

Il est possible de stimuler, quelques jours avant la récolte, la croissance folliculaire avec de la FSH, qui permet d'augmenter le nombre d'ovocytes prélevés par récolte. Par exemple chez les femelles de race Holstein et Montbéliarde ayant reçu un traitement de superovulation, 13,3 ovocytes utilisables sont collectés en moyenne par session d'OPU, conduisant au développement de 3,5 embryons transférables contre 7,8 ovocytes utilisables et 1,1 embryons transférables par OPU sans stimulation (Guyader-Joly et al., 2010).

## 2) La maturation *in vitro* (MIV)

L'ovocyte bloqué au stade vésicule germinale nécessite une étape de maturation pour acquérir la capacité à être fécondé.

La maturation s'effectue à plusieurs niveaux (Charles Thibault, Marie-Claire Levasseur et al., 2001):

- La maturation nucléaire conduisant au stade métaphase II de la méiose et caractérisée par l'émission du premier globule polaire
- La maturation membranaire qui permet à la zone pellucide de reconnaître spécifiquement les spermatozoïdes de la même espèce, grâce à des glycoprotéines spécifiques, la ZP3 pour la reconnaissance et la ZP2 pour la fixation spermatique.
- La maturation cytoplasmique : qui comprend la migration des granules corticaux vers la périphérie, la synthèse de l'ovoperoxydase qui permet d'éviter la polyspermie, et les synthèses protéiques nécessaires au bon déroulement du développement de l'embryon.

La maturation nucléaire est relativement bien maîtrisée, le taux d'ovocytes en MII après la MIV dans des conditions optimales est d'environ 85 à 90% chez la vache (Lonergan et al., 2003). En revanche, la maturation cytoplasmique *in vitro* représente le facteur limitant de la production d'embryons *in vitro*. Le taux de blastocystes est plus élevé lorsque l'ovocyte est mûré *in vivo* comparativement à la maturation *in vitro* (Krisner, 2004). C'est la raison pour laquelle le concept de « pré-maturation » *in vitro* constitue actuellement un axe de recherche majeur pour mieux comprendre la maturation cytoplasmique ovocytaire et ainsi pouvoir améliorer les rendements de la production d'embryons. L'objectif est de maintenir les ovocytes collectés au stade vésicule germinale pour leur permettre de terminer la maturation cytoplasmique, c'est-à-dire la synthèse d'ARNm nécessaires au développement embryonnaire. En effet, dès lors que la maturation nucléaire est initiée, avec un ovocyte en MII, l'ADN est condensé et les transcriptions sont bloquées. Le principe de pré-maturation est de bloquer la reprise de la méiose avec des inhibiteurs du facteur de promotion de la phase M (MPF). Cependant, ce blocage de la méiose pendant 24 à 48h n'a pas permis d'augmenter la compétence ovocytaire au développement embryonnaire (Mermillod et al., 2000). Plus récemment, une méthode de stimulation physiologique de la maturation ovocytaire (SPMO) a été testée. Elle consiste à bloquer la méiose pendant 12h par des molécules qui augmentent le taux d'AMPc ovocytaire et la stimulation de la maturation par la FSH. A ce jour, 22 études ont évalué l'efficacité de cette technique, mais les résultats en termes de taux de blastocystes sont discordants et peuvent être expliqués par des différences de composition du milieu de maturation (Leal et al., 2022).

En pratique, la MIV est réalisée à 38,5°C qui correspond à la température centrale chez la vache, sous une atmosphère enrichie de 5% de CO<sub>2</sub> saturée en humidité, et pour une durée de 24h. La MIV se fait dans un milieu qui contient tous les éléments nécessaires au développement

des COC (sels minéraux, acides aminés, glutamine, pyruvate, etc) (Mermillod et al., 1992). A ce milieu de base sont ajoutés différents constituants, avec une composition particulière pour chaque laboratoire. Le sérum de veau fœtal peut être ajouté car il empêche l'adhésion des COC. D'autres facteurs sont classiquement utilisés comme l'EGF (facteur de croissance épidermique) qui améliore la maturation nucléaire et cytoplasmique (Lonergan et al., 1996), mais aussi des hormones gonadotropes comme la FSH qui permet une meilleure expansion des cellules du cumulus (Calder et al., 2003) ou de la LH qui a une action directe sur le métabolisme de l'ovocyte. La GH (Growth Hormone) est également utilisée car elle accélère la maturation nucléaire, stimule l'expansion du cumulus et améliore le taux de développement de blastocyste (Izadyar et al., 1998).

Après la MIV, les COC sont classés en 4 catégories selon le degré d'expansion des cellules du cumulus et la transparence du cytoplasme de l'ovocyte. Un cumulus compact entourant complètement l'ovocyte et l'aspect transparent du gamète femelle sont des caractéristiques associées à une meilleure capacité de développement embryonnaire (de Loos et al., 1989).

### 3) La fécondation *in vitro*

La fécondation est l'étape qui permet d'aboutir à la formation d'une cellule, le zygote. Avant d'être mis au contact des ovocytes, les spermatozoïdes sont sélectionnés sur des critères précis (vitesse, motilité, morphologie, index de linéarité, concentration) (Ward et al., 2002). Les spermatozoïdes sont ensuite capotés dans un milieu appelé TALP pour Tyrode, albumine, lactate de sodium et pyruvate de sodium, complété avec de l'héparine (Parrish et al., 1986). Les conditions utilisées pour la FIV sont les mêmes que pour la MIV c'est-à-dire à 38,5°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> pour une durée de 18 à 24h. Le taux de fécondation est mesuré par l'expulsion du 1<sup>er</sup> globule polaire ou par le taux de clivage 48h post-insémination. Chez la vache le taux de fécondation moyen atteint 70-85%.

Les semences utilisées peuvent être des semences sexées ce qui permet de produire des embryons du sexe souhaité. Cependant l'utilisation de la semence sexée lors de la PIV réduit le taux de blastocystes (Liu et al., 2015).

### 4) Le développement embryonnaire *in vitro* (DIV)

Le développement pré-implantatoire de l'embryon se fait en étroite relation avec le milieu tubaire. Historiquement, le développement de l'ovocyte fécondé était réalisé *in vivo* dans les oviductes de lapines (Lazzari et al., 2010), car on ne savait pas reproduire le milieu tubaire. *In vitro*, l'étape limitante du développement embryonnaire chez la vache est le blocage au stade



8-16 cellules. Ce blocage est expliqué par la mauvaise synchronisation entre la chute des ARNm d'origine maternelle (contenus dans le cytoplasme de l'ovocyte) et l'activation de la transcription d'ARNm à partir du génome de l'embryon (Martal, 2002). Afin d'éviter ce blocage, différentes conditions ont été développées pour optimiser le développement embryonnaire, comprenant :

- Des milieux définis contenant des sécrétions de cellules tubaires (SOF : Synthetic oviductal fluid) ou des milieux dont la composition est modifiée en fonction du stade de développement de l'embryon.

- La co-culture sur des cellules trophoblastiques tubaires, ou sur des cellules somatiques (foie et rein) (Orsi & Reischl, 2007).

Le DIV dure 7 jours jusqu'au stade blastocyste. Le taux de blastocystes obtenus par OPU-FIV se situe entre 20-40% (Rizos et al., 2008). Ce taux limité s'explique par la maturation cytoplasmique incomplète des ovocytes, des conditions de cultures des embryons inadéquates entraînant une altération de l'activation du génome embryonnaire au stade 8-16 cellules (Sirard et al., 2006).

Après avoir atteint le stade de blastocyste, la qualité de l'embryon est évaluée sur des critères morphologiques définis par la Société Internationale de Transfert Embryonnaire (IETS) (symétrie de la masse embryonnaire, couleur et densité, zone pellucide lisse), selon 4 grades, bon, moyen, mauvais, et mort ou dégénéré. A l'instar de la production d'embryons *in vivo*, l'embryon est soit congelé, soit transféré en frais.

##### 5) Intérêts de la technique de production d'embryons *in vitro* chez la vache

Dans l'espèce humaine, Louise Brown est le premier bébé conçu par PIV, elle est née le 25 juillet 1978 au Royaume-Uni. Le premier veau né après MIV et FIV a été obtenu en 1981 (Brackett et al., 1982).

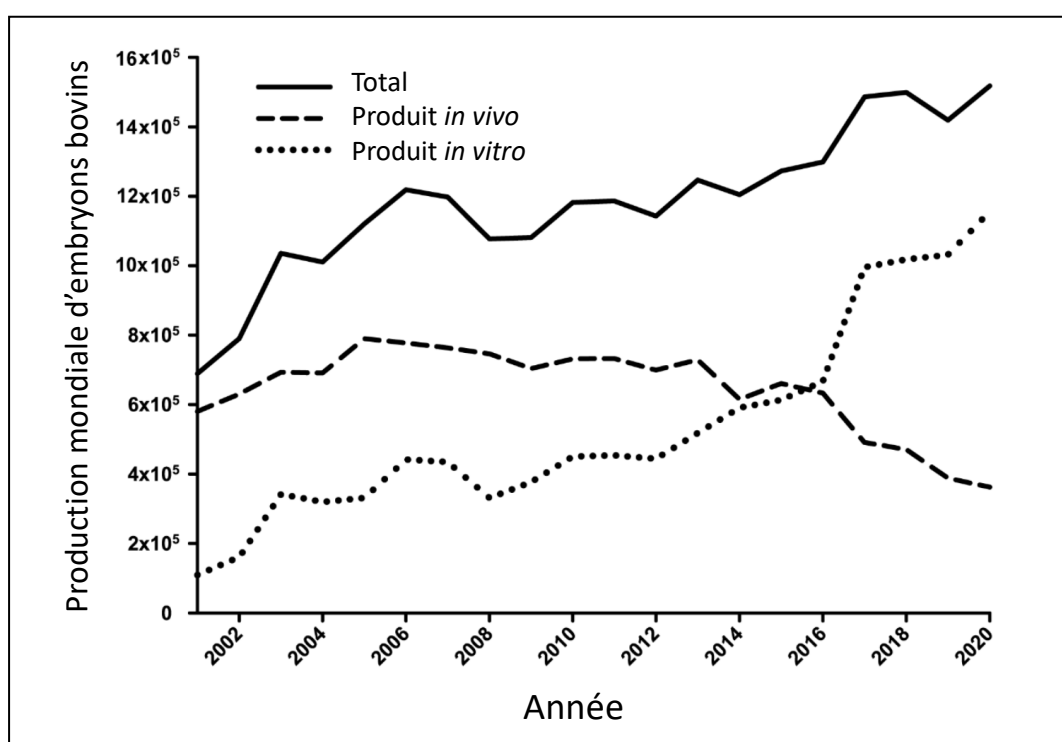
Chez l'Homme la technique de production d'embryon *in vitro* est utilisée par les couples infertiles comme aide à la procréation. Chez la vache, l'objectif principal est de multiplier le nombre de descendants de femelles de haute valeur génétique.

En effet, le prélèvement d'ovocytes par OPU permet la diffusion du potentiel génétique par la voie femelle. Par ailleurs, l'OPU peut être réalisée chez les femelles avant la puberté et même pendant la gestation (jusqu'à 3 mois) si les ovaires restent accessibles. De plus la cryoconservation des ovocytes ou des embryons produits *in vitro* permet de conserver la génétique de la femelle même après sa mort.

Cette biotechnologie combinée avec l'utilisation de la semence sexuée et avec des techniques de sélection génétique assistée par marqueurs réalisées à partir d'une biopsie de quelques cellules trophoblastiques, permet de sélectionner les embryons d'intérêt génétique et de décider ou non leur transfert dans une receveuse (Ponsart et al., 2014).

#### 6) Bilan sur l'utilisation de la PIV en 2020 (Rapport IETS 2021)

En 2020, plus d'1 million d'embryons bovins ont été produits *in vitro* dans le monde soit une augmentation de plus de 12% par rapport à l'année 2019. Depuis 20 ans, la production d'embryons de bovin est en augmentation (Figure 6).



**Figure 6:** Nombre d'embryons bovins produits *in vivo* ou produits *in vitro* et nombre total enregistrés sur la période 2001-2020

Source : données IETS 2021

L'utilisation de la production *in vitro* d'embryons n'est pas uniforme selon les pays. C'est en Amérique du Nord et du Sud que ce mode de reproduction est le plus développé, puisque les États-Unis, le Brésil, le Canada et l'Argentine représentent à eux seuls 79,2% des embryons bovins produits *in vitro* en 2020 (Tableau 5). En effet la PIV est devenue une méthode de choix pour les pays producteurs de viande (Argentine, Brésil, États-Unis, Canada) car elle permet d'obtenir plus rapidement et en plus grand nombre des descendants génétiquement supérieurs.

À l'inverse, l'Europe est la seule région où la production d'embryons *in vivo* reste la méthode la plus répandue pour plusieurs raisons : (1) ces biotechnologies sont surtout utilisées dans les élevages laitiers, (2) l'élevage est moins intensif en Europe et (3) l'activité de transfert d'embryons est moins structurée et réalisée par différentes unités de sélection (Rapport IETS 2020). Dans l'enquête de l'IETS sur l'activité en 2020, l'Europe est représentée par la Belgique, l'Autriche, la Finlande, la France, l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne et la Suisse.

**Tableau 5:** Nombre d'embryons bovins produits et transférés en 2020

Source : Données IETS 2021

Région/ Pays	Embryons bovins produits		Embryons bovins produits et transférés	
	<i>In vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>in vitro</i>
Afrique	2 763	4 977	2 674	4 159
Europe	126 491	47 470	92 811	35 352
Amérique du Nord	196 704	578 995	168 726	339 716
Amérique du Sud	31 559	500 397	26 692	474 145
Océanie	4 211	14 345	3 767	14 571
<b>Total</b>	<b>361 728</b>	<b>1 156 422</b>	<b>294 670</b>	<b>878 181</b>

## **Partie 3 : ÉVALUATION DE LA CONSERVATION D'OVOCYTES BOVIN DANS L'EMP3**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet sur la maturation des COC de la conservation d'ovocytes de bovin dans un milieu l'emP3 pendant 12h ou 24h et à 4°C ou 22°C. L'emP3 est un milieu de conservation utilisé pour les embryons bovins. Il n'avait jamais été utilisé pour la conservation d'ovocytes. L'hypothèse était que la conservation des ovocytes dans ce milieu n'affecterait pas la maturation des COC *in vitro*.

### **I. MATERIEL ET METHODES**

L'étude a été réalisée à la Faculté Vétérinaire de Saint-Hyacinthe au Québec, dans l'équipe du Pr Mouamadou Diaw.

#### 1) Composition de l'emP3

L'emP3 est un milieu de conservation pour les embryons de bovins dont la composition exacte n'est pas rendue publique. Il contient 0,55% d'albumine de sérum bovin et 0,74% de chlorure de sodium (cf brochure Partner Animal Health en annexe).

#### 2) Récolte des ovocytes

##### *a. Origine et récupération des ovaires*

Les ovaires ont été collectés sur des vaches adultes dans un délai de moins de 4h après abattage, les 1,3 et 8 Août 2018 à 11h du matin dans un abattoir à 40 km de distance de la faculté vétérinaire. Puis ils ont été transportés dans une boîte isotherme permettant le maintien à une température ambiante autour de 22°C. L'âge, la race et le stade du cycle des vaches ne sont pas connus.

##### *b. Récupération des ovocytes*

Avant de commencer la récolte des ovocytes, les ovaires ont été rincés dans une solution saline (Chlorure de Sodium 0,9%). La récolte des ovocytes a été réalisée sous hotte à flux laminaire dans un environnement stérile.

Les follicules mesurant entre 2-8 mm de diamètre ont été ponctionnés avec une seringue de 10 mL et une aiguille de 18 gauge. La seringue est pré-remplie avec 1mL de milieu de Hank (Hank's Medium 199 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'aiguille est introduite dans les

follicules en restant en surface pour aspirer le liquide folliculaire contenant les COC (cumulus Oocyte Complex). Après la ponction de 3-4 follicules, le liquide contenu dans la seringue est déposé dans une boîte de Pétri. (Photographie 1).



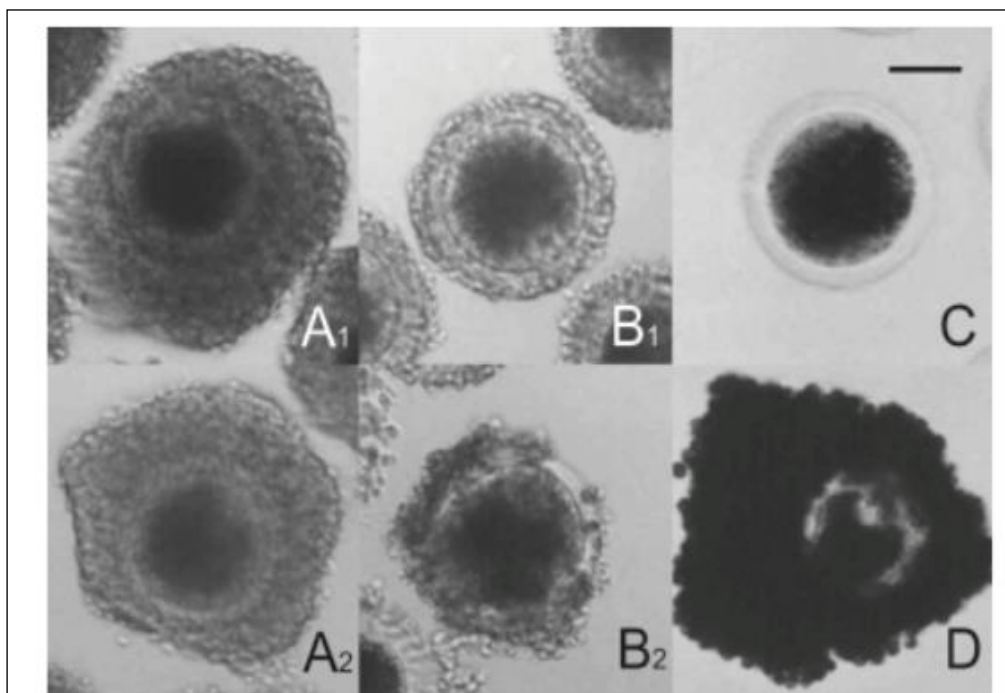
**Photographie 1:** Méthode de prélèvement des ovocytes par ponction des follicules sur un ovaire de vache provenant de l'abattoir

Source : Margaux Pellet

*c. Évaluation des complexes ovocytes- cellules du cumulus (COC)*

Tous les ovocytes prélevés ont ensuite été conservés à température ambiante dans une boîte de Pétri contenant le milieu de Hank (Hank's Medium 199 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complémentée avec 25 µg/mL de Gentamicine (Gibco), 6mg/mL de BSA (Sigma-Aldrich, Canada, Oakville ON) et 0,25mM de solution de Pyruvate de sodium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Les ovocytes ont été observés sous loupe binoculaire (LEICA DMIRB) (grossissement x10-25). Cette étape permet la sélection des ovocytes selon des critères morphologiques définis (Hinrichs et al., 2005; Hinrichs & Williams, 1997). Ainsi, seuls les COC (complexes ovocytes-cellules du cumulus) avec au moins 3 couches compactes de cellules du cumulus et avec un cytoplasme translucide ont été sélectionnés pour notre étude, ce qui correspond aux images A1, et A2 sur la figure 4 ci-dessous.



**Figure 7:** Classification morphologique des complexes ovocytes- cellules du cumulus

A1 : Ovocyte entouré de plusieurs couches denses de cellules du cumulus, A2 : Ovocyte entouré de plusieurs couches de cellules du cumulus translucides, B1 : Ovocyte entouré de la corona radiata, B2 : Ovocyte partiellement dénudé, C : ovocyte dénudé, D : ovocyte entouré par plusieurs couches très foncées de cellules du cumulus

Source : (Alvarez et al., 2009)

#### d. Conservation des ovocytes

Les ovocytes ont été regroupés par 15 selon les conditions de l'expérience, et disposés dans des tubes en verre borosilicaté stériles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) contenant 1 mL de solution d'emP3, fermés avec du papier paraffiné et emballés dans du papier absorbant opaque afin de protéger les ovocytes de la lumière.

Selon les groupes, les tubes ont été placés (Tableau 6) :

- à 4°C pendant 12h (Groupe 1) ou pendant 24h (Groupe 3)
- à 22°C pendant 12h (Groupe 2) ou 24h (Groupe 4).
- Le groupe 5 est le groupe contrôle qui n'a pas été placé dans l'emP3 mais directement mis en maturation *in vitro*.

Pour cette étude 3 lots d'ovocytes ont été prélevés soit un total de 225 ovocytes.

**Tableau 6:** Conditions expérimentales pour les différents groupes d'ovocytes d'un lot. Cette étude a été répétée 3 fois (3 lots différents)

N° de l'échantillon		1	2	3	4	5
UN LOT	Milieu de conservation	emp3	emp3	emp3	emp3	/
	Durée de conservation (en heure)	12h	12h	24h	24h	/
	Température de conservation (en °C)	4°C	22°C	4°C	22°C	/
	Durée de la maturation <i>in vitro</i> (en heure)	24h	24h	24h	24h	24h
	Nombre d'ovocytes dans l'échantillon	15	15	15	15	15

### 3) Maturation des ovocytes :

Le milieu de maturation utilisé pour cette expérience est le milieu M199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) additionné de 25 µg/mL de Gentamicine (Gibco), 6mg/mL d'Albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma-Aldrich, Canada, Oakville ON), 0,25 mM de solution de Pyruvate de sodium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), (Diaw et al.2018). La préparation est réalisée en conditions stériles sous hotte aspirante.

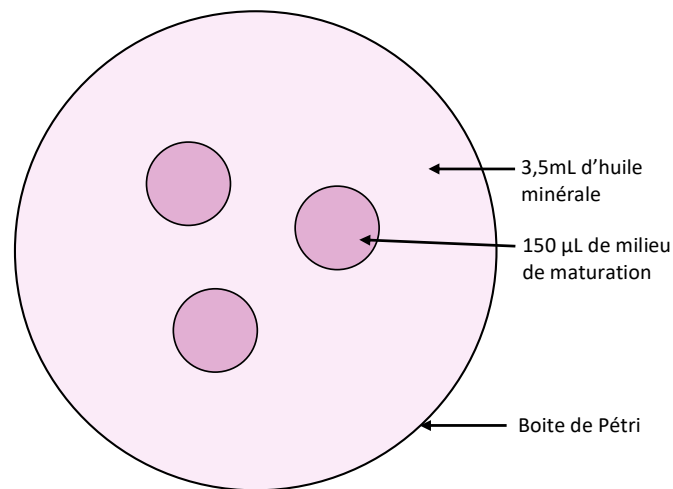
Ce milieu de maturation des ovocytes a ensuite été mis 15 minutes au bain-marie à 38°C, puis filtré avec un filtre à seringue de taille 0,22 µm (Acrodisc by Life Sciences), et 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF) (Epidermal Growth Factor, R&D systems, Minneapolis, MN) ont été ajoutés (Tableau 7).

**Tableau 7:** Composition du milieu de maturation des ovocytes

Composant	Quantité
M199 Earl's	10 mL
Gentamicine	25 µg/mL
BSA	6 mg/mL
Pyruvate de sodium	0,25 mM
EGF	10 ng/mL

Le milieu de maturation a ensuite été réparti dans des boîtes de Pétri ; 3 gouttes de 75 µL par boîte, qui ont été recouvertes par 3,5 mL d'huile minérale (Sigma-Aldrich, M5310-1L, Germany) puis 75 µL de milieu de maturation ont été ajoutés dans les gouttes précédemment

déposées. Chaque boîte contient donc au total 3 gouttes de 150  $\mu$ L du milieu de maturation et peut recevoir 15 ovocytes (soit 10  $\mu$ L de solution par ovocyte).



**Figure 8:** Représentation schématique de la maturation des ovocytes en boîte de Pétri

Pour chaque groupe, 15 ovocytes entourés des cellules du cumulus ont été récupérés et observés à la loupe binoculaire, et ont été photographiés pour comparer les caractéristiques des ovocytes et des cellules du cumulus avant et après la maturation *in vitro*. Les ovocytes ont été mis en maturation après la période de conservation pour les groupes 1,2,3 et 4. Pour les groupes 1 et 3 ayant été conservés à 4°C, les ovocytes ont d'abord été mis 10 minutes à température ambiante pour les réchauffer progressivement.

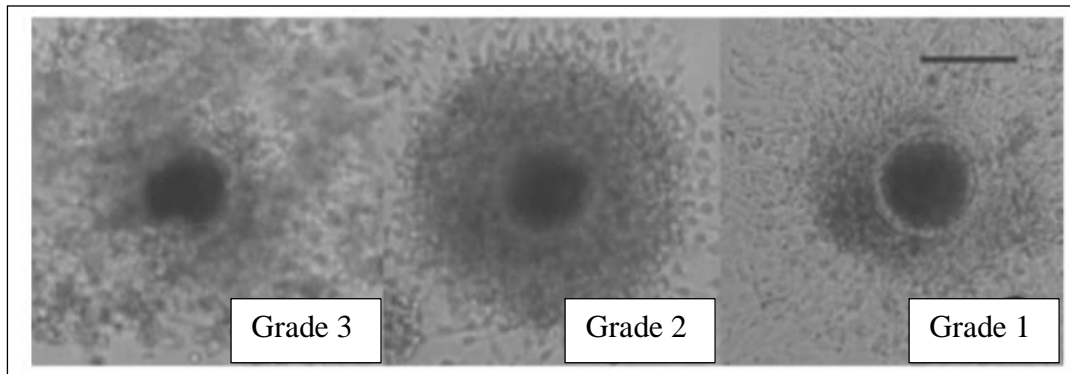
Les ovocytes ont ensuite été rincés deux fois pendant 30 secondes dans les deux premières gouttes du milieu de maturation et ont été transférés dans la troisième goutte. Les boîtes de Pétri contenant 15 ovocytes ont ensuite été incubées à 37,5°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24h.

#### 4) Évaluation de la maturation *in vitro*

Après 24h de maturation, les ovocytes ont été observés à la loupe binoculaire afin d'évaluer l'expansion du cumulus. Les ovocytes ont été classés selon 4 catégories :

- Dénudé : ovocyte totalement dénudé (aucune cellule du cumulus n'est présente)
- Grade 1 : ovocyte partiellement dénudé
- Grade 2 : ovocyte avec expansion partielle des cellules du cumulus
- Grade 3 : ovocyte avec expansion totale des cellules du cumulus





**Figure 9:** Gradation des ovocytes après la maturation *in vitro*

Grade 1 : ovocyte partiellement dénudé, Grade 2 : ovocyte avec expansion partielle des cellules du cumulus, Grade 3 : ovocyte avec expansion totale des cellules du cumulus.

Source : (Alvarez et al., 2009)



**Photographie 2:** Observation à la loupe binoculaire des 15 ovocytes de bovin d'un groupe après maturation *in vitro*

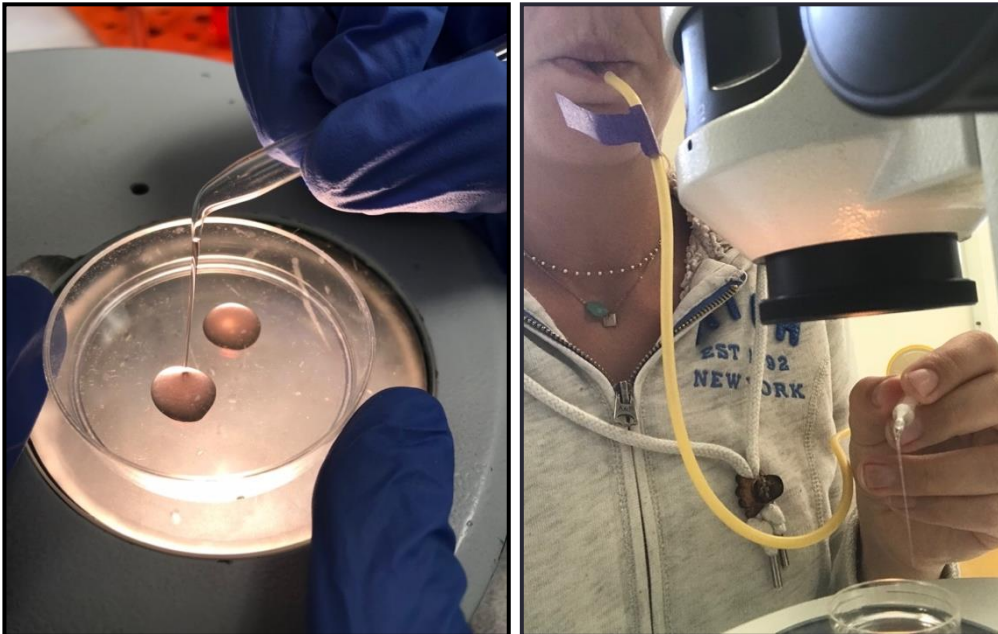
Photographie regroupant : 3 ovocytes dénudés, 2 ovocytes de grade 1, 3 ovocytes de grade 2, 7 ovocytes de grade 3.

Source : Margaux Pellet

##### 5) Séparation des cellules du cumulus et des ovocytes

Après observation post maturation, chaque ovocyte a été dénudé, c'est-à-dire séparé des cellules du cumulus, selon le protocole suivant :

Dans une boîte de Pétri de 150 mm de diamètre, 5 gouttes de 100  $\mu$ L de tampon phosphate salin (PBS 1X, Gibco, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été déposées. Les 15 complexes cumulus-ovocytes d'un même lot ont été déposés dans une première goutte. Les ovocytes ont été séparés des cellules du cumulus par des aspirations répétées à l'aide d'une pipette Pasteur modifiée (Photographie 2), (Diaw et al. 2018 ; Herrera-Hidalgo et al. 2020).



**Photographies 3A et 3B:** Séparation mécanique des ovocytes et des cellules du cumulus avec la pipette Pasteur modifiée par aspiration et reflux de milieu contenant l'ovocyte

Source : Margaux Pellet

Les cellules du cumulus ont ensuite été mises dans des tubes et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les ovocytes ont été fixés en les déposant pendant 10 minutes dans une solution de formaldéhyde 10% (Formaline, Chaptec INC., Montréal, QC, CA).

#### 6) Évaluation des caractéristiques des ovocytes

Le stade de maturation des ovocytes a été évalué au travers de la configuration de la chromatine. Pour cela, le colorant Hoechst 33258 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) un dérivé benzimidazolé qui se fixe dans les sillons mineurs de l'ADN des cellules eucaryotes a été utilisé. Il est sélectif des acides nucléiques Adénine et Thymines, a une longueur d'onde d'excitation dans les ultraviolets, et émet une fluorescence bleue entre 460 nm et 490 nm.

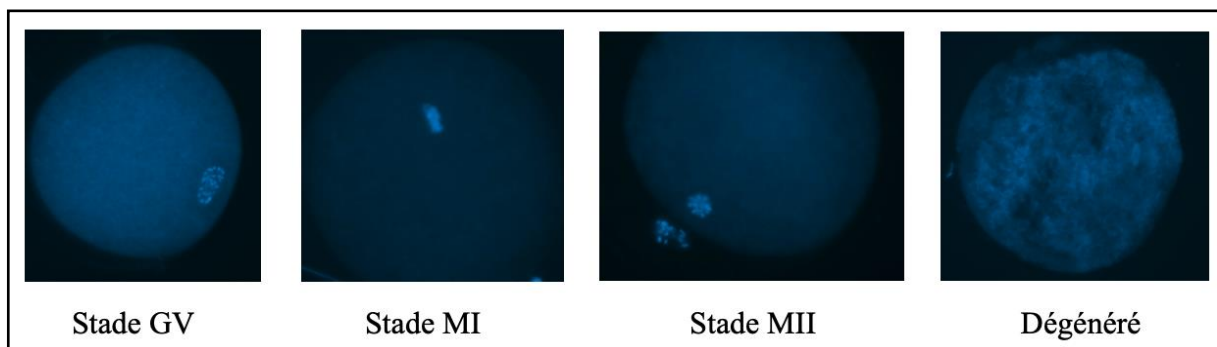
Préparation de la solution de coloration :

La solution mère de Hoechst à la concentration de 0,1mg/mL a été diluée avec du tampon phosphate salin (PBS 1X, Gibco, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pour obtenir une

solution à la concentration finale de 5 µg/mL. Cette étape a été réalisée en protégeant les tubes de la lumière.

Les ovocytes fixés ont été placés dans 0,5 mL de la solution de Hoechst dans des boîtes à 4 puits (15 ovocytes par puits), recouvertes de papier aluminium et placées dans une étuve à 37°C pendant 10 minutes. Les ovocytes colorés ont ensuite été placés entre lames et lamelles. Pour cela, une goutte de Permafluor® a été déposée au centre de la lame et les ovocytes y ont été déposés. Une première observation à la loupe binoculaire (WILD heerbrugg) a été réalisée afin de vérifier que les 15 ovocytes de chaque échantillon étaient présents sur la lame. Puis, les lames ont été scellées et conservées à l'abri de la lumière dans une chambre froide à 4°C.

Les lames ont été observées au microscope à fluorescence (PALM MicroBeam Zeiss) avec une longueur d'onde de 365 nm. Chaque ovocyte a été classé suivant son stade de maturation nucléaire : Métaphase II (MII), Métaphase I, stade vésicule germinative GV ou encore dégénéré.



**Figure 10:** Stades de maturation nucléaire des ovocytes de bovin observés au microscope à fluorescence

Stade GV : stade vésicule germinale, stade MI : stade métaphase I, stade MII : stade métaphase 2 visualisation du globule polaire, stade dégénéré : ovocyte non viable avec aspect hétérogène de la chromatine et du cytoplasme

Source : Margaux Pellet

#### 7) Expression du gène StAR

L'expression du gène StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) impliqué dans l'ovogénèse et la maturation ovocytaire a été évaluée dans les cellules du cumulus.

L'extraction de l'ARN total des cellules du cumulus a été réalisée en utilisant le kit d'isolement d'ARN Arcturus PicoPure® (Applied biosystems) selon les instructions fournies par le fabricant. L'ARN total obtenu a subi ensuite une transcription inverse pour donner de l'ADNc

(ADN complémentaire) en utilisant le kit SuperScript Vilo cDNA® (Invitrogen) selon les instructions données par le fabricant.

Les tests de PCR en temps réel ont été effectués avec le système CFX96 Real time® (Biorad) et en utilisant les réactifs SsoAdvanced universal sybr green supermix® (Biorad). La réaction de PCR a été réalisée avec les réactifs suivants : 7,5µL de SsoAdvanced sybr green®, 1,1 µL d'eau, 4 µL de ADNc et 1,2 µL de chacune des paires d'amorces.

Chaque échantillon a été analysé en double et les niveaux d'expressions ont été rapportés à ceux des gènes de ménage RPL19, SDHA, YWHAZ. Puis les données ont été normalisées avec un échantillon de contrôle en utilisant la méthode des  $\Delta\Delta C_t$  pour prendre en compte de l'efficacité de l'amplification.

Les amorces ont été choisies selon plusieurs critères :

- Spécifiques au gène à amplifier
- Taille minimum de 20 paires de bases
- Riches en bases C et G (pour que les liaisons hydrogènes soient plus solides)
- Les températures de fusion sont identiques et proches de 65°C (car l'hybridation se fait à 60°C)
- Elles ne s'hybrident pas entre elles

**Tableau 8:** Amorces utilisées pour évaluer l'expression du gène StAR

Gène	Sens	Couple d'amorce
StAR	forward	CCCAGCAGAAGGGTGTCATC
	reverse	TGCGAGAGGACCTGGTTGAT

En premier lieu, un échantillon de cellules de granulosa de bovin n'appartenant pas à l'étude a été utilisé afin de définir les meilleures conditions d'utilisation des amorces du gène StAR. Pour standardiser l'efficacité de la réaction, des dilutions en cascade d'un facteur 2 jusqu'à la dilution au 1/256<sup>ème</sup> ont été réalisées. Chaque échantillon dilué a été analysé en qPCR avec le couple d'amorces du gène StAR. Des courbes exprimant la quantité de fluorescence en fonction du nombre de cycles ont été obtenues pour chaque dilution ainsi que les courbes exprimant les Ct (cycle threshold ou cycle seuil) en fonction du logarithme de la fluorescence. La pente de cette dernière courbe correspond à l'efficacité de la PCR, qui a été arbitrairement fixée entre 1,9 et 2,1. Une efficacité égale à 2 signifie qu'à chaque cycle de PCR, il y a 2 copies d'ADNc générées. Pour les dilutions d'échantillon d'ADNc allant de 1/8 à 1/256, l'efficacité obtenue

était acceptable. L'efficacité moyenne de la qPCR (sur l'ensemble des dilutions) était égale à 2,1. Le couple d'amorces a donc été validé et utilisé pour évaluer l'expression du gène StAR. Pour des raisons de quantité et de volume d'échantillon les qPCR ont été réalisées sur des échantillons à la dilution 1/16 des échantillons de l'étude. Chaque échantillon a été analysé en double et les niveaux d'expression du gène StAR ont été exprimés en fonction de ceux des gènes de ménage (SDHA, YWHAZ et RPL19).

#### 8) Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel JMP (SAS institute, Cary, NC).

La répartition des ovocytes suivant les grades d'expansion des cellules du cumulus dans les différents groupes a été réalisée avec le test de Cochran-Mantel-Haenszel.

Pour évaluer les effets des différents traitements (durée et température de conservation dans l'emP3) sur la maturation des ovocytes (stade métaphase II de la méiose), un test de régression logistique multinomial a été utilisé avec les 3 lots comme facteur aléatoire et les 5 traitements comme facteurs fixes. Le risque alpha a été ajusté avec la procédure séquentielle Benjamin-Hochberg.

Les résultats de la PCR quantitative ont été analysés avec la méthode des  $\Delta\Delta Ct$ . Ct correspondant à la valeur seuil c'est-à-dire au nombre de cycles à partir duquel on détecte de la fluorescence au-dessus du bruit de fond. Il s'agit d'une méthode qui permet une quantification relative de l'ADN.  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{contrôle}}$ . Avec :

$$- \Delta Ct_{\text{échantillon}} = Ct_{\text{StAR-échantillon}} - Ct_{\text{gène de ménage-échantillon}}$$

$$- \Delta Ct_{\text{contrôle}} = Ct_{\text{StAR-contrôle}} - Ct_{\text{gène de ménage-contrôle}}$$

On obtient donc une quantité relative c'est-à-dire  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Les différences d'expression du gène StAR entre les groupes ont été évaluées par un test ANOVA à un facteur, suivi par un test de post-hoc de Holm-Sidak pour déterminer les groupes statistiquement différents.

## II. Résultats

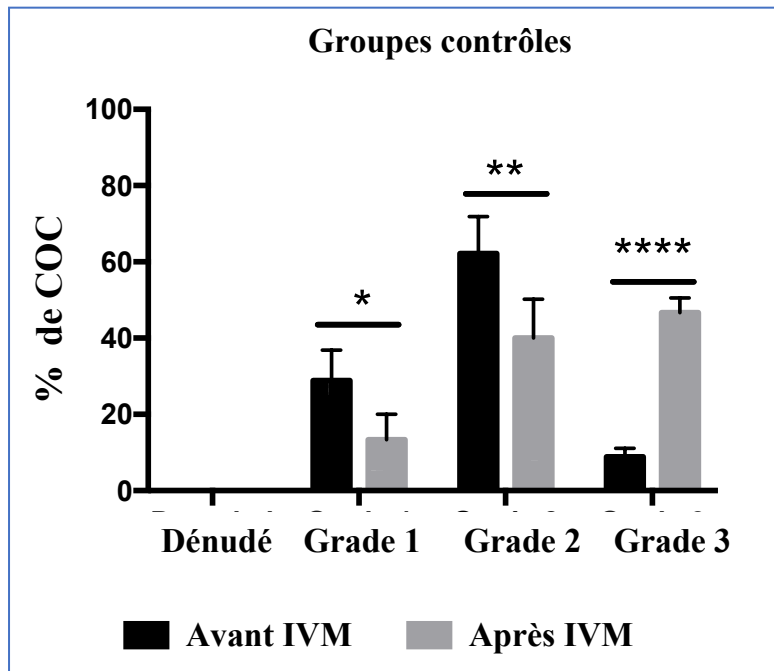
### 1) Expansion des cellules du cumulus

Le tableau 9 présente la répartition des COC en fonction des grades d'expansion, classés en 4 catégories : dénudé, grade 1, grade 2, grade 3. A l'issue de cette étape de MIV les COC devaient atteindre le grade 3.

**Tableau 9:** Répartition des COC selon les grades d'expansion avant et après la maturation *in vitro* et en fonction des conditions de conservation (contrôle : sans conservation ou emp3), de la température (4°C ou 22°C), de la durée (12h ou 24h)

Répartition des COC selon les grades d'expansion								
	Avant MIV				Après MIV			
	Dénudé	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Dénu dé	Grade 1	Grade 2	Grade 3
<b>Contrôle</b>	0 (0%)	13 (28,9%)	28 (62,2%)	4 (8,9%)	0 (0%)	6 (13,3%)	18 (40%)	21 (46,7%)
<b>12h 4°C</b>	7 (15,6%)	15 (33,3%)	19 (42,2%)	4 (8,9%)	7 (15,6%)	10 (22,2%)	13 (28,9%)	15 (33,3%)
<b>12h 22°C</b>	9 (20%)	10 (22,2%)	23 (51,1%)	3 (6,7%)	7 (15,6%)	6 (13,3%)	11 (24,4%)	21 (46,7%)
<b>24h 4°C</b>	8 (17,8%)	20 (44,4%)	16 (35,6%)	1 (2,2%)	6 (13,3%)	14 (31,1%)	11 (24,4%)	14 (31,1%)
<b>24h 22°C</b>	5 (11,1%)	8 (17,8%)	29 (64,4%)	3 (6,7%)	5 (11,1%)	1 (2,2%)	10 (22,2%)	29 (64,4%)

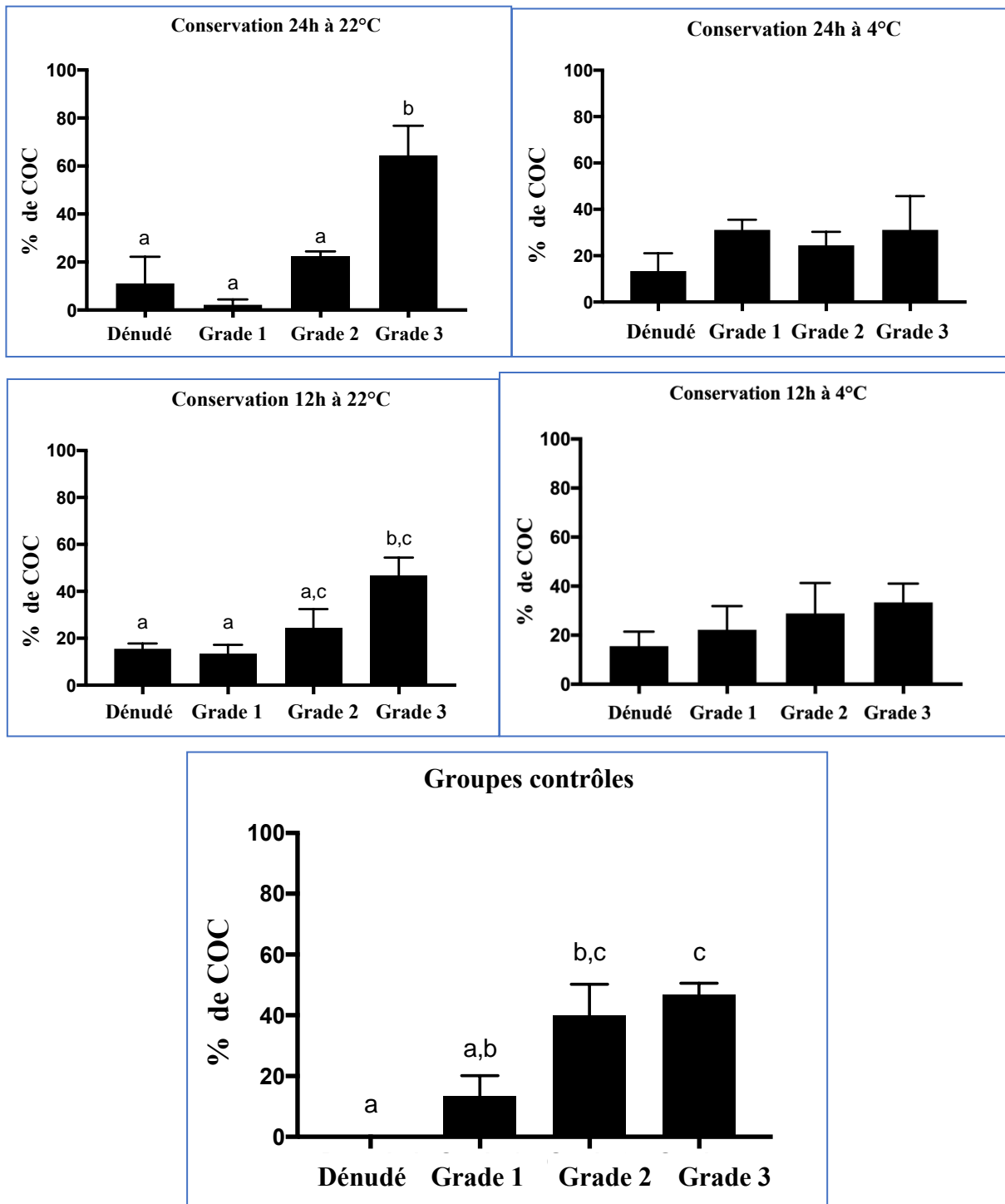
La figure 11 présente la répartition des COC des groupes contrôles, qui n'ont pas subi d'étape de conservation, suivant leur grade d'expansion avant et après maturation *in vitro*.



**Figure 11:** Répartition des COC des groupes contrôles suivant leur grade d'expansion avant et après maturation *in vitro* (les groupes contrôles n'ont pas subi de conservation dans l'emP3)

Pour les ovocytes du groupe contrôle n'ayant pas subi de conservation dans l'emP3, le pourcentage de COC de grade 1 et de grade 2 est important avant la MIV ce qui est normal puisque les COC sélectionnés après la récolte étaient des ovocytes de grade 1 et 2. De plus on note une forte augmentation du nombre d'ovocytes de grade 3 après la MIV, de 8,9% à 46,7%. Parallèlement, la proportion de COC de grade 2 et 3 est plus importante que celle de COC de grade 1 et d'ovocytes dénudés à la fin de la MIV (figure 11). Par ailleurs, l'absence d'ovocytes complètement dénudés avant et après la MIV indique que les manipulations des COC n'ont pas altéré les cellules du cumulus. Ces résultats nous permettent de valider notre protocole expérimental.

La figure 12 présente la répartition des COC suivant leur grade d'expansion après maturation *in vitro* en fonction des conditions de conservation dans l'emP3 soit 24h à 4°C, 24h à 22°C, 12h à 4°C, et 12h à 22°C. Les COC du groupe contrôle n'ont pas subi d'étape de conservation dans l'emP3.



**Figure 12:** Répartition des COC suivant leur grade d'expansion avant et après maturation *in vitro* en fonction des conditions de conservation dans l'emP3 soit 24h à 4°C, 24h à 22°C, 12h à 4°C, et 12h à 22°C. Les COC du groupe contrôle n'ont pas subi d'étape de conservation dans l'emP3

Pour les conditions de conservation à 22°C durant 12h et 24h, le taux de COC de grade 2 et 3 est significativement plus important que celui de COC de grade 1 ou que celui des ovocytes dénudés après la MIV. Au contraire, pour les ovocytes conservés à 4°C, pendant 12h ou 24h,



les pourcentages d'ovocytes de grade 2 ou 3, ne sont pas différents des grades indiquant un défaut de maturation ovocytaire (dénudé ou grade 1).

## 2) Maturation nucléaire des ovocytes *in vitro*

Le tableau 10 décrit le pourcentage d'ovocytes en métaphase II, c'est-à-dire matures, en fonction des conditions de conservation. Les ovocytes du groupe contrôle n'ont pas subi de conservation dans l'emp3 et ont été placés en maturation *in vitro* directement après la récolte des ovocytes. Le tableau 11 indique les différences de pourcentage d'ovocytes en métaphase II en fonction des groupes.

**Tableau 10:** Pourcentage des ovocytes en métaphase II après maturation *in vitro*, en fonction des conditions de conservation dans l'emp3 (12h ou 24h et à une température de 4°C ou 22°C). Le groupe contrôle n'a pas subi de conservation dans l'emp3 et a été placé en maturation *in vitro* directement après récolte des ovocytes.

Traitements	Contrôle	24h à 4°C	24h à 22°C	12h à 4°C	12h à 22°C
% d'ovocytes en métaphase II	66,7 ± 3,1	8,9 ± 1,8	46,7 ± 3,1	11,1 ± 1,8	48,9 ± 3,6

**Tableau 11:** Comparaisons du pourcentage d'ovocytes en métaphase II en fonction des conditions de conservation. Résultats de la régression logistique mixte, risque alpha ajusté avec la procédure séquentielle Benjamini-Hochberg

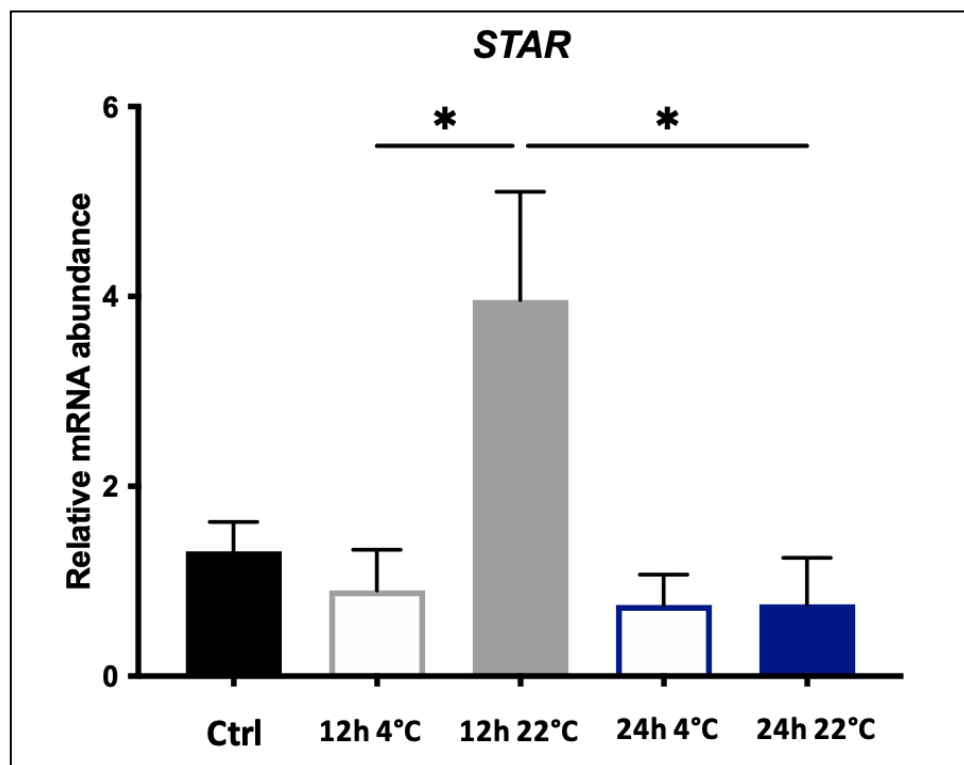
Comparaisons	Estimation	Erreur standard	Z value	Valeur de P
CTRL vs. 24h 22°C	0.8267	0.2677	3.09	0.0020
CTRL vs. 24h 4°C	3.0204	0.1238	24.41	<.0001
CTRL vs. 12h 22°C	0.7376	0.2027	3,64	0.0003
CTRL vs. 12h 4°C	2.7726	0.3142	8,82	<.0001
24h 22°C vs. 24h 4°C	2.1937	0.3393	6,47	<.0001
24h 22°C vs 12h 22°C	-0.08908	0.1924	-0,46	0.6434
24h 22° vs 12h 4°C	1.9459	0.09755	19,95	<.0001
24h 4°C vs 12h 22°C	-2.2828	0.1968	-11,6	<.0001
24h 4° vs 12h 4°C	-0.2478	0.4078	-0,61	0.5433
12h 22°C vs 12h 4°	2.0350	0.2855	7.13	<.0001

Le pourcentage d'ovocytes en MII est significativement plus élevé dans le groupe contrôle comparativement à tous les autres groupes (Tableau 11). Cela signifie que la conservation dans l'emp3 quelles que soient la durée ou la température diminue le pourcentage d'ovocytes

matures. Par ailleurs, la conservation des ovocytes à la température de 4°C quelle que soit la durée, altère la maturation ovocytaire avec une forte diminution du taux d'ovocytes en MII. Pour la conservation à la température de 22°C, la durée de conservation (12h ou 24h) n'a pas modifié le pourcentage d'ovocytes en métaphase II.

### 3) Expression du gène StAR dans les cellules du cumulus

L'expression du gène StAR dans les cellules du cumulus a été évaluée par PCR en temps réel. L'abondance relative des ARNm codant pour la protéine StAR est présentée sur la figure 13.



**Figure 13:** Abondance relative des ARNm codant pour la protéine StAR ( $\pm$  S.E.M) dans les cellules du cumulus après conservation dans l'emP3 pendant 12h ou 24h et à 22°C ou à 4°C après maturation *in vitro*

L'expression de l'enzyme StAR est significativement augmentée dans les cellules du cumulus ayant subi une conservation dans l'emP3 pendant 12h à 22°C comparativement aux COC conservés dans l'emP3 pendant 12h à 4°C. La température de conservation des COC est donc essentielle pour maîtriser l'expression du gène StAR.

À la température de 22°C, l'expression relative de la StAR dans les cellules du cumulus ayant subi une conservation dans l'emP3 pendant 12h est significativement augmentée comparativement à une durée de conservation de 24h.

Le tableau 12 indique les comparaisons de l'expression du gène StAR pour tous les groupes considérés deux à deux.

**Tableau 12:** Comparaison de l'expression du gène de l'enzyme StAR pour les différents groupes de cellules du cumulus en fonction des conditions de conservation (Tests de Holm-Sidak)

Test de comparaison multiple de Holm-Šidák's	Différence entre les moyennes	Valeur de P
Ctrl vs. 12h 4°C	0,4133	0,9523
Ctrl vs. 12h 22°C	-2,647	0,0631
Ctrl vs. 24h 4°C	0,5667	0,9523
Ctrl vs. 24h 22°C	0,5600	0,9523
12h 4°C vs. 12h 22°C	-3,060	0,0345
12h 4°C vs. 24h 4	0,1533	0,9523
12h 22°C vs. 24h 22°C	3,207	0,0305

### III. Discussion

#### 1) Conditions de l'expérience

La qualité des COC est influencée par de multiples facteurs (Merton et al., 2003):

- Des facteurs intrinsèques tels que la race, l'âge, le statut reproducteur, le statut nutritionnel, le stade du cycle œstral, etc, pour lesquels nous n'avons eu aucune information pour notre étude. Toutefois, ces facteurs ne devraient pas influencer nos résultats car, les ovocytes récoltés le même jour ont été répartis de façon aléatoire dans les différents groupes.
- Des facteurs extrinsèques comme le temps entre l'abattage et la récupération des COC, la conservation des ovaires le temps du transport, le milieu utilisé pour le prélèvement, et les qualités du manipulateur lors de la récolte. Nous allons discuter de ces facteurs et de leur potentielle influence, dans le cadre de notre étude.

##### *a. Récolte et transport des ovaires*

Les ovocytes immatures qui ont été utilisés pour notre étude étaient issus d'ovaires de vaches provenant d'un abattoir local. Les ovaires ont été acheminés de l'abattoir jusqu'au laboratoire dans une caisse à température ambiante soit 22°C, le transport a duré environ 50 minutes. La conservation des ovaires pendant le transport est un élément clé pour maintenir la compétence de maturation des ovocytes. Des travaux antérieurs ont été menés sur la durée et les conditions de transport et ont montré qu'une conservation à température ambiante pour une durée de transport inférieure à 7h (Caixeta et al., 2013) n'affectait pas l'aptitude des ovocytes à la maturation *in vitro*.

##### *b. Récolte et sélection des ovocytes*

La technique utilisée pour la récolte des COC a été décrite et utilisée dans plusieurs études (Caixeta et al., 2013; Pascottini et al., 2018). Elle est utilisée en routine au CRRF (Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité) de la faculté vétérinaire de Montréal. Bien que cette technique ait fait ses preuves, son efficacité n'en est pas moins dépendante du manipulateur. Dans le cadre de notre projet, les manipulateurs étaient des novices, ce qui peut expliquer que le nombre d'ovocytes récoltés par ovaire a été plus faible comparativement à d'autres études, et il est possible que les ovocytes aient été abimés lors des manipulations.

Après la récolte, les ovocytes ont été observés au microscope et sélectionnés selon leur morphologie. Pour notre étude, nous avons décidé de ne sélectionner que les COC avec au

moins 3 couches de cellules compactes et un ooplasme translucide. En effet, la morphologie des COC est relativement facile à évaluer, et c'est le critère le plus utilisé pour classer et sélectionner les COC. Les critères de sélection sont fondés sur l'apparence (couleur et texture) et le nombre de couches de cellules du cumulus ainsi que sur l'apparence du cytoplasme de l'ovocyte. L'ensemble de ces critères est utilisé pour évaluer la qualité des COC. La présence de plusieurs couches complètes de cellules compactes du cumulus et l'aspect homogène et clair du cytoplasme de l'ovocyte sont des critères de qualité. A l'inverse, les COC qui présentent des signes d'atrésie précoce (granulations cytoplasmiques, moins de 5 couches de cellules du cumulus, masses cellulaires sombres) ont un potentiel de maturation et de développement *in vitro* plus faible (taux de clivage et formation de blastocystes). Il serait optimal de ne sélectionner que les COC avec plusieurs couches de cellules (plus de 5), compactes sans zone sombre dans le cytoplasme de l'ovocyte ce qui conduirait à une réduction du rendement de la récolte (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002; de Wit et al., 2000; Emanuelli et al., 2019; Yuan et al., 2005).

#### *c. Conservation des ovocytes*

L'emP3 est un milieu commercialisé pour le transport des embryons de bovin au Canada, mais qui n'a pas été testé pour conserver des gamètes. Le CRRF a mené deux études pour évaluer l'intérêt de l'emP3 : l'une pour la conservation des ovocytes de vache et l'autre sur des ovocytes de jument (Thèse d'exercice vétérinaire Vincent Melvel, 2020) avec les mêmes conditions de durée et de température de conservation (24h ou 12h et 4°C ou 22°C). Les études sur l'utilisation de l'emP3 comme milieu de conservation des ovocytes ont été initiées pour pallier un défaut d'approvisionnement de deux milieux de conservation Vigro® et Syngro® utilisés et testés par le CRRF pour la conservation des ovocytes de jument.

#### *d. Milieu de maturation ovocytaire*

Différents milieux de maturation sont utilisés pour la MIV des ovocytes de bovin, avec des compositions variées. Le milieu M199 d'Earl est couramment utilisé, il est complétement en EGF un facteur de croissance. L'équipe du laboratoire a déjà effectué des travaux avec ce milieu et avait obtenu des taux de maturation satisfaisants. Il ne contient pas d'hormone. Dans l'étude de Cevik, et al., l'ajout de FSH ou de LH augmente l'expansion des COC et le taux d'ovocytes maturés après IVM (Cevik et al., 2011).

#### *e. Marqueurs morphologiques pour la sélection des COC*

En plus de la classification morphologique des COC, d'autres marqueurs morphologiques avant MIV peuvent être utilisés.

L'aspect morphologique de l'ooplasm est dépendant de la teneur en lipides (Dunning et al., 2014; Van Blerkom et al., 1990). Ces lipides endogènes sont sous forme de gouttelettes, ils constituent une source d'énergie et jouent un rôle important dans la maturation des ovocytes. Par ailleurs, l'absence d'utilisation des lipides dans les ovocytes est corrélée avec une maturation nucléaire inadéquate, alors que le nombre de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme augmente avec la croissance de l'ovocyte et avec l'avancement de la méiose (Kim et al., 2001; Prates et al., 2013; Van Blerkom et al., 1990). L'opacité du cytoplasme de l'ovocyte peut être utilisée comme un marqueur de la teneur en lipides, prédictif de la capacité de développement embryonnaire. Ainsi, les ovocytes avec un cytoplasme homogène et marron contiennent plus de lipides et présentent un potentiel de développement embryonnaire plus élevé que ceux avec un cytoplasme pâle dont les réserves en lipides sont limitées (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002; Hawk & Wall, 1994; Nagano et al., 2006). De nouvelles techniques non invasives de mesure de la teneur en lipides telles que la microscopie à contraste interférentiel et la spectroscopie de diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) sont en cours de développement (Prates et al., 2013) et pourraient permettre une sélection plus objective des ovocytes.

#### 2) Marqueurs de la maturation ovocytaire *in vitro* chez la vache

Pour évaluer l'effet de la conservation des ovocytes dans l'emP3 plusieurs marqueurs de maturation ovocytaire ont été évalués.

##### *a. Expansion des COC*

L'expansion des COC est un paramètre non invasif et souvent utilisé comme marqueur de maturation. La classification comprend généralement 3 voire 4 grades caractérisant le degré d'expansion (Alvarez et al., 2009). En effet la quantité et la qualité de la masse du cumulus expansé sont corrélées à la capacité de développement du blastocyste. Cependant, l'évaluation de ce paramètre est relativement subjective et dépendante de l'observateur qui, dans le cadre de notre étude était novice.

### *b. Expression des ARNm dans les cellules du cumulus*

L'expression des gènes dans les CC après la MIV est évaluée pour rechercher des marqueurs prédictifs de la compétence développementale des ovocytes. Les ARNm peuvent être quantifiés soit par qRT-PCR soit par hybridation sur puces à ADN. Cependant, beaucoup de facteurs peuvent influencer le profil d'expression des gènes dont la composition des milieux de maturation. Par ailleurs, une partie des ARN peut être stockée dans l'ovocyte et seront donc en quantité peu importante dans les CC à un instant donné. Chez la vache, une expression élevée de la HAS2, de l'INHbA (Inhibine bêta A), du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), de la GREM1, de la BTC (bêta celluline) et de la CD44 ainsi que de la PTGS2 (Prostaglandine synthase 2) est associée à une compétence développementale des ovocytes et à la qualité embryonnaire chez la vache (Assidi et al., 2008).

Cependant, ces transcrits sont différemment exprimés dans les CC selon le stade de développement de l'ovocyte (GV, MI ou MII). Par conséquent, ces études n'ont pas encore permis de déterminer un marqueur fiable, prédictif de la compétence ovocytaire et utilisable sur le terrain.

La protéine StAR est une enzyme de la stéroïdogenèse, elle permet la translocation du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane mitochondriale interne. L'approvisionnement de la mitochondrie en cholestérol permet la synthèse d'hormones stéroïdes. Ces hormones dont la progestérone, activent les cascades de signalisation cellulaire dont celle des protéines kinases qui sont exprimées dans les ovocytes et dans les cellules du cumulus et qui sont impliquées dans le contrôle de la maturation des ovocytes chez les bovins (Uzbekova et al., 2011).

### *c. Autres marqueurs de la maturation ovocytaire*

Il existe d'autres marqueurs qui permettent d'évaluer la maturation ovocytaire que nous n'avons pas évalué, comme par exemple, la taille de l'ovocyte. En effet, les ovocytes acquièrent la compétence méiotique (passage en métaphase II) quand ils atteignent un diamètre minimum de 115 microns (Hazeleger et al., 1995).

Il est aussi possible d'évaluer l'épaisseur de la zone pellucide par microscopie à lumière polarisée. En effet, une zone pellucide plus fine est associée à des ovocytes de qualité et à un meilleur taux de développement de blastocystes (Rienzi et al., 2011).

### 3) Bilan des résultats

La conservation des ovocytes immatures dans l'emP3 à 22°C (quelle que soit la durée) a permis d'obtenir un taux de COC de grade 3 satisfaisant après MIV. La conservation des ovocytes dans l'emP3 a diminué le taux d'ovocytes ayant atteint le stade métaphase II. De plus, cette diminution est plus marquée pour les ovocytes conservés à 4°C (24h et 12h). Dans notre étude, le % d'ovocytes en MII après maturation sans conservation préalable des COC collectés, est de 67 %, soit un peu en-deçà de ceux obtenus chez la vache (85 à 90%) (Lonergan et al., 2003). Cette différence pourrait être attribuée à la complémentation du milieu de maturation en hormones gonadotropes dans l'étude de Lonergan et al. Par ailleurs, compte tenu de la variabilité interindividuelle, le nombre d'ovocytes (225 ovocytes au total) est peut-être insuffisant pour évaluer les effets des conditions de conservation.

L'interprétation des variations de l'expression de la StAR, une enzyme clé de la stéroïdogénèse, et des conditions de conservation, est plus difficile, sans prendre en compte sa cinétique d'expression. En effet, l'expression de la StAR par les CC conservés à 22°C dans l'emP3 est élevée pour une durée de conservation de 12h, alors que les niveaux sont diminués après 24h de conservation.

Les conditions de conservation à 22°C dans le milieu EmP3, quelle que soit la durée, pourraient donc permettre de faciliter les modalités d'expédition d'ovocytes tout en maintenant un rendement de maturation acceptable. Ce résultat doit maintenant être confirmé sur un plus grand nombre d'ovocytes pour garantir la robustesse de nos résultats.

### 4) Perspectives du projet

Ce projet s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des techniques de production *in vitro* d'embryons. Notre étude a montré que l'emP3 pourrait permettre le transport sur de longues distances d'ovocytes récupérés par OPU jusqu'au laboratoire, sans altération majeure de la capacité des ovocytes à être fécondés.

Afin de consolider les résultats obtenus, il serait intéressant de mesurer l'abondance de l'ARNm StAR pour différentes durées de conservation des COC dans l'emP3. En plus de l'étape de maturation *in vitro*, il est essentiel d'évaluer la capacité des ovocytes conservés à se développer jusqu'au stade blastocyste. Et, si les résultats sont satisfaisants, ces conditions de conservation dans l'emP3 pourront être appliquées à des ovocytes collectés par OPU sur le terrain.



## CONCLUSION

Les avancées des techniques de reproduction assistée chez la vache sont très prometteuses. En effet, la technique de récolte d'ovocytes permet de s'affranchir des techniques de maîtrise des cycles et de féconder *in vitro* plusieurs ovocytes avec des semences de taureaux différents.

Néanmoins il reste encore de nombreux progrès à réaliser tant sur le plan de la maturation *in vitro* des ovocytes que sur la culture *in vitro* des embryons, pour pouvoir atteindre des rendements similaires à ceux obtenus par la technique de productions d'embryons *in vivo*. La transférabilité de cette technique sur le terrain nécessite de dissocier dans le temps et l'espace des opérations de récolte d'ovocytes et de mise en maturation. La mise au point de conditions de conservation des ovocytes est donc importante pour le développement de ces techniques sur le terrain.

## Liste des références bibliographiques

- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, *69*(1), 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
- Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010a). Ovarian follicular dynamics : A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *45*(1), 171-179. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x>
- Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010b). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II : Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *45*(1), 180-187. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>
- Alvarez, G. M., Dalvit, G. C., Achi, M. V., Miguez, M. S., & Cetica, P. D. (2009). Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas De Microscopia Electronica ... Et. Al*, *33*(3), 167-177.
- Assidi, M., Dufort, I., Ali, A., Hamel, M., Algriany, O., Dielemann, S., & Sirard, M.-A. (2008). Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biology of Reproduction*, *79*(2), 209-222. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.067686>
- Bao, B., & Garverick, H. A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves : A review. *Journal of Animal Science*, *76*(7), 1903-1921. <https://doi.org/10.2527/1998.7671903x>
- Bilodeau-Goeseels, S., & Panich, P. (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, *71*(3-4), 143-155. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00188-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00188-9)
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., & Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, *27*(1), 147-158. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
- Buccione, R., Schroeder, A. C., & Eppig, J. J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, *43*(4), 543-547. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.4.543>
- Caixeta, E. S., Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Price, C. A., Machado, M. F., Lima, P. F., & Buratini, J. (2013). Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction (Cambridge, England)*, *146*(1), 27-35. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0079>
- Calder, M. D., Caveney, A. N., Smith, L. C., & Watson, A. J. (2003). Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *1*, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-14>
- Canipari, R. (2000). Oocyte—Granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update*, *6*(3), 279-289. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.279>
- Cevik, M., Sen, U., Kocyigit, A., Soydan, E., & Kuran, M. (2011). Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol 17-beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *17*,

1009-1014.

Charles Thibault, Marie-Claire Levasseur, Ponsart, C., Le Guienne, B., Beaujean, N., & Guyader-Joly, C. (2001). Chapitre 30 : Biotechnologies des gamètes et de l'embryon. In *La reproduction chez les mammifères et l'homme* (INRA. Paris Ellipses, Vol. 1-1, p. 553-578). [https://ulyse.univ-](https://ulyse.univ-lorraine.fr/discovery/fulldisplay/alma991003898929705596/33UDL_INST:UDL)

[lorraine.fr/discovery/fulldisplay/alma991003898929705596/33UDL\\_INST:UDL](https://ulyse.univ-lorraine.fr/discovery/fulldisplay/alma991003898929705596/33UDL_INST:UDL)

Curry, T. E., Mann, J. S., Huang, M. H., & Keeble, S. C. (1992). Gelatinase and proteoglycanase activity during the periovulatory period in the rat. *Biology of Reproduction*, *46*(2), 256-264. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.2.256>

De Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P., & Dessy, F. (2005). Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science*, *86*(1-2), 13-25.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.022>

de Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., & Kruip, T. A. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, *24*(2), 197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>

de Wit, A. A., Wurth, Y. A., & Kruip, T. A. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*, *78*(5), 1277-1283. <https://doi.org/10.2527/2000.7851277x>

Dini, P., Bogado Pascottini, O., Ducheyne, K., Hostens, M., & Daels, P. (2016). Holding equine oocytes in a commercial embryo-holding medium : New perspective on holding temperature and maturation time. *Theriogenology*, *86*(5), 1361-1368.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.079>

Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction*, *5*(3), 143-152.

<https://doi.org/10.1530/ror.0.0050143>

Drion, P., Ectors, F., Hanzen, C., Houtain, J. Y., Lonergan, P., & Beckers, J.-F. (1996).

Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 2. Ovulation, corps jaune et lutéolyse. *Point Vétérinaire*, *28*. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/7819>

Dunning, K. R., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence : The role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. *Reproduction (Cambridge, England)*, *148*(1), R15-27. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0251>

Emanuelli, I. P., Costa, C. B., Rafagnin Marinho, L. S., Seneda, M. M., & Meirelles, F. V. (2019). Cumulus-oocyte interactions and programmed cell death in bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, *126*, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.028>

Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *163*(1-2), 53-60.

[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00240-3)

Fortune, J. E., Rivera, G. M., & Yang, M. Y. (2004). Follicular development : The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, *82-83*, 109-126. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>

Fortune, J. E., Yang, M. Y., & Muruvi, W. (2011). In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reproduction, fertility, and development*, *23*(1), 15-22. <https://doi.org/10.1071/RD10250>

Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, *55*(6), 1341-1357.

[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00486-1)

Ginther, O. J., Kot, K., Kulick, L. J., & Wiltbank, M. C. (1997). Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, *48*(1), 75-87.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00192-1)

Guénard, H., Carré, F., Deviller, P., Hanoune, J., Harf, A., Lacour, J.-R., Lamour, Y., Lévy,

B., & Marthan, R. (1996). *Physiologie humaine*. <https://www.unitheque.com/physiologie-humaine/pradel/Livre/28926>

Guyader-Joly, C., B, M., F, M., V, C., S, P., C, G., Humblot, P., & Ponsart, C. (2010). Biological factors affecting oocytes collection and embryo production in a commercial OPU-IVP system in Holstein and Montbeliard breeds. *Reproduction*. Guyader-Joly C., Moulin B., Mariller F., Currin V., Ponchon S., Gonzalez C., Humblot P., Ponsart C., 2010. *Reproduction Fertility and Development*, 2010, Vol. 22(1), p. 378. *Reproduction Fertility and Development*, 22, 378.

Hanzen, C. (2009). *La production d'embryons in vitro dans l'espèce bovine*. <https://studylibfr.com/doc/1179895/la-production-d-embryons-in-vitro-dans-l-esp%C3%A8ce-bovine>

Hawk, H., & Wall, R. (1994). *Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. II. Media and co-culture cells*. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90823-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90823-2)

Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Stubbing, R. B., & Walton, J. S. (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 43(2), 509-522. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)00043-t](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)00043-t)

Hinrichs, K., Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Love, C. C., & Walckenaer, B. E. (2005). Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes : Changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1142-1150. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036012>

Hinrichs, K., & Williams, K. A. (1997). Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biology of Reproduction*, 57(2), 377-384. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.2.377>

Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., & Holland, M. K. (2006). Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 12(2), 61-69. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal010>

Izadyar, F., Hage, W. J., Colenbrander, B., & Bevers, M. M. (1998). The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 49(4), 444-453. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199804\)49:4<444::AID-MRD12>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199804)49:4<444::AID-MRD12>3.0.CO;2-U)

Juengel, J. L., Hudson, N. L., Berg, M., Hamel, K., Smith, P., Lawrence, S. B., Whiting, L., & McNatty, K. P. (2009). Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction (Cambridge, England)*, 138(1), 107-114. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0009>

Kim, J. Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., & Fukui, Y. (2001). Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(1), 131-138.

Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82 E-Suppl, E14-23. [https://doi.org/10.2527/2004.8213\\_supplE14x](https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE14x)

Lazzari, G., Colleoni, S., Lagutina, I., Crotti, G., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Duchi, R., & Galli, C. (2010). Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology*, 73(6), 748-757. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.001>

Leal, G. R., Monteiro, C. A. S., Carvalheira, L. de R., & Souza-Fabjan, J. M. G. (2022). The Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) system in domestic animals : A systematic review. *Theriogenology*, 188, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.023>

Liu, X., Hu, T., Sun, W., Hao, H., Liu, Y., Zhao, X., Zhu, H., & Du, W. (2015). Comparison

of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. *Livestock Science*, 181, 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.009>

Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., & Boland, M. P. (2003). Oocyte and embryo quality : Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 38(4), 259-267. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>

Lucci, C. M., Kacinskis, M. A., Rumpf, R., & Bao, S. N. (2004). Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, 61(2-3), 461-472. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00226-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00226-7)

Martal, J. (2002). *L'embryon chez l'homme et l'animal Ed. 1*. Inra. <https://international.scholarvox.com/catalog/book/docid/45006980>

Matousek, M., Carati, C., Gannon, B., & Brannstrom, M. (2001). Novel method for intrafollicular pressure measurements in the rat ovary : Increased intrafollicular pressure after hCG stimulation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(2), 307-314. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210307>

McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>

McNatty, K. P., Reader, K., Smith, P., Heath, D. A., & Juengel, J. L. (2007). Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase : A 2006 perspective. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 64, 55-68. <https://doi.org/10.5661/rdr-vi-55>

Mermillod, P., Tomanek, M., Marchal, R., & Meijer, L. (2000). High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Molecular Reproduction and Development*, 55(1), 89-95. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200001\)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200001)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M)

Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. a. M., & Dieleman, S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651-674. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01246-3)

Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gerard, N., Mermillod, P., Monget, P., & Uzbekova, S. (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammiferes. *INRAE Productions Animales*, 22(2), 59-76. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2009.22.2.3335>

Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clément, F., Bosc, M., Pisselet, C., Monget, P., & Mariana, J. C. (1997). Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 51, 3-23.

Nagano, M., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2006). Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote (Cambridge, England)*, 14(1), 53-61. <https://doi.org/10.1017/S0967199406003510>

Nogueira, D., Ron-El, R., Friedler, S., Schachter, M., Raziel, A., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2006). Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biology of Reproduction*, 74(1), 177-184. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040485>

Nothias, J. Y., Majumder, S., Kaneko, K. J., & DePamphilis, M. L. (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(38), 22077-22080. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22077>

Orsi, N. M., & Reischl, J. B. (2007). Mammalian embryo co-culture : Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*, 67(3), 441-458. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.011>

- Park, J.-Y., Su, Y.-Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.-L. C., & Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5658), 682-684. <https://doi.org/10.1126/science.1092463>
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591-600. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90143-3)
- Pascottini, O. B., Catteeuw, M., Van Soom, A., & Opsomer, G. (2018). Holding immature bovine oocytes in a commercial embryo holding medium : High developmental competence for up to 10 h at room temperature. *Theriogenology*, 107, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.040>
- Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, T. A., & Taverne, M. A. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30(4), 751-762. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90310-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90310-x)
- Ponsart, C., Guyader-Joly, C., Le Guienne, B., Beaujean, N., Bourhis, D., Gérard, O., Mermillod, P., & Locatelli, Y. (2014). *Chapitre 30. Biotechnologies des gamètes et de l'embryon* (p. 800).
- Prates, E. G., Marques, C. C., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Carolino, N., Horta, A. E. M., Charneca, R., Nunes, J. T., & Pereira, R. M. (2013). Fat area and lipid droplet morphology of porcine oocytes during in vitro maturation with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and forskolin. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 7(4), 602-609. <https://doi.org/10.1017/S1751731112001899>
- Rienzi, L., Vajta, G., & Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF : A systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*, 17(1), 34-45. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq029>
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 4, 44-50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>
- Sirard, M.-A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>
- Sirois, J., & Fortune, J. E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, 39(2), 308-317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.2.308>
- Sirois, J., & Fortune, J. E. (1990). Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone : A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 127(2), 916-925. <https://doi.org/10.1210/endo-127-2-916>
- Stocco, D. M., & Clark, B. J. (1996). Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 51(3), 197-205. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)02093-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02093-4)
- Thibault, C., Dautier, L., & Wintenberger, S. (1954). Etude cytologique de la fécondation in vitro de l'oeuf de la lapine. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 148(9-10), 789-790.
- Uzbekova, S., Pollet, S., Salhab, M., Auclair, S., Tran, R., Mermillod, P., Ponsart, C., & Dupont, J. (2011). *Cumulus cells transcriptomics revealed the potential biomarkers of oocyte development competence and differences in signaling pathways during in vitro and in vivo maturation bovine*.
- Van Blerkom, J., Bell, H., & Weipz, D. (1990). Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16(4), 298-323.

<https://doi.org/10.1002/jemt.1060160404>

Wang, Y. S., Zhao, X., Su, J. M., An, Z. X., Xiong, X. R., Wang, L. J., Liu, J., Quan, F. S., Hua, S., & Zhang, Y. (2011). Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*, *124*(1-2), 48-54.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.015>

Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Optimization of in vitro bovine embryo production : Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, *57*(8), 2105-2117.

[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00696-9)

Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Leroy, J. L. M. R., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., & Peelman, L. J. (2005). Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, *63*(8), 2147-2163.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.054>

Zamberlam, G. D. O. (2013). *The involvement of nitric oxide in bovine follicular development and ovulation*. 152.

## Annexe n°1 : Composition du milieu emP3

### Section 2: Hazardous Identification

#### 2.1 Classification of The Substance/Mixture

This product does not meet the definition of a hazardous substance as defined by 29 CFR 1910.1200 and WHMIS 2015

#### 2.2 Adverse Physicochemical, Human Health and Environmental Effects

No additional information is available

### Section 3: Composition/ Information on Ingredients

Name	Product Identifier (CAS#)	WT%	GHS Hazard Classification
Purified Water	N/A	97%	Not classified
Bovine Serum Albumin	N/A	.55%	Not classified
Sodium Chloride	7647-14-5	.74%	Not classified

- Balance of other ingredients are less .5% in concentration (0.1 % for carcinogens, reproductive toxins, or respiratory sensitizers).
- The media contains material of direct animal origin of New Zealand, and have been imported in compliance with CFIA and USDA regulations and pose no risk to the user.

Partner Animal Health Inc., 14057 Ilderton Road, Ilderton, ON N0M 2A0  
Phone: (866) 690-4998 Fax: (866) 216-3335 [www.partneranimalhealth.com](http://www.partneranimalhealth.com)



**NOM : PELLET**

**PRÉNOM : Margaux**

## MATURATION *IN VITRO* D'OVOCYTES BOVINS : EFFET DE LA CONSERVATION DANS LE MILIEU EMP3

### **RÉSUMÉ :**

La production *in vitro* d'embryons chez les bovins nécessite la maturation *in vitro* d'ovocytes collectés par ponction folliculaire des ovaires, qui constitue une étape limitante de cette biotechnologie de la reproduction. Sur le terrain, cette technique peut nécessiter un temps de transport entre le site de collecte et le laboratoire. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de la conservation des complexes ovocytes-cumulus oophorus (COC) dans le milieu emp3. Les COC ont été conservés dans le milieu Emp3, à 22°C ou à 4°C, pendant 24h ou 12h, puis mis en maturation. La conservation des complexes cumulo-ovocytaires pendant 12h ou 24h à 22°C a entraîné un taux d'expansion de grade 3 satisfaisant. Le pourcentage d'ovocytes en métaphase II était diminué de 20 %. Ces conditions de conservation dans le milieu Emp3 pourraient donc permettre de faciliter les modalités d'expédition d'ovocytes tout en maintenant un rendement de maturation acceptable. La capacité de développement embryonnaire de ces ovocytes après fécondation *in vitro* reste à évaluer.

**MOTS CLÉS :** Maturation ovocyttaire, milieu emp3, Ovocyte, Vache, Reproduction assistée

---

## *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES: EFFECT OF STORAGE IN THE EMP3 MEDIUM

### **SUMMARY:**

The *in vitro* production of embryos in cattle requires the *in vitro* maturation of oocytes collected by follicular puncture of the ovaries, which constitutes a limiting step in this reproduction biotechnology. In the field, this technique may require travel time between the collection site and the laboratory. The objective of this study was to evaluate the effect of storage of oocyte-cumulus oophorus complexes (COC) in emp3 medium. The COCs were stored in the Emp3 medium, at 22° C. or at 4° C., for 24 h or 12 h, and then put into maturation. The storage of the cumulo-oocyte complexes for 12h or 24h at 22°C led to an acceptable rate of grade 3 expansion. The percentage of oocytes in metaphase II was reduced by 20%. These storage conditions in the Emp3 medium could therefore facilitate the methods of shipping oocytes while maintaining an acceptable maturation rate. The capacity for embryonic development of these oocytes after *in vitro* fertilization remains to be assessed.

**KEY WORDS:** Oocyte maturation, emp3, Oocyte, Cow, Assisted reproduction