



891THV-2

République Algérienne Dém

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Blida 1

Institut Des Sciences Vétérinaires



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

Thème :

Maitrise du processus de Production d'embryons in-
vivo (Suivi de la cyclicité, Superovulation, Récolte et
congélation)

PRESENTE PAR :

Mr. FRANS ALUGONGO

Mlle. AUGUSTE SHIGWEDHA

Devant le jury composé de :

Kaidi R.

Professeur

Président

Kelanemer

M.C.B

Examineur

Adel D.

M.A.A

Promoteur

Année Universitaire : 2013 -2014

REMERCIEMENT

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a accordé la sante, le courage et la patience pour que on puisse accomplir ce modeste travail.

Nos sincères remerciements s'adressent particulièrement à Dr ADEL DJALLEL, promoteur de ce travail pour nous avoir aidé à l'approche scientifique et critique des travaux de recherche et de nous avoir fait bénéficier de son expérience, de sa rigueur et de sa disponibilité sans limite.

Nous remercions également Prof KAIDI RACHID d'avoir accepté de présider, les membres du jury, ainsi qu'au docteur Dr KELANEMER d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Aux professeurs de l'institut des Sciences Vétérinaire, merci pour votre gentillesse et pour avoir partagés vos connaissances avec nous durant tous les cinq ans de .notre formation.

Et tous ceux qui nous ont aidé de loin ou de près.

Dédicaces :

A ma tante Dr Helvis Isaacs, pour m'avoir soutenue, pour ta confiance infinie, ta patience et ton amour, merci infiniment. Sans oublier ma famille pour ton soutien : merci je vous en serai toujours reconnaissante.

A mes cousins pour m'avoir toujours faire rire, vous êtes les meilleurs et je vous aime fort.

A mes sœurs, Monica, Loide, Cristofina, merci pour tous vos efforts et sacrifices que vous avez fait pour moi.

A mes collègues Namibiens de promo 2008 et à tous mes amis de près et de loin. Thank you guys for always being there for me, for your support, you guys are the best and this is for us.

A mes copains de promotion et amis de L'institut des Sciences Vétérinaires de Blida. Merci pour les bons moments inoubliables qu'on a partagés au cours de notre formation.

- *Auguste Shigwedha*

DEDICACES:

To my dearly parents “Rev. Malakia Alugongo and Mrs. Saima Unyemba “, you are saints, I know I would not made such a big step in my life without your unwavering faith in me, your constant support and prayers. Without your sacrifices, I would not gain good education, therefore, thank you for being there for me since my childhood.

To my adorable brothers, sisters, cousins, nieces and entire family members, you have been wonderful.

To likela's, Nandago's family and HAME group your assistance you offered me, I valuable them most significant.

To my fellow classmates and friends Institute of Veterinary Science in Blida your generosity toward a brother is marked. Hence, may Almighty Lord bless you all!!

- *Frans Alugongo*

LIST DES ABRÉVIATIONS

FSH: Follicule Stimulating Hormone

pFSH: Follicule Stimulating Hormone d'origine porcine

GNRH: Gonadotropine releasing Hormone

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropine

CJ: Corps Jaune

PBS: Phosphate Buffered Solution

PGF2 Alpha: Prostaglandine F2 Alpha

LH: Hormone Lutéinisante

ml: Millimètre

cm : centimètre

DMSO : DiMethylSulfOxyde

°C : Degrée Celsius

IA : Insémination artificielle

ONF : Ovocyte non-fécondé

IETS : International Embryon Transfer Society

PVP: Polyvinylpyrrolidone

hCG: Human Chorion Gonadotropine

cc: centrimetre cubique

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1

h: heures

Résume :

Les applications de Transfert embryonnaire bovine sont nombreuses dans le domaine de la recherche mais son rôle économique se situe dans les programmes de sélection bovine et l'amplification de taux de reproduction des femelles à haute performances aboutissant donc à la satisfaction des objectifs financier ainsi que génétique.

Le transport international des embryons est devenu possible grâce au progrès de la congélation – décongélation. Notre étude vise à maîtriser le processus de production d'embryon in vivo (suivi de la cyclicité, superovulation et récolte) puis congelés les meilleurs embryons et les transférer. Deux Protocoles de super ovulation ont été utilisés dans cette étude sur un effectif de 5 vaches donneuses; le protocole 1 à 8 injections d'FSH (Stimufol 20 %) et Protocole 2 à 3 injection d' FSH (Stimufol 20%). Dans les deux protocoles, le traitement de superovulation a été entamé à J10 post chaleur de référence. Les vaches ont présenté les chaleurs de superovulation en moyenne de 48 h post PG avec une moyenne de CJ et d'embryons récoltés de 11 corps jaune par vache et 2.2 embryons par vache respectivement. Dix embryons utilisables (congelables et transférables) sont obtenus, que nous avons congelés par la suite utilisant l'éthylène glycol comme cryoprotecteur et congelés dans l'azote liquide.

Mots Clé : superovulation, congélation, décongélation, protocole, cryoprotecteur

Abstract

The applications of bovine embryo transfer are multiple in the area of research but its economic role lies in bovine selection programs and amplifications of the reproduction rate of high performing females leading to financial as well as genetic satisfaction.

International transport of embryos became possible due to the development of freeze – thaw procedures. The aim of our study is to master the process of producing embryo in vivo (estrus monitoring, superovulation, embryo flushing) then freeze the best embryos and transfer.

Two superovulation protocols were used in this study on 5 donner cows. In protocol 1, eight injections of FSH (Stimufol 20 %) were given and in protocol 2, three injections of FSH (Stimufol 20 %) were given. For both protocols, the superovulation treatment was initiated on the 10th day after reference heat. The mean interval of the onset of estrus after administration of PG is 54 h with an average number of 11 corpus luteum and 11 embryos obtained per cow. Ten freezable and transferable embryos were obtained and frozen in liquid nitrogen using ethylene glycol as the cryoprotector.

Keywords: Superovulation, Freeze, Thaw, Protocol, Cryoprotector

ملخص

إن تطبيق تحويل أجنة البقر عديدة في المجال العلمي و لكن هدفها الاقتصادي يكمن في برنامج انتقاء الأبقار و تضخيم معدل الإنتاجية لدي البقرة عالية الإنتاج, تؤدي إذن إلي إرضاء الأهداف التمويلية و الوراثية.

النقل الدولي للأجنة أصبح ممكن بفضل تحسين عملية التجميد و التدوير. دراستنا تهدف إلي ضبط عملية إنتاج الأجنة في الجسم الحي (متابعة الدورية, فرط الاباضة و الحصاد), ثم تجميد أحسن الأجنة و نقلها.

بروتوكولين لإفراط الاباضة استعملنا في هذه الدراسة علي عدد يتكون من 5 أبقار متبرعات: بروتوكول من 1 إلي 8 حقن FSH(stimufol 20%) و بروتوكول من 2 إلي 3 حقن FSH(stimufol 20%).

في البروتوكولين, علاج إفراط الاباضة يباشر في J 10 ما بعد ظهور علامة السخانة المرجعية. الأبقار تبين حرارة إفراط الاباضة بمعدل 48 ساعة بعد PG مع معدل جسم اصفر و أجنة محصودة ب 11 جسم اصفر للبقرة و 2.2 جنين للبقرة علي التوالي.

تم الحصول علي 10 أجنة قابلة للاستخدام (قابلة للتجميد و التحويل) و استعملنا الاثنول جليكول مثل Cryoprotecteur و التجميد في الازوت السائل.

الكلمات الرئيسية: إفراط الاباضة, التجميد, الذوبان, البروتوكول, Cryoprotecteur.

LISTE DE FIGURE

Figure N° 1 : Structure anatomique de l'appareil génitale femelle (*UNCEIA, 2010*)

Figure N° 2 : Régulation hormonales du cycle sexuel chez la vache (*INRAP ,1988*)

Figure N° 3 : Traitement de superovulation au moyen de FSH/LH

Figure N° 4 : Traitement de superovulation au moyen d'un implant

Figure N° 5 : Structure d'un ovaire superovulé

Figure N° 6 : Insémination Artificielle chez la vache

Figure N° 7 : Chronologie du développement embryonnaire (J0 à J9), *WINTERBERGER-TOMES ET SEVELLEC, 1987*

Figure N° 8 : Positionnement de la sonde de type Folley lors du lavage utérine

Figure N° 9 : Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant la congélation, contenant de l'éthylène glycol d'après *VOELKEL ET AL. (1992)*

Figure N° 10 : La procédure du refroidissement des embryons

Figure N° 11 : Procédure de vitrification et décongélation des embryons, *PROF CH. HANZEN, 2004/2005*)

Figure N° 12 : Nombre d'embryons récoltes

Liste de Tableau :

Tableau N° 1 : Classification des embryons selon la qualité

Tableau N° 2 : Taux de gestation et qualité d'embryons, d'après *Hasler et al. (2001)*.

Tableau N° 3 : Classification des embryons selon le stade de développement

Tableau N° 4 : Les vaches donneuses utilisées en expérimentation

Tableau N° 5 : Hiérarchie des signes d'œstrus d'après *F van Eerdenburg, 2003*

Tableau N° 6: Protocole de superovulation à 8 injections de FSH/LH

Tableau N° 7 : Protocole de superovulation à 3 injections

Tableau N° 8 : Comparaison de venu en chaleurs de deux protocoles

Tableau N° 9 : La réaction ovarienne des deux protocoles

Tableau N° 10 : Résultat de la récolte embryonnaire

Tableau N° 11 : Résultats du classement des embryons

Tableau N° 12 : Comparaison des paramètres de deux protocoles

Tableau N° 13: Les embryons congelés

Liste des Photos

Photo N° 1 : Station Expérimentale de l'institut des Sciences Vétérinaires

Photo N° 2 : Médicaments et Milieux

Photo N° 3: Matériels de la récolte embryonnaire

Photo N° 4 : Matériels de recherche des embryons

Photo N° 5 Matériels de congélation

Phot N° 6 : Jeunes blastocystes

Photo N° 7 : Ovocytes non-fécondés

Photo N° 8 : Embryon au stade morula

Photo N° 9 : Embryon dégénéré

Introduction

Le transfert d'embryons est au point dans l'espèce bovine depuis une trentaine d'années. A cette époque, la récolte et le transfert des embryons collectés se faisaient par voie chirurgicale. Aujourd'hui, ces opérations ont lieu par voie transcervicale et plus de la moitié des embryons collectés est congelée pour un transfert ultérieur (*Hasler, 2004*).

Un transfert d'embryons consiste à prélever des embryons produits sur une vache donneuse et à les transférer chez des receveuses qui mèneront les gestations à leur terme. Toutefois, la mise en place de la gestation chez les vaches receveuses reste toujours variable. Cela peut être le résultat de facteur embryonnaires, maternel ou de l'environnement ou bien une combinaison de ces facteurs. Les donneuses d'embryons subissent généralement un traitement de superovulation, ce qui permet d'obtenir de l'ovulation de plusieurs ovocytes simultanément.

Une insémination artificielle est alors réalisée sur ces femelles et une semaine plus tard, la récolte d'embryons au stade morula ou blastocyste peut avoir lieu. Ces embryons sont ensuite soit réimplantés directement (transfert en frais) sur des receveuses dont le cycle sexuel a été synchronisé avec celui des donneuses, soit congelés dans de l'azote liquide pour une utilisation ultérieure.

L'intérêt de transfert embryonnaire bovin est d'amplifier le taux de reproduction des femelles d'élite et permettre la diffusion du progrès génétique. L'insémination artificielle a permis d'avoir un grand nombre de descendants du même mâle, mais on ne pouvait avoir plus d'un descendant d'une femelle par campagne de reproduction. C'est ce qu'a permis le transfert embryonnaire : augmenter par unité de temps le nombre de descendants d'une même femelle

Pour l'éleveur, le transfert d'embryons présente plusieurs avantages : il peut à la fois accélérer le progrès génétique du troupeau et commercialiser les produits de ce progrès en conservant le potentiel génétique dans son élevage.

Dans la partie bibliographique nous avons présenté l'historique, l'intérêt de transfert embryonnaire ainsi que les étapes impliquées dans le processus de transfert d'embryon.

Dans la deuxième partie, nous présenterons une étude empirique basée sur l'expérimentation qui s'est déroulée au niveau de la station expérimentale de l'université de blida1.elle a été entamée durant le mois de novembre 2013 jusqu'à juin 2014.

Tableau Des Matières

REMERCEMENTS	
DEDICACES	
RESUME	
LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION	

Partie Bibliographie

CHAPITRE 1 : RAPPEL DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR D'UNE VACHE	1
1.1 Ovaires	2
1.2 Utérus	3
1.3 Les Oviductes	5
1.4 Vagin	5
1.5 Vulve	6
CHAPITRE 2 : RAPPELS PHYSIOLOGIQUE	8
2.1 Les Hormones De La Reproduction	8
2.1.1 La GNRH: Gonadotropine Releasing Hormone	8
2.1.2 FSH (Follicule Stimulating Hormone)	8
2.1.3 LH (Lutéinisante Hormone)	8
2.1.4 Œstrogène	8
2.1.5 La Progestérone	9
2.1.6 La Prostaglandine	9
2.1.7 Ocytocine	9
2.2 Le Cycle Œstrale	9
2.2.1 Proestrus	10
2.2.2 Œstrus	10
2.2.3 Metoestrale	11
2.2.4 Dioestrale	11
2.3 Régulation Du Cycle Œstral	12
2.4 Notion Des Vague Folliculaire	14
2.4.1 Recrutement	14
2.4.2 Sélection	14
2.4.3 Dominance	14
2.4.4 Atrésie Folliculaire	15

CHAPITRE 3 : TRANSFERT EMBRYONNAIRE.....	17
3.1 Historique	17
3.2 Quelques Intérêt De La Transférant Embryonnaires.....	17
3.3 La Sélection Des Animaux.....	18
3.3.1 Critères Des Donneuses	18
3.3.2 Critères Des Donneuses.....	20
3.4 Préparation Des Vaches Donneuses Et Receveuses.....	21
3.4.1 Superovulation Des Donneuses.....	21
3.4.2 Hormones Utilises.....	21
3.4.3 Synchronisation Des Receveuses.....	24
3.4.4 Artificiel Insémination Des Vaches Donneuses.....	25
3.4.5 Facteurs De Variation De La Superovulation.....	26
3.5 Récolte D'embryons.....	27
3.5.1 Méthode De Récolte.....	29
3.5.1.1 Méthode Chirurgicale.....	29
3.5.1.2 Méthode Non-Chirurgicale.....	30
3.5.2 Méthode De Lavage Utérine.....	30
3.5.2.1 Méthode Continu.....	30
3.5.2.2 Méthode Interrompu.....	31
3.6 Traitement Post – Récolte.....	31
3.7 Examen Et Evaluation Des Embryons	32
3.8 Influence De La Qualité Sur La Réussite Du Transfert	34
3.9 Facteurs De Variations Sur La Récolte.....	36
3.10 Conservation Des Embryons	37
3.10.1 Le Cryoconservation.....	37
3.10.2 Les Technique De Cryoconservation.....	38
3.10.2.1 La Congélation Conventionnelle Lente.....	38
3.10.2.2 Mise En Congélation.....	40
3.10.3 Vitrification Et Vitrification Ultra Rapide.....	42
3.11 Decongélation.....	45
3.11.1 Decongélation Lente (Or Multistep Thawing).....	45
3.11.2 Decongélation Rapide (Or One-Step Thawing).....	45
3.12 Transfert D'embryon.....	46

Partie Expérimentale

1. INTRODUCTION.....	48
2. OBJECTIF.....	48
3. MATERIELS ET METHODE.....	48
3.1 Matériels.....	48
3.1.1 Animaux.....	48
3.1.2 Médicaments Et Milieux.....	49
3.1.3 Matériels D'insémination Et Récolte.....	50
3.1.4 Matériels De Recherches.....	51
3.1.5 Matériels De Congélation	51
3.2 Méthode.....	52
3.2.1 Suivi De La Cyclicité.....	52
3.2.2 Superovulation.....	52
3.2.3 La Récolte D'embryons.....	53
3.2.4 La Congélation Des Embryons.....	54
4. RESULTATS.....	55
4.1 Venu En Chaleurs De Superovulation.....	55
4.2 Réaction Ovarienne.....	55
4.3 Résultats De La Récolte.....	56
4.4 Congélation.....	58
5. DISCUSSION.....	59
CONCLUSION	
RECOMMANDATIONS	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIE	

CHAPITRE 1 : RAPPEL DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR D'UNE VACHE

L'appareil génitale femelle est l'ensemble des organes qui élaborent les gamètes femelles et les hormones sexuelles, qui sont le siège de la fécondation et qui assurent le développement de l'œuf au cours de la gestation (voire Figure 1). Il est situé en position pelvi-abdominale

Généralement, cet appareil est constitué de trois grandes portions :

- Une portion glandulaire constituée par l'ovaire
- Les voies génitales ;
- Uro-génitales

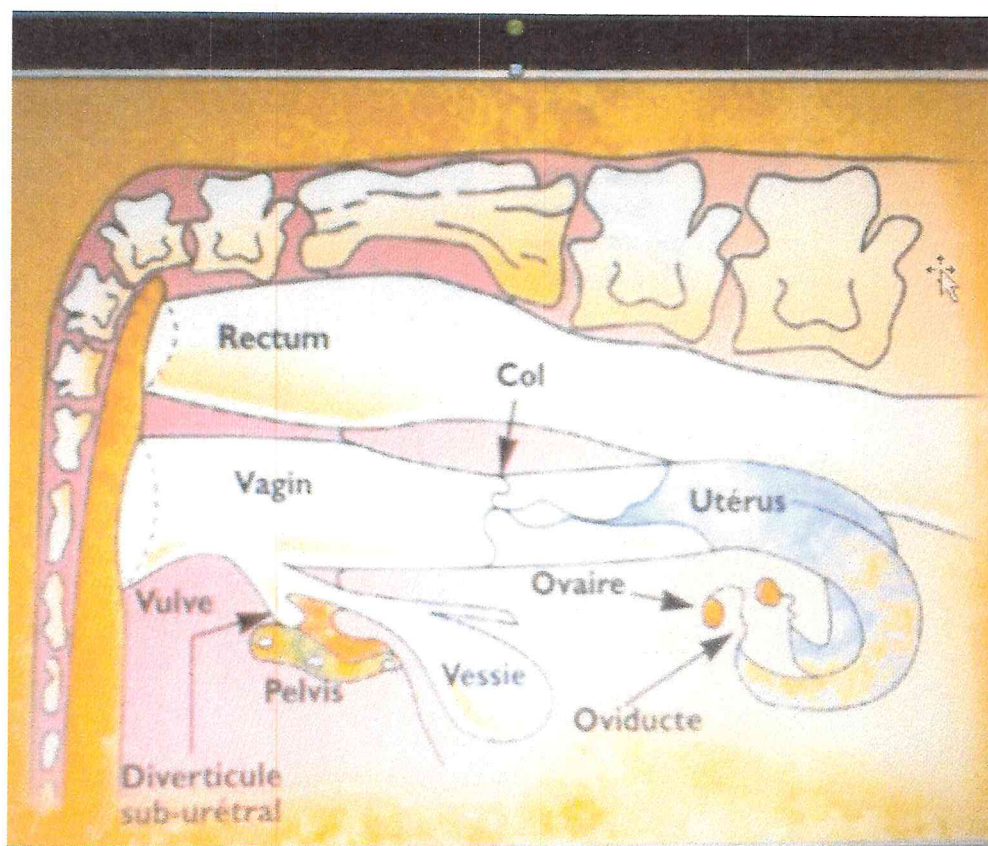


Figure1 : Structure anatomique de l'appareil génitale femelle (UNCEIA, 2010)

1.1 OVAIRES

Les deux ovaires se trouvent de chaque côté à une largeur de main de la ligne médiane dans le secteur du plancher pelvien au bord antérieur du ligament large de l'utérus.

L'ovaire est un organe primaire de la reproduction chez les femelles. Comme chez les plupart des primates, elles sont en nombres de deux chez les vaches. Les ovaires des vaches sont en forme d'amande, aplati de volume de noix. Il mesure 4 cm de longueur, 2 cm de largeur et 1.5 cm d'épaisseur avec un poids de 10 -20 grams. Il a un aspect brillant et sont de couleur gris-rosé. Toutes ces dimensions varient avec le stade de la reproduction et la période du cycle œstrale.

A leur surface on peut parfois palper des follicules - selon l'état de fonctionnement des ovaires - des corps jaunes (corpus luteum) ((en latin = corpus luteum au singulier ou corpora lutea au pluriel)), des résidus de corps jaunes ou des kystes. Les follicules et le pavillon, lequel sert à recueillir l'ovule au moment de l'ovulation, sont constitués de tissus très délicats. Chez les animaux en bonne santé, il est formellement déconseillé de palper les ovaires lors de l'insémination. Par ce geste, l'ovulation et la "descente" de l'ovule expulsé peuvent être considérablement perturbées. L'appréciation de l'état des ovaires suppose une grande expérience. En présence de cycle irrégulier (suspicion de kyste, etc.), l'examen des ovaires est donc du ressort du vétérinaire.

Malgré que les ovaires sont très mobiles, ils sont mis en place par de différentes structures, ligament large proche de l'oviducte qui lie sur les extrémités de cornes utérines, les ligaments propre de l'ovaire, ligaments infundibulo-ovarique, péritoine en formant le méso-ovarium. L'ovaire contient deux zones :

- Zone corticale : Constituée par un tissu conjonctif «stroma ovarien», se densifie sous l'épithélium pour former l'albuginée.
- Zone médullaire : Située au centre de l'ovaire, constituée par un tissu conjonctif qui, au niveau du hile, est en continuité avec le ligament large. Elle assure la pénétration et la ramification des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques (INRA, 1988).

L'irrigation de l'ovaire est assurée par l'artère ovarique issue de la partie caudale de l'aorte abdominale. Elle délègue avant d'atteindre l'ovaire une petite branche utérine. Au terme de nombreuses ramifications, elle atteint le hile de l'ovaire au travers du mesovarium.

On précisera la coexistence étroite entre la veine utérine d'une part et l'artère ovarique d'autre part. Ce plexus est directement impliqué dans la régulation du cycle, la prostaglandine F2alpha passant chez la vache directement de la veine utérine dans l'artère ovarienne.

1.2 TUBES UTERINES ET UTERUS

Communément aussi appelée "matrice", l'utérus est l'organe de la gestation, en assurant l'implantation et développement embryonnaire et la parturition. C'est un organe creux, il se compose de deux cornes, d'un corps et d'un col. Il est de type bipartites chez les bovins les deux cornes étant unifiées caudalement sur une petite portion ou corps utérine.

La paroi de l'utérus se compose de trois tuniques ; une séreuse, une musculuse et une muqueuse ou endomètre. Le périmètre se prolonge sur les ligaments larges .Le myomètre se compose en fait de trois couches ; une superficielle longitudinale, une moyenne renfermant le un important plexus vasculaire et une profonde de type circulaire.

Ces couches se prolongent au niveau du corps et du col mais relativement peu au niveau du vagin.

L'endomètre comporte un épithélium simple à cellule ciliée et non ciliées de type sécrétoire et une propria épaisse aussi qualifiée de stroma endométrial présentant comme l''epithelium des grandes variations au cours du cycle. L'épaisseur et l'œdème de la propria diminuent au cours de la phase progestronique du cycle et augmentent au cours de la phase ostrogénique. Cela contribue avec et surtout les contractions myométriales à rendre l'utérus plus tonique en phase œstrale. Le développement glandulaire au niveau de l'endomètre suit une évolution inverse. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques de l'endomètre s'accroissent beaucoup au cours de l'œstrus et du metoestrus.

Un liquide interstitiel envahit alors la couche profonde de l'endomètre qui devient œdémateuse. Parfois les capillaires se rompent et des suffusions sanguines apparaissent. Elles sont éliminées avec le mucus.

Au niveau du col, la muqueuse est très différent de l'endomètre proprement dit, plus mince dépourvue de glandes, elle ne présent que peu de modifications au cours du cycle ; le col ne renferme chez la vache que peu de fibres musculaires. Sa consistance fibreuse tirant son origine de l'abondance de tissu fibreux.

Les cornes utérines et le corps utérin sont fixés à la paroi dorsale de l'abdomen et du bassin par les ligaments larges. Constituée de deux lames péritonéales conjonctives, ils renferment également une importante vascularisation et des fibres élastiques impliquées dans le déplacement de l'utérus en fin de gestation voir dans certaines anomalies topographiques.

L'irrigation de l'utérus est assurée par l'artère utérine qui naît de l'artère iliaque interne. Cette irrigation se trouve complétée par une branche de l'artère vaginale (irrigation de col et du corps utérin) et accessoirement d'une branche de l'artère ovarique.

En cours de gestation se développe sur les cotes du vagin une anse intrapelvienne (rameau caudale de l'artère utérine), portion vaginale de l'artère utérine, particulièrement mobile qui devient frémissante (thrill) à partir du 4^{ème} mois de gestation. L'innervation est surtout assurée par des fibres sympathiques voire parasympathiques.

- Col utérine (cervix) : c'est une structure longue qui peut mesurer de longueur de 5 à 10 cm et 2,5 à 5 cm de diamètre. Il est étroit, consistant dur avec une paroi ferme et épaisse qui débute dans le vagin. Il présente une muqueuse plissée formant généralement trois anneaux, avec au centre le canal utérin. Il est composé de tissu et muscle dense pour assurer un accès au corps de l'utérus.

Cette structure joue des fonctions importantes, tel que pendant l'insémination artificielle, il évite les mouvements inverses des spermatozoïdes ou les blastocystes en cas de transfert embryonnaires en utilisant la méthode non-chirurgicale. Le col est muni de la glande Bartholin qui est responsable de la sécrétion de fluide de la lubrification de cervix en aidant la progression de la spermatozoïdes et protection du corps de l'utérus contre les corps étrangers.

- Le corps utérin : c'est une structure courte, mesurant de 2 à 3 cm de longueur et il s'ouvre sur les deux cornes utérines. Il s'attache au ligament large et suspendu dans la cavité pelvienne. L'utérus comporte une muqueuse (l'endomètre richement vascularisé, supportant 100 à 120 caroncules qui donneront les cotylédons), une musculature (le myomètre constitué de 3 couches de muscles lisses). C'est dans l'utérus où se développe le placenta pour nourrir et protéger l'embryon.
- Cornes utérines : Les cornes chez l'espèce bovine sont longues et recourbées vers le bas effilées à leurs extrémités antérieures, elles sont soudées sur une certaine étendue

de leur partie postérieure. Les cornes font de 25 à 40 cm de long et de 3 à 4 cm de diamètre.

1.2 LES OVIDUCTES

Les oviductes se situent en prolongement des cornes utérines. A chaque ovaire correspond un oviducte plus ou moins flexueux, situé sur le bord du ligament large. Leur longueur varie de 15 à 25 cm avec le diamètre de 1 à 2 mm. En essayant de fouille rectale (toucher rectal), oviductes sont impalpables. Il débute par « pavillon » ou « infundibulum » indépendant de l'ovaire, qui a la forme d'un entonnoir s'ouvrant dans la bourse ovarique et pourras s'appliquer contre le bord libre de l'ovaire pour recueillir les gamètes femelles lors de l'ovulation.

Le conduit lui-même comprend trois parties :

- **L'ampoule** : Lieu de fécondation qui se fait au mois 12 heures après l'ovulation.
- **Isthme** : il serve la fonction de la
- **Jonction utero-tubaire** : Zone de jonction entre l'oviducte et la corne utérine correspondante.

Les oviductes serve une fonction très important de la reproduction ce où effectue la fécondation, plus précisément dans l'ampoule. En plus, il assure le développement précoce de l'embryon après la fécondation s'effectue dans cet organe. Il aider aussi dans la transportation des spermatozoïdes et ovules a cause le leur épithélium cilié and leur contraction.

1.3 VAGIN

Vagin est un tube de forme cylindrique de 25 à 30 cm de longueur qui se trouve dans la cavité pelvienne. Il est en rapport en haut avec le rectum, en bas avec la vessie et le canal de l'urètre, latéralement avec les coxaux. Il se délimite par le col de l'utérus (cervix). Pour des raisons physiologiques, les parois du vagin se touchent, ce qui signifie qu'il n'y a pas de cavité. Le vagin n'est pas non plus étiré au maximum dans le sens de sa longueur et voilà pourquoi il présente des muqueuses plieuses. De chaque cote du plancheur, le vagin présente les canaux de Gaertner qui s'ouvrant dans la vulve au voisinage de méat urinaire. Jusqu'au la puberté il y a une persistance de l'hymen qui délimite le vagin et vulve. Le vagin est un

organe de l'accouplement. L'irrigation est assurée par l'artère vaginale et l'innervation sympathique est assurée par le nerf hypogastrique et l'innervation parasympathique par les nerfs sacraux.

1.5 VULVE

La cavité vulvaire constitue le vestibule commun aux voies génitale et urinaire. Elle est assez bien délimitée de la cavité vaginale au niveau du plancher du vagin, par un repli muqueux transversal qui représente la trace de l'hymen. Elle occupe la partie ventrale du périnée. Elle est constituée de deux lèvres qui délimitent la fente vulvaire. Les deux lèvres se raccordent sur deux commissures, l'une dorsale séparée de l'anus par ce que l'on appelait avant le " périnée gynécologique " et l'autre ventrale plus épaisse et saillante située ventralement par rapport au bord postérieur de l'arcade ischiatique. C'est au niveau de cette commissure ventrale que se trouve située sous un repli de la muqueuse le clitoris et son muscle rétracteur. Les lèvres de la vulve sont épaisses, revêtues extérieurement d'une peau peu ridée, pourvue de poils fins et courts et de nombreuses et fortes glandes sébacées qui ont sur les coupes une teinte jaunâtre.

Chaque lèvre de la vulve comporte une partie cutanée externe, une partie muqueuse interne et un muscle constricteur responsable de la coaptation parfaite des lèvres vulvaires. L'irrigation de la vulve est assurée par des branches de l'artère honteuse externe et son innervation provient principalement des nerfs honteux.

CHAPITRE 2. RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

2.1. LES HORMONES DE LA REPRODUCTION :

2.1.1. La GnRH: Gonadotropine Releasing Hormone

La GnRH est l'initiateur et le régulateur fondamental de la fonction reproductrice chez les mammifères. C'est un Peptide synthétisé et libéré par les neurones de l'hypothalamus. La GnRH est transportée par le système porte hypophysaire vers le lobe antérieur de l'hypophyse, une fois arrivée au niveau hypophysaire, la GnRH provoque la sécrétion et libération des gonadotrophines : Follicule Stimulating Hormone (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (THIBAULT, 1994).

2.1.2 FSH (Follicule Stimulating Hormone)

Follicule Stimulating Hormone est une glycoprotéine synthétisée par l'antéhypophyse. Elle :

- Contrôle le développement de l'ovaire et la croissance folliculaire.
- Stimule la multiplication des cellules de granulosa et la formation de l'antrum.
- Stimule la synthèse des œstrogènes par les follicules.
- Prépare l'action de LH par la synthèse de récepteur de cette dernière (INRA, 1988).

2.1.3. LH (Lutéinisante hormone)

L'hormone lutéinisante est une glycoprotéine sécrétée par l'antéhypophyse, elle :

- contrôle la maturation finale des follicules avec FSH
- provoque l'ovulation.
- induit la formation des corps jaunes et la synthèse de progestérone

2.1.4. Œstrogènes

Etymologiquement, estrogène signifie « qui engendre l'œstrus » ; sécrétés essentiellement par les follicules de l'ovaire, ont pour rôle primordial de provoquer l'œstrus ou chaleur, comportement spécifique de la femelle qui s'immobilise au chevauchement.

Sur la production de GnRH, LH, FSH, les œstrogènes à faible dose exercent un rétrocontrôle négatif et à forte dose provoque un rétrocontrôle positif (INRAP, 1988).

2.1.5. La progestérone

Elle représente le facteur indispensable à l'établissement de la gravité, elle :

- stimule l'activité sécrétoire de l'endomètre.
- diminue la tonicité du myomètre et sa sensibilité à l'ocytocine.
- inhibe de nouvelles maturations ovulaires en bloquant la fonction hypothalamo-hypophysaire (DERIVAUX, 1980).

2.1.6. La Prostaglandine

Les Prostaglandines sont un ensemble de molécules de nature lipidique, elles doivent leur nom au fait qu'elles ont été isolées pour la première fois dans la prostate. La plus importante d'entre elles pour la reproduction est $\text{PGF}_2\alpha$ (INRA, 1988). Elles déclenchent la régression du CJ ou lutéolyse. Les $\text{PGF}_2\alpha$, sont alors essentiellement d'origine utérine. Elles déclenchent et entretiennent les contractions du myomètre au moment de la mise bas.

2.1.7 Ocytocine

C'est une hormone protidique synthétisée par l'hypothalamus et stockée dans la posthypophyse. Elle provoque la contraction du myomètre et des muscles lisses au moment de la mise bas et des cellules myoépithéliales de la mamelle lors d'éjection de lait (INRAP, 1988).

2.2. LE CYCLE ŒSTRAL

La vache est une espèce poly estrienne à cycle œstral continu dont la durée est de 20 à 21 jours, il est généralement plus court chez la génisse que chez les pluripares. Le cycle œstral est divisé en deux grandes phases.

- Phase folliculaire : cette phase est caractérisée par le développement du follicule ovulatoire, ovulation et le conditionnement de la femelle la rendant apte à recevoir la semence du mâle, à activer les spermatozoïdes et à diriger ceux-ci vers le site de fécondation. En plus de cette division, la phase folliculaire est subdivisée en 2 phases :

2.2.1. Proestrus :

Correspond au développement sur l'ovaire d'un ou plusieurs follicules et à la sécrétion croissante d'œstrogène. Il débute vers le 17^{ème} jour et il est nettement arqué au 19^{ème} jour (DERIVAUX ,1980). Au cours de cette phase, l'épithélium de l'endomètre s'épaissit, se vascularisé et se garnit d'abondantes glandes tubulaires, relâchement du col utérin, production du mucus par les cellules cervicales, vaginales et les glandes de l'utérus. Le mucus est habituellement fin et clair (SOLTNER, 1993).

2.2.2. Œstrus (Chaleur)

Correspond à la maturation du follicule et à la sécrétion maximale d'œstrogène (SOLTNER, 1993).

Elle est de courte durée, en moyenne de 14 à 15 heures maximums de 24 heures. C'est la période d'acceptation du mâle ; elle est suivie de la ponte ovulatoire, caractérisée par des écoulements de consistance fluide, le vagin et la vulve sont congestionnés et tuméfiés (DERIVAUX ,1980).

Œstrus constitue un point culminant de la phase folliculaire, signalant l'ovulation éminente, c'est -à dire la libération de l'ovocyte du follicule ovulatoire en vue de la fécondation. Aux contrairement aux autres ruminants, chez les vache l'ovulation s'effectue le jour suivant la cessation de comportements d'œstrus.

Pendant le pro- œstrus et surtout l'œstrus, la paroi musculaire de l'utérus est parcourue de contractions qui deviennent maximales sitôt l'ovulation, ces contractions ont pour but de favoriser la remontée éventuelle des spermatozoïdes (SOLTNER ,1993).

Après l'ovulation, débute la phase lutéale où le follicule ovulatoire se transforme en corps jaune produisant de la progestérone. Comme le nom indique, la progestérone est l'hormone qui prépare à la gestation. Durant la phase lutéale, la progestérone crée des conditions convenables pour l'utérus à assurer le développement de l'embryon en stimulant la croissance des glandes utérines ainsi que leur sécrétions et en inhibant les contractions du myomètre. Progestérone empêche aussi toute nouvelle ovulation en inhibant la libération de la GnRH et la production du pic ovulatoire de la LH/FSH.

2.2.3 Le Met œstrus

Caractérisé par la formation du corps jaune et la sécrétion croissante de progestérone. Il dure en moyenne 3 à 4 jours. Leur premier jour correspond à la lutéogenèse, c'est-à-dire la transformation du follicule ovulatoire en corps jaune hémorragique. L'action de la progestérone accentue les modifications utérines dues à l'œstradiol, la muqueuse de l'endomètre se développe au maximum. Quand le col se ferme, le mucus cervical s'épaissit et ne coule plus. A mesure que la progestérone prédomine sur les œstrogènes les contractions de l'utérus se calment, et disparaissent en fin de période, condition nécessaire pour l'éventuelle nidation de l'embryon (SOLTNER, 1993).

2.2.4 Di - Œstrus

On parle dans cette phase d'activité du corps jaune entre le 6^{ème} et 17^{ème} jour. Cette phase correspond à la lutéotrophie, c'est-à-dire la période où le corps jaune est mature et maintenant des niveaux élevés de progestérone. Les sécrétions vaginales sont épaisses et visqueuses et le col est toujours fermé

Si la vache n'est pas gestante il doit y avoir un mécanisme qui provoque la cessation de la phase lutéale par induction de la lutéolyse et le retour d'une nouvelle phase folliculaire. Voilà pourquoi le mécanisme de la lutéolyse est mis en action automatiquement autour des jours 15 à 17. C'est la présence de l'embryon qui empêche le déclenchement de la lutéolyse et permet le maintien du corps jaune à partir du jour 17.

Durant cette phase, il y a une transformation de corps jaune hémorragique en Corps jaune fonctionnelle avant la destruction du corps jaune par l'action de prostaglandines (PGF₂) qui était stimulée avant par l'ocytocine.

La chute de sécrétion de progestérone par le corps jaune est accentuée en fin de cycle par une décharge de prostaglandine PGF₂ α sécrétée par l'utérus (SOLTNER, 1993).

2.3. REGULATION DU CYCLE ŒSTRAL :

Les hormones hypophysaires et ovariennes interagissent les unes avec les autres sous le contrôle de l'hypothalamus assurant ainsi la régulation du cycle sexuel, l'essentiel de ces interactions est présenté par le schéma ci-dessous.

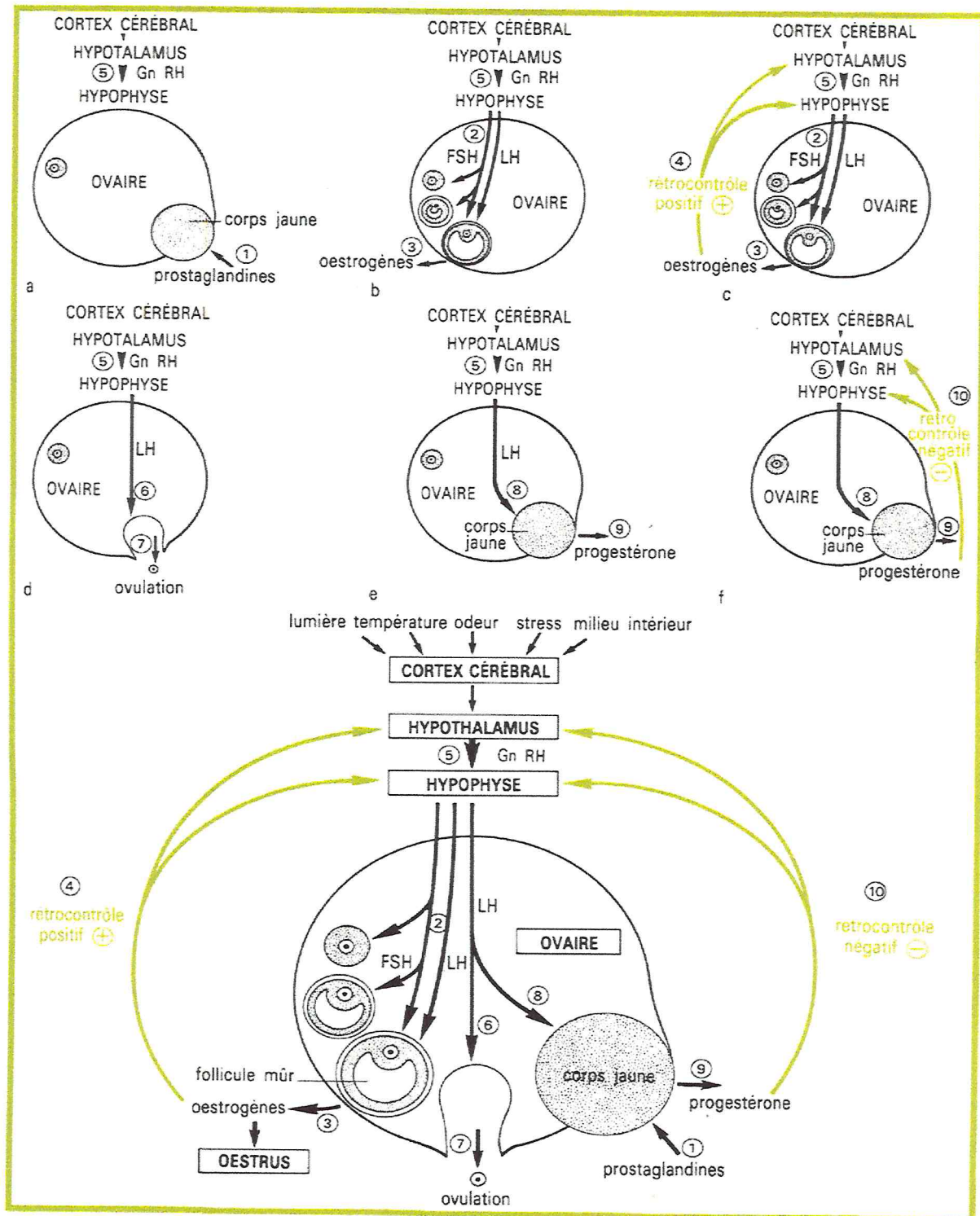


Figure 2 : régulation hormonales du cycle sexuel chez la vache (INRAP ,1988)

En prenant comme point de départ la fin de la phase lutéale, les principales actions hormonales sont les suivants (Figure 2) :

- A. Les prostaglandines produites par l'utérus provoquent la lutéolyse et la chute du taux de progestérone (1)
- B. Les hormones gonadotropes, FSH et LH, principalement FSH assurent la croissance folliculaire (2), il en résulte une production d'œstrogènes en quantité croissante (3)
- C. Les œstrogènes permettent l'apparition du comportement d'œstrus. En outre, ils exercent un rétrocontrôle positif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire (4), l'auto sensibilisation de l'hypothalamus à des quantités croissantes d'œstrogènes permet une production massive de GnRH (5).
- D. Sous l'action de GnRH, l'hypophyse réagit par une production massive de FSH et LH, le pic de LH (6) provoque l'ovulation (7).
- E. Sous l'action de LH, le corps jaune se forme (8) et sécrète la progestérone (9), cette dernière exerce sur le complexe hypothalamo-hypophysaire une rétro control négatif (10), bloquant toute production de GnRH, le complexe hypothalamo-hypophysaire et l'appareil génital restent au repos tant que la production de progestérone persiste.
- F. Les stimuli externes, tels que la variation de la durée des jours ou photopériode, agissent sur l'hypothalamus et provoquent ainsi des perturbations du mécanisme normal de régulation (INRAP ,1988)

2.4 NOTION DES VAGUES FOLLICULAIRE :

A partir de la puberté, la croissance folliculaire est permanente et des vague ce croissance qui suit d'atrésie folliculaire (99.99%). Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules tertiaires antraux de diamètre égal ou supérieur à 5 mm parmi lesquels apparaît le follicule dominant qui sera ovule.

Chez la vache, un cycle ne comporte habituellement que 2 ou 3 vagues. Chaque vague comporte un follicule dominant. En cas des trois vagues, elles débutent aux 2ème, 9ème et 16ème jours du cycle. Contrairement, en cas de deux vagues, elles apparaissent aux 2ème et 11ème jours du cycle.

Chaque vague est comporte de trois phases : recrutement sélection et dominance

2.4.1 Recrutement :

Ce processus primaire connu comme l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonadodépendants. Le recrutement un phénomène aléatoire provoqué par l'augmentation transitoire du taux circulant de FSH.

2.4.2 Sélection

Généralement, est l'émergence du (ou des) follicule(s) ovulatoire(s) parmi les follicules recrutés. Elle est secondaire à la réduction de FSH qui a initié le recrutement. En effet, le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'œstradiol, mais également d'inhibine qui par rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, diminue la production de FSH.

A l'exception du (ou des) follicule(s) sélectionné(s) capable(s) de se développer en présence de faible taux de FSH, les autres follicules recrutés entrent en atrésie.

2.4.3 Dominance

Elle fait suite à la sélection des follicules pré-ovulatoires. Elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire.

La dominance correspond au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide de volume du (ou des) follicule(s) ovulatoire(s). C'est le follicule pré-ovulatoire qui est responsable de la sécrétion d'inhibine pour arrêt de développement des autres follicules.

Bien que la FSH diminue, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne faisant intervenir l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) qui stimule sa synthèse d'œstradiol.

La suite de l'évolution du follicule dominant dépend de l'évolution de la progestéronémie. Conditionnement, si la progestéronémie diminue suite à la lutéolyse, il ovule. En cas d'inverse, la progestéronémie se maintient à un niveau élevé après que le follicule dominant ait atteint sa taille maximale, il commence à régresser, et une autre vague de croissance apparaît.

2.4.4 Atrésie folliculaire :

Lors de chaque vague, 99,99% des follicules n'arrive pas au stade ovulatoire. Ces follicules sont dégénères. D'un point de vue morphologique, elle est identifiée par la diminution de la taille du follicule visualisé par échographie et par l'accumulation de pycnose (grains de chromatine condensée) dans les cellules de la granulosa. D'un point de vue fonctionnel, elle est associée à une réduction de la stéroïdogenèse qui résulte d'une diminution de l'activité aromatasase (accumulation de testostérone).

Un follicule dominant il sera alors ovule et le rétrocontrôle négatif de l'inhibine et de l'œstradiol cesse et une nouvelle vague folliculaire va émerger.

CHAPITRE 3 : TRANSFERT EMBRYONNAIRE

3.1 HISTORIQUE

La technologie du transfert embryonnaire, est considérée comme la deuxième génération dans l'évolution de la biotechnologie de la reproduction des mammifères. En Avril 1890, Walter Heaper a signalé une portée de lapine issue de transfert d'embryon né dans son laboratoire avec l'objectif de savoir si l'environnement utérin influence les caractères phénotypes de l'embryon. (Betteridge, 1981; Biggers, 1991; Heap, 1992). C'est en 1951 que naquit aux États-Unis (Winsconsin) à l'Université de Cornell, le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse (Willett et al. 1951),

Alors c'était au début des années 1970 que l'intérêt commercial dans le transfert d'embryon bovin a développé. Le premier rapport de succès de congélation d'un embryon de mammifère était en 1972 chez une souris (Whittingham et al, 1972). Le premier veau né après transfert d'un embryon congelé puis décongelé naquit en 1973 (Wilmot et Rowson 1973), Il portait le nom de Frosty II.

En May 1974, International Embryon Transfer Society (IETS) a été établie en Colorado, USA en raison de disperser et améliorer l'intérêt de cette technologie (Kiagi, 1995)

En Algérie, le premier veau issu de transfert d'embryons est né en 2004 à l'université de Blida d'une collaboration avec la faculté de médecine vétérinaire de Liège et CNIAAG.

3.2 QUELQUES INTERET DE LA TRANSFERT EMBRYONNAIRE:

- La principale utilisation de transfert d'embryon chez les bovins a été d'amplifier le taux de reproduction des femelles de grande valeur.
- En utilisant la technique de Superovulation and transférence embryonnaire,, on peut arriver à reproduire beaucoup des descendantes à partir d'une vache valable dans une temps très limite
- Changement d'un élevage avec des vache améliorer au des vaches pure est moins chère en utilisant la technique de transférence embryonnaire par rapport d'acheter une race pure.

- Les vaches dans élevage avec des caractères indésirables pour la reproduction peut être utilisé comme les receveuses et par cette méthode la qualité génétique sera améliorée.
- Il diminue les taux de transmission des maladies parce qu'il n'a pas de contact entre la vache et le taureau.
- Avec cette technique on peut obtenir les progénitures à partir d'une vache réforme ou blessée et tellement incapable de reproduire.

3.3 LA SÉLECTION DES ANIMAUX :

3.3.1 Critères des donneurs :

Pour assurer un taux important de réussite du transfert embryonnaire, la sélection joue un rôle très important. Sélection de chaque donneuse est l'une des décisions les plus importantes dans le processus de la transférent embryonnaire.

Les femelles donneuses doivent être de valeur génétique supérieure et de commercialisation pour justifier les coûts de transfert embryonnaire. Décisions doivent être prises en tenant compte la valeur génétique et la valeur économique des veaux potentiels. Le potentiel de reproduction d'une donneuse doit également être acceptable (*G.C.Lamb, 2012*).

- Facteurs liés à la race:

Les animaux choisis doivent être adaptés à l'environnement où a lieu le transfert, facilement disponibles et à un coût raisonnable. Les animaux le plus souvent choisis sont des animaux de race laitière car ils sont plus habitués à être manipulés que les animaux de race allaitante et leur état corporel est en général modéré, ce qui est plus en faveur d'une meilleure fertilité et d'un transfert techniquement plus facile à accomplir.

Il ya des indications que certains facteurs de vaches donneurs ne touchent potentiellement les taux de réussite du transfert. Par exemple, il existe des preuves anecdotiques abondantes que les embryons provenant de donneurs Jersey ne survivent pas à la congélation-décongélation ainsi que les embryons de bovins Holstein. Récemment, les taux de gestation sont significativement plus faibles pour les embryons Jersey par rapport aux embryons congelés Holstein soit dans de l'éthylène glycol ou de glycérol ont été rapportés (*Acier et Hasler, 2004*).

Il ya aussi une perception largement répandue que les embryons frais et surgelés de Bos Indicus entraînent des taux de gestation plus bas par rapport aux embryons de bovins Bos Taurus, bien qu'il n'existe pas de données publiées fournissent des preuves concluantes. Néanmoins, dans une étude récente la qualité des embryons, un pourcentage nettement plus faible des embryons de vaches laitières en lactation étaient d'excellente qualité par rapport à ceux de génisses laitières ou vaches non allaitantes bœuf (*Leroy Et Al. 2005*)

- Progéniture et fertilité d'une vache :

On ne choisira pas d'animaux ayant des antécédents de troubles de la reproduction, les vaches infertiles à chaleurs normales (Repeat-breeder) sont aussi écarté à la sélection, c'est-à-dire non gestantes après plus de trois artificiel inséminations, ou des animaux dont on sait que les voies génitales sont peu perméables à un pistolet de transfert.

Les vaches donneuse idéals ont des cycles œstraux réguliers commençant à la puberté (en cas de génisses) conçoit régulièrement avec pas plus de deux inséminations, maintient un intervalle vêlage- vêlage de 365 jours ou moins (en cas de pluriparts), est exempt de troubles de la reproduction et les maladies, et n'a pas de conformation ou connu des anomalies génétiques dystocie ou rétention placentaire auparavant.

La vache donneuse potentielle doit être la reproduction du son pour produire des résultats maximaux. Cela signifie qu'elle doit avoir un appareil reproducteur normal sans malformation quelconque, surtout en ce qui concerne la durée du cycle normale (18 à 24 jours. En plus, vaches donneuses doivent être au moins 60 jours post-partum avant la procédure de transfert commence, verser assurer l'évolution utérine (biochimique et anatomique ainsi que l'absence de cellules inflammatoires)

- Critères nutritionnelle

Bonne prise en charge nutritionnelle de ces vaches est essentiel pour la productivité en tant que donneurs d'embryons. Il s'agit de gérer la condition physique et de fournir les nutriments appropriés, y compris les minéraux, importants pour la fonction de reproduction. Elle devrait être maintenue au niveau de la nutrition appropriée pour sa taille et le niveau de production de lait. Tant la vache très obèses et la vache maigre auront réduit la fertilité, il est

donc important que la vache donneuse soit dans une note d'état corporel approprié (3.5) au moment du transfert de l'embryon.

3.2.3 Critères liés à la receveuses :

Une bonne gestion du troupeau bénéficiaire est essentielle à la réussite embryon de transfert. Les vaches qui sont la reproduction sonore, qui présentent la facilité de vêlage, et qui ont une bonne traite et la capacité de la mère sont les perspectives bénéficiaires. Les facteurs dépendant de la sélection sont:

- Histoire De Reproduction

Les génisses sont préférables aux vaches car elles ne conduisent pas de lactation en même temps que la gestation, ce qui évite un stress nutritionnel potentiel. De plus un utérus d'une vache nullipare est plus compatible avec un transfert embryonnaire : il n'a pas d'antécédents de gestation, de métrite ou de césarienne qui pourrait avoir provoqué des adhérences. Leurs inconvénients, toujours selon *Broadbent et al. 1991*, est que le col peut être plus difficile à franchir et que la fréquence des dystocies est plus importante chez elles que chez les vaches.

Avant d'être mis à la reproduction, les animaux doivent bien sûr être cyclés, ce qui correspond au moment où ils ont atteint 40% de leur poids adulte. Il est couramment conseillé d'attendre qu'ils aient atteint 60% de leur poids adulte avant la mise à la reproduction. De plus, elles ont des besoins alimentaires moins élevés que ceux d'une vache qui produit du lait. Ils ont également mis en évidence qu'il y a plus de transfert traumatique chez les vaches que chez les génisses, en raison de la difficulté qu'il y a à manipuler des appareils génitaux de taille importante. Or la difficulté de transfert fait chuter le taux de gestation de façon importante ($p < 0,01$, avec une chute de 17,7% entre un transfert facile et un difficile).

- L'état de l'appareil génital

L'appareil de l'animale (vache ou génisses), qui doit subir un transfère embryonnaire, doit pas être en bonne état physiologique et anatomique. L'examen profonde de 'appareil est impératif.

Un cathétérisme du col utérin peut être réalisé. Il permet de vérifier la perméabilité des voies génitales de la femelle. On exclut ainsi les animaux porteurs d'anomalies congénitales, ou les

animaux chez lesquels les transferts précédents ont pu laisser des séquelles. Les anomalies sont fréquentes chez les free-martins : corne utérine atrophiée, simple raccourcissement des cornes utérines, vagin aveugle. Elle est très important d'assurer que l'animale exprime parfaitement sa chaleur et il peut subir un traitement de la synchronisation de la chaleur (Hasler et al. 1987)

3.4 PREPARATION DES VACHES DONNEUSES ET RECEVEUSES

Récemment, des experts utilisent plus en plus le taux de gestation comme indicateur de l'efficacité reproductive à l'échelle du troupeau. Puisque la majorité des taux de gestation observés dans plupart des élevages sont la barre principale causée par une fausse détection des chaleurs avant l'insémination, plusieurs programmes de synchronisation de la reproduction (PSR) ont été proposés et mis en évidence pour essayer d'améliorer la situation. Cette méthode permet de synchroniser les chaleurs et l'ovulation d'un groupe de vaches, qui permet ainsi d'affranchir la détection des chaleurs et d'inséminer les vaches à un moment déterminé. La préparation de ces vaches comprend une superovulation qui assure la production de plusieurs follicules sur un ovaire. Ceci nécessite une synchronisation des cycles d'œstrus entre le donneur et le receveur, de manière optimale en un jour de l'autre (Luc DesCoteaux et al, 2012)

3.4.1 Superovulation des donneuses :

Superovulation est le processus stimulant les ovaires avec les hormones exogènes pour produire plusieurs ovocytes et c'est le point le moins prévisible de la production d'embryons. Il y a une énorme variation dans le nombre d'embryons récupérés après superovulation, qui est due à des variables comme l'âge de l'animal, la race, le stade de lactation, l'état nutritionnel, la saison et le stade du cycle œstral quand le traitement de la superovulation est initié.

3.4.2 Hormones utilisées :

FSH (Follicule Stimulating Hormone) « Les extraits hypophysaires » :

Les extraits hypophysaires d'origine porcine sont le plus souvent utilisés, *pFSH*. Cependant, les extraits hypophysaires bovins, *bFSH*, ou ovins sont disponibles malgré qu'ils sont moins actifs que la FSH porcine. Les extraits hypophysaires possédant une demi-vie plus

courte (5 à 6 heures) que la PMSG (6 à 7 jours), étant donné leur moindre richesse en acide sialique (5 %) ils doivent faire l'objet d'injections répétées. Leur concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et ne sont plus décelables 12 heures après l'injection. Leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la PMSG. (Hanzen, 2005).

Les doses sont comprises entre 32 et 50 UA administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bi journalières (matin et soir) pendant 4 jours, la dose de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA chez la vache viandeuse (Hanzen, 2005).

Quelque soit l'hormone utilise, le corps jaune palpable doit être présent au niveau de l'ovaire. La posologie est donnée avec une approche de décroissantes. Ceci, nous enseigne que, la vache est en phase lutéal, précisément dans la période de dioestrus (10 jours post-chaueur). En bout de quarante huit ou soixante-deux heures après le début de traitement, les prostaglandines F2alpha sont injectées pour induire une chaleur quarante huit plus tard. Les plupart des protocoles proposent deux injections de prostaglandine F2alpha à l'intervalle de 12 heures. Puis, la vache donneuse est insémine la première fois 12 heures après les débuts des chaleurs (Hanzen, 2005).

Prégnant Mare Sérum Gonadotropine (PMSG) :

La PMSG extraite du sérum de jument gravide entre le 42^{ème} et le 100^{ème} jour de gestation possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange de 2/3 de FSH et de 1/3 de LH. La PMSG est douée d'une double activité à la fois de type FSH et LH avec un rapport constant FSH/LH égal à 0.2. Elle est injectée par voie IM à une dose comprise entre 2.000 et 3.000 UI. La réponse au traitement augmente avec la dose injectée. De même, on observe une augmentation du risque d'anovulations et d'embryons de moins bonne qualité avec la dose administrée. La race Jersey est plus sensible que la Charolaise qui l'est davantage que la Pie-Noire (Hanzen, 2005).

La PMSG a une demi-vie particulièrement longue (6 à 7 jours) imputable à sa richesse en acide sialique (13 %) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale. Aussi est-il indispensable de lui adjoindre l'injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG (obtenus sur moutons) au moment des chaleurs. Ces anticorps ont pour objet d'inhiber l'action de la PMSG

et ce faisant le développement d'une seconde vague de croissance folliculaire et d'éviter la formation de follicules kystiques. La répétition des injections de PMSG à 1 voire deux mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné la réaction antigénique possible. (Hanzen, 2005).

La gonadolibérine (GnRH)

La GnRH s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation. Cependant, elle peut être utilisée en association à d'autres schémas de superovulation. En effet, certains échecs d'ovulation et de fécondation chez les animaux donneurs d'embryons ont été imputés à une absence de libération ou à une libération anormale de l'hormone LH lors de l'œstrus suivant un traitement de superovulation à base de PMSG. Cette situation est de nature à entraîner une plus grande disparité dans les ovulations observées lors de superovulation respectivement dans 45 et 91 % des cas au cours des 24 et 48 heures suivant le début de l'œstrus. Aussi, le recours à des traitements de synchronisation des ovulations tels que l'hormone LH, l'hCG ou la GnRH a-t-il été envisagé pour pallier à certains échecs de traitements de superovulation (Hanzen, 2005).

Figure 3 : Traitement de superovulation au moyen de FSH/LH

Jour		Traitement PMSG	Traitement pFSH
		2500 à 3000 UI	32 UA (Races laitières) 40 UA (Races viandeuses)

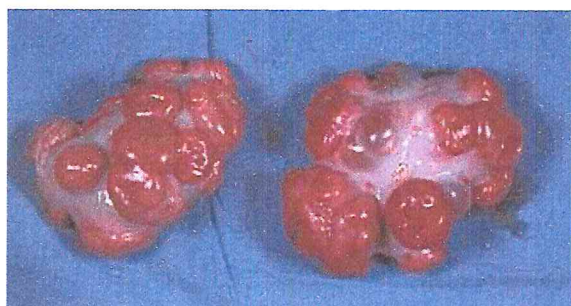
J0 : chaleur de « référence » (J9 à J15)			
J10	Matin	PMSG (une injection)	FSH/LH (6 ou 8 UA)
	Soir		FSH/LH (6 ou 8 UA)
J11	Matin	PGF	FSH/LH (5 ou 6 UA)
	Soir		FSH/LH (5 ou 6 UA)
J12	Matin		FSH/LH (3 ou 4 UA)
			PGF
J13	Soir		FSH/LH (3 ou 4 UA)
	Matin		FSH/LH (2 UA)
	Soir		FSH/LH (2 UA)

J14 (J0)	Matin	IA 1	IA 1
	Soir	IA 2	IA 2
		Anti-PMSG (1800 UI)	

(J7)		Récolte et PGF	Récolte et PGF

Figure 4 : Traitement de superovulation au moyen d'un implant

Jour		Traitement PMSG	Traitement FSH
J0		Mise en place de l'implant	Mise en place de l'implant
J7	Matin	PMSG	FSH/LH
	Soir		FSH/LH
J8	Matin		FSH/LH
	Soir		FSH/LH
J9	Matin	Retrait implant PGF	Retrait implant, FSH/LH PGF
	Soir		FSH/LH
J10 (J0)	Matin		FSH/LH
	Soir		FSH/LH
J11 (J0)	Matin	IA1	IA1
	Soir	IA2 Anti PMSG	IA2
(J7)		Récolte et PGF	Récolte et PGF

**Figure 5 : Structure d'un ovaire superovulé (Hanzen, 2009)**

Les vaches ou génisses correctement traitées peuvent libérer > 10 ovules viables à un œstrus. Environ 85% de tous les donneurs fertiles répondra à un traitement de superovulation avec une moyenne de cinq embryons transférables. Certaines vaches sont traitées de manière répétée à intervalles de 60 jours, avec une légère chute du nombre d'embryons au fil du temps.

3.4.3 Synchronisation des receveuses:

Les vaches receveuses sont subit un protocole de la synchronisation pour assure qu'ils sont en même stade du cycle œstral que les donneuses. Le Protocole de la synchronisation assure que les meilleure receveuses expriment leur chaleur en même temps que la donneuses ou, tout au mois, pas plus de 24 heures ou 5 jours après de sang metoestral ou postœstrus. La

receveuse doivent être injectées avec la prostaglandine F2 alpha 12 heures avant la donneuse. Etant donné le traitement de superovulation, la donneuse vient en chaleur un peu plus tôt que normale. Il montre que 48 heures après injection de la PGF2 alpha contrairement aux receveuses qui présenteront des signes de chaleur 48 (pour les génisses) et 72 heures (pour les vaches) après injection. Ecart 12 h entre chaleurs receveuses et donneuse tolérable.

3.4.4 Artificiel Insémination des vaches donneuses:

Après le traitement de superovulation, la surveillance des donneurs est très importante en raison de leur comportement sexuel. Le processus d'insémination artificielle effectuée sur la donneuse qui présente les chaleurs 48 heures après l'injection de la PGF2 Alpha. Parfois, ce n'est pas évident que la vache présente les signes œstraux nets alors qu'il faut utiliser les œstraux détecteurs tels que le KaMar Indicateur (*Luc DesCoteaux, 2012*)

On préfère la semence fraîche par rapport aux semences congelées. Cependant, si il est congelé, l'examen des spermatozoïdes avant l'insémination pour déterminer la qualité des spermatozoïdes est essentiel. Utilisation de la semence de haute qualité avec un pourcentage élevé de cellules normales, mobiles est une étape très critique dans tout programme de transfert d'embryon. Les altérations de patterns hormonaux fait que le reproductif tractus du donneur devient un environnement hostile, donc les spermatozoïdes doivent être de bonnes qualités (*Luc DesCoteaux, 2012*)

Contrairement, l'utilisation de semence de qualité médiocre souvent résulte en collection des ovocytes non féconds ou embryons de mauvaise qualité. En raison de la libération d'un grand nombre d'ovules dans les follicules multiples sur l'ovaire, il existe un besoin supérieur à la normale pour être certain que les spermatozoïdes viables atteignent des oviductes des femelles superovulées. Un système qui a été utilisé avec succès est d'inséminer la vache superovulée à 12, 24, et 36 heures après l'apparition des chaleurs (*Luc DesCoteaux, 2012*).

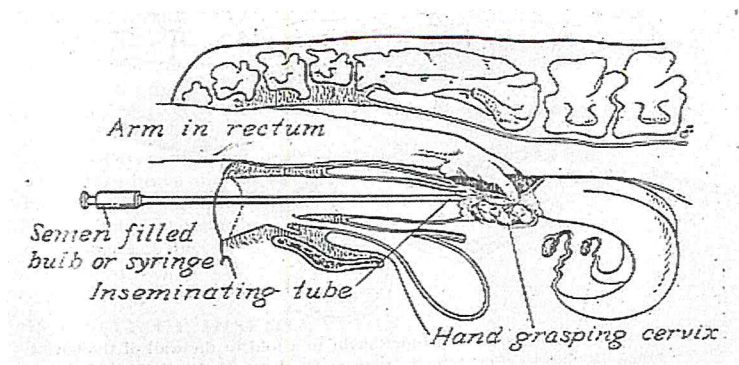


Figure 6 : Insémination Artificielle chez la vache

Le site correct pour la semence mise en place dans le corps de l'utérus. Il s'agit d'une petite cible (1/2 à 1 pouce), qui est juste en face de l'utérus. Il semble y avoir une tendance pour les inséminateurs de passer la tige trop profondément et de déposer la semence dans l'une des trompes de fallope, ce qui réduit la fertilité si ovulations se déroulent à l'ovaire opposé (Luc desCoteaux et Denis Vaillancourt, 2012).

3.4.5 Facteurs de variation de la superovulation :

Des réponses variables entre individus voire d'un traitement à l'autre ont été enregistrés. Divers facteurs ont été impliqués. Outre de la saison (effet négatif des températures élevées) ou de l'alimentation (carence en énergie), ils relèvent essentiellement de l'animal et des traitements de superovulation (Kiagi, 1995).

► Facteurs propres à l'animal

La qualité de la réponse va dépendre de l'importance de la *réserve des follicules préantraux*. Ainsi une corrélation entre le nombre de follicules de diamètre compris entre 2 et 5 mm et le nombre d'embryons récoltés a-t-elle été démontrée par des études échographiques. De même, la présence d'un *follicule dominant* au moment de la mise en place du traitement de superovulation est-elle de nature à réduire la qualité de la réponse observée. Le follicule dominant produit l'inhibine qui va régressé la sécrétion de FSH endogène des autres follicules en croissance (Kiagi, 1995).

L'âge de l'animal peut également constituer un facteur limitant compte tenu du fait que le nombre de follicules qui quittent la réserve diminue avec celui-ci.

Des différences entre *raças* ont également été rapportées (4.6 dans les races Holstein, Normande et Charolaise, 3.9 en Blonde d'Aquitaine, 6.6 dans les races Brangus et Simmental, 3.6 en race BBB)

► **Nature du traitement de superovulation**

Il a été démontré dans notre laboratoire que les préparations hypophysaires ayant un rapport LH/FSH de 20% (chez les vaches laitières) et 40 % (chez les vaches viandeuses) ainsi que les traitements s'accompagnant d'une concentration croissante en LH donnaient des valeurs exprimées en nombre d'embryons récoltés supérieures à des rapports de 10 et 80 %.

► **Moment de mise en place du traitement de superovulation**

Classiquement, un traitement de superovulation débute entre 10 jours du cycle (post-chaleur de référence). La théorie des vagues de croissance folliculaire et le rôle inhibiteur exercé par le follicule dominant sur la croissance folliculaire ont incité certains chercheurs à proposer des solutions alternatives visant à faire coïncider davantage le début du traitement avec le moment d'émergence d'une vague de croissance folliculaire. C'est pourquoi des traitements de superovulation en début de cycle ont été évalués. Le choix de ce moment du traitement était dicté par le fait qu'il était plus facile d'identifier par rapport à l'œstrus précédent le moment d'émergence de la première vague que de la deuxième vague folliculaire, celle-ci apparaissant par ailleurs 1 à 2 jours plus tôt si le cycle comportait trois vagues de croissances folliculaires (FAO, 2008).

3.5 RECOLTE D'EMBRYONS

À la proche de l'année 1976, la plupart des embryons bovins sont collectés par méthode chirurgicale utilisé l'incision sur le flanc. Mais avec l'évolution, il y avait évolution de l'approche et méthode non-chirurgicale (voie transcervicale) a été mis en place. (Betteridge, 1977).

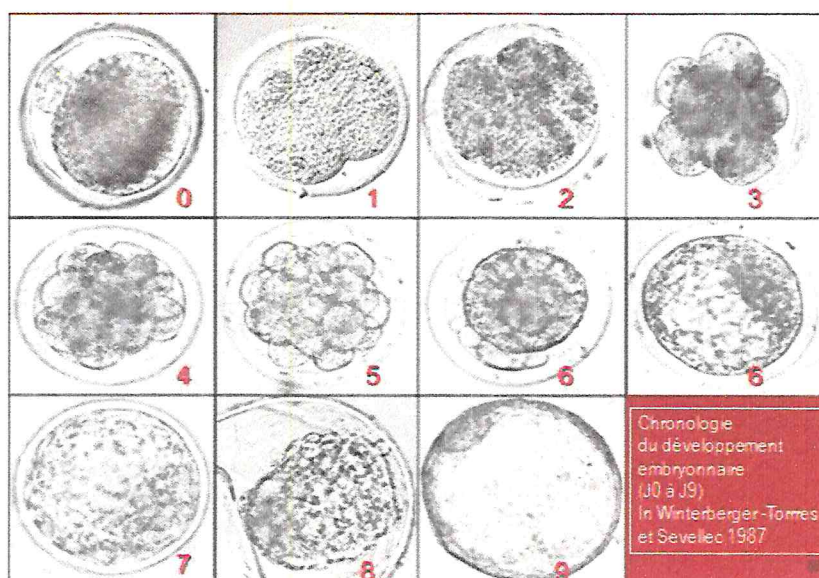


Figure 7 : Chronologie du développement embryonnaire (J0 à J9), Winterberger-Tomes et Sevellec, 1987

Dans la plupart des cas, les embryons sont récoltés 6 à 8 jours post-insémination. On s'intéresse sur la récolte des morulas qu'il commence à former à partir de 6 jours post-insémination. Les embryons peuvent également être récupérés les jours de 9 à 14 post-insémination, mais ils éclosent de la pellucide de zone le jour 9 ou 10, ce qui les rend plus difficiles à identifier et isoler et plus sensibles à l'infection. Après 13 jours, les embryons s'allongent considérablement et sont parfois endommagés. Procédures de cryoconservation et bisection ont été optimisées pour manipuler des embryons de 6 à 8 jours, ce qui est une autre raison de choisir ce moment. En plus, l'intérêt est sur la zone pellucide. Celle-ci doit être intacte sans démarrage parce qu'elle sert comme une barrière contre toutes les matières dangereuses pour l'embryon (Thibier, 2006).

Quel que soit la méthode de récolte, la première étape consiste à procéder à une fouille rectale pour estimer le nombre de corps jaunes présents sur les ovaires. Ceci devient difficile à faire avec précision si il y a une grande réponse à la superovulation. Cette procédure nous aide à écarter les vaches non-répondant au traitement de superovulation (Training Manual FAO, 2008).

Le nombre de corps jaunes sur les ovaires, nous facilite d'estimer le nombre des embryons présents. Alors qu'il y a une corrélation entre les nombres des corps jaunes et le

nombre des embryons. Il est rare d'obtenir un embryon chez une vache non-responsive au traitement de superovulation, et voila pourquoi il est inutile d'essayer de faire une récolte chez ce genre des vaches. Ultrasonographie fournit des informations plus précises sur les réponses que la fouille rectale, mais actuellement le matériel coûteux ne peut être justifiée dans des contextes de recherche ou dans les grands programmes de transfert d'embryons (*Pierson et Ginther , 1988*)

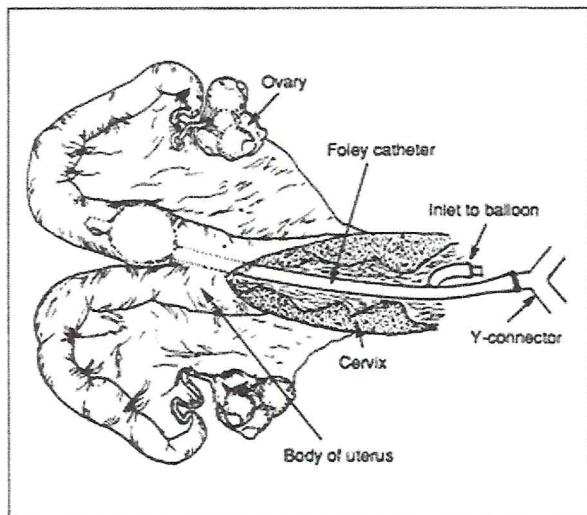


Figure 8 : Positionnement de la sonde de type Folley lors du lavage utérine

3.5.1 Méthode de récolte

Initialement, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous l'anesthésie générale le plus souvent au niveau de la ligne blanche en avant du pis. Dans en temps, avant amélioration, il arrive que les embryons peuvent être récolte par méthode non-chirurgicale.

3.5.1.1 Méthode chirurgicale

Initialement, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous l'anesthésie générale le plus souvent au niveau de la ligne blanche en avant du pis. Une fois l'utérus est bien extériorise, une incision d'un cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter a deux voies (sondes de type Folley). Le ballonnet était ensuite gonfle. Le liquide de récolte était injecte au moyenne d'une seringue et d'une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupérer par l'orifice suite à la basse du ballonnet

Après récolte, le ballonnet était dégonflé, l'utérus suture et on procédait de la même pour l'utérus au cote oppose. Cette technique offrait l'avantage d'un taux de récupération élevé des embryons (70-80%), de pouvoir juger de la réponse ovarienne au traitement de superovulation. Récemment, cette méthode est abandonnée à cause le plusieurs inconvénients parce qu'il est difficile pour répéter souvent l'intervention sur le même animal (*Hanzen, 2009*)

3.5.1.2 Méthode non-chirurgicale

Avant toutes- les interventions, la vache donneuse doit être bien positionneur dans une position telle que ses membres antérieurs sont légèrement surélevés pour permettre l'évacuation de milieu de l'utérus. Cette méthode de positionnement intérêt utilisé verser les vaches et les vaches pluriparts fertiles dont l'utérus se trouve dans la cavité abdominale. Par la suite, procède une anesthésie péridurale avec la Lidocaïne pour éliminer les contractions musculaires et permet au technicien de manipuler plus facilement l'utérus et la tubulure de chasse d'eau dans l'appareil reproducteur. L'anesthésie doit être faite avec précise pour éviter de mettre une vache en dommage et provoque la paralysie des postérieurs (*Jamie E. Larson et Jane A. Parish, 2009*).

L'instrument de base pour la récupération non - chirurgicale est la sonde de Foley avec deux voies ou trois voies. Généralement 18 – 24 de tailles de calibre sont utilisés. Il est préférable d'utiliser un aussi grand cathéter peut être introduit facilement d'obtenir de bons taux de flux. La plupart des gens préfèrent les deux sens cathéters, un passage pour l'air et pour un fluide, parce que les taux de flux sont plus élevés qu'avec trois voies cathéters, qui ont deux passages plus petits pour le fluide. L'inconvénient du cathéter à double sens est l'espace mort ou de la colonne de liquide qui reste dans le cathéter au cours du remplissage et n'a jamais atteint l'utérus (*Manuel de transfert d'embryons, 2008*).

3.5.2 Méthode de lavage utérine

3.5.2.1 Méthode continu

Dans la méthode continu avec le système ferme, le liquide de lavage s'écoule librement par gravite dans la corne par un tube reliant le sac de liquide de lavage au cathéter. En moment où l'utérus est pleine et tombant, le liquide est draine à cause de la gravite dans un

contenant collecteur ou directement dans un filtre de 50 microns. (*Luc Descoteaux et Denis Vaillancourt, 2012*).

Par cette méthode, sonde de Cassou (à trois voies) souvent utilisé. Une voie permet de gonfler le ballonnet, deuxième voies permet l'injection de la liquide et la troisième assure la récupération du liquide dans la corne utérine. Cette sonde est caractérisée d'un corps rigide de 56 cm de long et de 6 mm de diamètre. En plus, il possède un bouchon d'échantéit postérieur de 160 cm de 3 mm de diamètre (*Hanzen, 2009*).

3.5.2.2 Méthode Interrompu

Dans ce cas, des seringues de 30 à 50ml sont utilisées pour infuser et retirer le liquide de lavage avant d'être finalement déposées dans un contenant ou dans un filtre (*Luc Descoteaux et Denis Vaillancourt, 2012*).

Sonde de Han (à deux voie) peut être utilisé. Une voie permet de gonfler le ballonnet, tandis que le deuxième assure d'injection et récupération de liquide. Cette sonde a une longueur de 70 cm et un diamètre de 6 à 7 mm. Elle est munie d'un mandrin interne pour donne une rigidité sur ne sonde pour assure son pénétration à travers le col jusqu'à l'utérus (*Hanzen, 2009*).

3.6 TRAITEMENT POST-RECOLTE

Une fois à l'extérieur de l'utérus, les embryons peuvent supporte la manipulation à des températures variant de 15 à 25°C. Dans toute les cas, tout les matériels stérilisés doit être lavé aven une solution de lavage avant d'être en contact avec les embryons (*Luc Descoteaux et Al., 2012*).

Après la récolte, les embryons sont identifiés avec l'aide de stéréoscope à faible grossissement (10 ×), classifiés à 50× (minimum), puis laver avec une solution fraîche de lavage. Utilisation de 10 lavage aven un facteur de dilution de 100 et deux bains de trypsine ; tel que recommande par IETS. Selon les études faites, l'hypothèse à été réalise que les embryons avec une zone pellucide intacte et lavés présent un faible risque pour la transmission de maladies (*Luc Descoteaux et Al., 2012*).

En fin de récolté, il est conseille de injecte la prostaglandine pour éviter le développement des embryons qui sont échappés la procédure de lavage et provoque la chaleur. En plus, une

antibiothérapie est très important pour contrecarre les endométrites et toute les infections du tractus génitale (*Luc Descoteaux et Denis Vaillancourt, 2012*).

3.7 EXAMEN ET EVALUATION DES EMBRYONS

Embryons individuels sont situés à l'aide du microscope et évalués pour leur qualité et classés numériquement quant à la probabilité potentiel de succès en cas de transfert à un destinataire féminin. Evaluation morphologique qui a été proposée par *Eldsen en 1978* fait que les embryons sont classés selon les caractères de membrane pellucide, les blastocytes en générale et les cellules blastocystes (*Hanzen, 2009*).

Les principaux critères d'évaluation sont :

- Régularité de la forme de l'embryon et diamètre de l'embryon
- La compacité des blastomères (les cellules en division dans les limites de l'embryon)
- Variation de la taille des cellules blastocystes
- La couleur du cytoplasme des blastomères
- Régularité de la zone pellucide
- Présence des vésicules et granules dans le cytoplasme

Qualité	classe	Utilisation	Caractères
Q1	EXCELLENT	Transférable Congelable	Aspect symétrique, blastomères polygonaux Blastomères formant une masse compacte au stade morula
Q2	BON	Transférable	Il semblable à des embryons qualité 1 mais ils présentent retard de développement par rapport aux son jour de récolte et peut présenter un asymétrie de quelques blastomères dans l'espace perivitellin.
Q3	MOYEN	Transférable	Retard de développement de 1 à 2 jours avec défauts précis (les cellules échappées dans l'espace perivitellin, des blastomères de taille variables, quelques cellules dégénérées, quelques vésicules et aspect plus claire ou sombre que normal)
Q4	MEDIOCORE	Inutilisable	Retard de développement de 2 jours Nombreux défauts des cellules échappées, dégénérées, vésicules grosses et nombreuse. Masse cellulaire homogène apparaît normal.
Q5	MORT OU DEGENEREEES	Inutilisable	Identification difficile du stade Arrêt de développement à un stade précoce avec des cellules dégénérées.

Tableau 1 : Classification des embryons selon la qualité (d'après INRA, UNCEIA, 1990)

3.8 INFLUENCE DE LA QUALITE SUR LA REUSSITE DU TRANSFERT

Étude des facteurs influençant un transfert ne peut se faire que pour des embryons conservés dans les mêmes conditions. Selon *Farin et al. (1999)*, ils ont cherchés à savoir si le classement en différentes qualités était un jugement fiable ou si chaque observateur portait un jugement différent. La question est ensuite de savoir si le taux de gestation est influencé par la qualité de l'embryon.

Ils sont ont obtenus les taux de gestation suivants, pour des embryons collectés à J7 et transférés en frais : 66 à 76 % pour des embryons de qualité 1, 62 à 69% pour des embryons de qualité 2 et 54 à 60 % pour des embryons de qualité 3.

Des études portant sur des effectifs plus importants ont donné des résultats plus précis. *Farin et al (1995)* ont obtenu un taux de gestation global de 79%, mais ils n'ont transféré que des embryons de qualité 1 ou 2. Aucune différence dans la probabilité de survie d'un embryon en fonction de sa qualité n'a été mise en évidence.

Par contre, une étude réalisée par *Hasler (2001)* portant sur 9023 transferts d'embryons frais a montré des taux de gestation significativement liés à la qualité de l'embryon.

Qualité de l'embryon	Nombre de transferts	Taux de gestation (%)
1	4163	73,2
2	3156	68,3
3	1641	56,3
4	61	47,5

Tableau 2 : Taux de gestation et qualité d'embryons, d'après Hasler et al. (2001).

La qualité de l'embryon semble avoir une influence sur la réussite du transfert, surtout quand on considère la différence entre des embryons de qualité 1 ou 2 et des embryons de qualité 3 (*Hasler (2001)*).

Stade embryonnaire	Caractéristique
Stage 1: Non féconde	
Stage 2: 2 à 12 cellules	
Stage 3: jeune morula	Blastomères peu différenciables Occupation de tout l'espace par les blastomères
Stage 4: Morula (5 jours)	60 à 70 % de l'espace occupé
Stage 5: Jeune Blastocystes (6 jours)	Apparition d'une cavité (blastocoelique) Aspect de chevalière Occupation de 70 à 80 % de l'espace début de la différenciation entre trophoblaste et ICM
Stage 6: Blastocyste (7 jours)	Distinction aisée entre bouton embryonnaire et trophoblaste Cavité blastocoelique est nettement identifiable
Stage 7: Blastocyste épanoui (8 jours)	Augmentation de la taille de l'embryon (x 1.2 à 1.5) Réduction de l'épaisseur de la pellucide (2/3)
Stage 8: Blastocyste éclos (9 jours)	Large cavité blastocoelique Forme arrondie et progressivement allongée
Stage 9: Expanding Hatched Blastocyste	

Tableau 3 : Classification selon le stade de développement:

Après classement, les embryons sont préparés pour la procédure de traitement suivante, qui peut inclure le sexage des cellules embryonnaires et (ou) diviser l'embryon en deux pour faire des jumeaux. Les embryons sont soit transférés immédiatement dans un récipient ou congelés pour les stockages.

3.9 FACTEURS DE VARIATIONS SUR LA RECOLTE :

- Délai de la récolte

Pour maximiser des nombre des embryons par récolte, cette dernière doit être effectuée en jour quand les plupart des embryons se trouvent au niveau utérine. Embryon bovins arrivent à l'utérus 4 jours après l'ovulation (*Hamilton et laing, 1946*). Parmi les études pratiques faites, il y a des variations des localisations des embryons au 7^{ème} jour post-insémination, il montre que quelque embryon (13% en moyenne) reste dans l'oviducte dans le quatrième jour après ovulation avec une subséquente chute en nombre des embryons et ovocytes au 5^{ème} jour (*Kaigai, 1995*).

- Méthode de récolte

Méthode non-chirurgicale est limitée dans à l'intérieur de l'utérus. Alors que, si le lavage utérin est fait avant quatrième ou cinquième jour post-ovulation, la probabilité de réussite est énormément faible. Cependant, le développement et localisation des embryons varient de l'individu à l'autre. Par contre en cas de méthode chirurgicale, la récolte a toujours succès si la récolte est faite avant quatre jours post-insémination ou plus tard. L'autre avantage pour la méthode chirurgicale est que, 10 % des embryons restent toujours au niveau oviducte 8 jours post-insémination, alors qu'avec cette méthode on augmente un taux des embryons récoltés (*Kaigai, 1995*).

- Type de cathéter et son positionnement

Il existe une diversité dans nombre des embryons obtenus utilise le cathéter à trois voies sont nombreuses (96.9%) par rapport aux embryons récoltés avec un cathéter à deux voies (90.3%) (*Newborn, 1980*). Quelques auteurs disent que la sonde avec une longueur importante pour facilement arriver au cornes utérines. Donc, il augmente un taux des embryons récoltés (*Kaigai, 1995*).

- Quantité de liquide de lavage et nombre de lavage

Quand une quantité de liquide de lavage et nombre de lavage sont insuffisant, il peut arriver que quelques embryons restent dans l'utérus. En augmenter une quantité de liquide de lavage et le nombre de lavage, on augmentera un taux des embryons récoltés (*Kaigai, 1995*).

3.10 CONSERVATION DES EMBRYONS

Les embryons peuvent être transférés immédiatement lors de la récupération et de l'évaluation ou peuvent être conservés congelés dans l'azote liquide et transférés à une date ultérieure. La congélation et décongélation est également très complexe et se traduit généralement par une participation d'environ 10 - 20% de réduction des taux de gestation de ceux observés avec des embryons frais (*INRA, UNCEIA, 1990*).

Seulement des embryons de qualité 1 qui peuvent être congelés (*INRA, UNCEIA, 1990*). La conservation à température ambiante des embryons de bovins ne peut se faire qu'au cours d'une durée très limitée environ de 48 h à 4°C dans le PBS, sous peine de voir le taux de gestation chuter après transfert (*Luc Des Coteaux et al, 2012*).

Ça présente une chute du taux de gestation si des embryons sont conservés plus de deux heures à température ambiante. Par contre, selon les études faites il n'y a pas de chute du taux de gestation pour des embryons conservés jusqu'à trois heures à une température inférieure à 28°C (*Hasler, 2001*).

3.10.1 Le cryoconservation

La conservation des embryons de bovins ne se fait plus que par congélation dans de l'azote liquide (-196°C). Des études avaient été faites il y a une quinzaine d'années sur la possibilité de réfrigérer à 0°C des embryons pour les conserver, mais les taux de survie étaient très faibles. La nécessité de l'emploi d'un cryoprotecteur est vite apparue : l'eau en gelant se dilate et cristallise, ce qui provoque l'éclatement des cellules. Il faut donc déshydrater la cellule avant de la congeler pour que l'augmentation de volume liée à la congélation se fasse dans des proportions supportables par les membranes cellulaires, et éviter la formation de cristaux. C'est le rôle primaire du cryoprotecteur.

3.10.2 Les techniques de cryoconservation

3.10.2.1 La congélation conventionnelle lente :

Avec des développements en filière de Biotechnologie de la reproduction animale, la majorité des embryons des mammifères a été congelé à l'aide d'une conventionnelle en utilisant des cryoprotecteur qui pénétrées dans les embryons très lente, un refroidissement lente et des vitesses rapides de réchauffement avant leur transfère (*Palasz et al, 1996*).

De nombreuses molécules ont été l'objet d'expériences pour évaluer leurs aptitudes en tant que cryoprotecteurs. L'effet recherché est toujours le même : une molécule qui entre dans les cellules pour remplacer l'eau mais qui ne cristallise pas en refroidissant. La difficulté la plus grande consiste à trouver des molécules qui ne soient pas toxiques pour les embryons (*Luc Des Coteaux et al, 2012*).

Il y a deux principales catégories de cryoprotecteurs utilisables :

- Ceux qui pénètrent dans les cellules de l'embryon (glycérol, DiMethylSulfOxyde (DMSO), éthanol, éthylène glycol). Glycérol, DMSO et éthylène glycol déshydrate l'eau libre intracellulaire par utilisation de différence en pression osmotique et il entre dans le cellule pour protège le cytoplasme (*A.H. Andrews et Al, 2004*).
- Ceux qui restent à l'extérieur des cellules (PVP :Polyvinylpyrrolidone, saccharose, glucose). PVC et sucrose. Ces cryoprotecteur déshydrate aussi l'eau libre intracellulaire par utilisation de différence en pression osmotique sans entre dans la cellule (*Luc Des Coteaux et al, 2012*).

Ces substances sont en général ajoutées en différentes étapes pour éviter les chocs osmotiques qui pourraient endommager les cellules embryonnaires.

a) Utilisation de l'éthylène glycol

Le glycérol a comme inconvénient de nécessiter une décongélation en trois temps minimum pour en laver les embryons au moment de la décongélation. Ces trois étapes sont rendues nécessaires par la faible perméabilité des membranes embryonnaires au glycérol.

Depuis une dizaine d'années, on a découvert des molécules auxquelles les embryons sont plus perméables : les glycols. Leur intérêt est de permettre des transferts directs, c'est-à-dire en plaçant directement la paillette décongelée dans le pistolet de transfert, sans passer par une étape d'observation de l'embryon au microscope avant de le transférer. *Szell et al. (1989)*

cités par *Voelkel et Hu (1992a)* ont montré que, placés dans une solution d'éthylène glycol à 2 M, des morulas et des blastocytes perdaient 20% de leur volume, alors que dans la même concentration de glycérol, ils perdaient 45% de leur volume.

Les glycols forment une large famille de molécules au sein de laquelle il a fallu choisir la plus performante.

- Choix du glycol

Selon les études faites par *Dochi et al. (1998)*, ils ont comparé l'efficacité de deux glycols différents, le propylène glycol et l'éthylène glycol en utilisant un lot d'embryons congelés dans du glycérol comme témoin. Les embryons dans cette expérience sont congelés dans le PBS contenant du sérum de veau fœtal et du propylène glycol à la concentration de 1,6M ou de l'éthylène glycol à la concentration de 1,8M. La solution de glycérol avait, elle, une concentration de 1,4M (*Dochi et al. (1998)*).

Ça a montré que le propylène glycol (36%) donnait un taux de gestation significativement plus faible que le glycérol (44,7 %) et l'éthylène glycol (48,5%) (*Dochi et al. (1998)*).

Les auteurs ont également remarqué que le taux de gestation baissait significativement si plus de 11 minutes s'écoulaient entre la décongélation et le transfert, l'embryon supportant mal d'être conservé à température ambiante dans un cryoprotecteur comme l'éthylène glycol.

- Concentration optimale en glycol

Voelkel et al. (1992a) ont essayé trois concentrations différentes d'éthylène glycol : 1,25M, 1,5M, 1,75M. Ils ont placé des embryons dans chacune de ces trois solutions, les ont congelés puis décongelés et placés dans un milieu de culture. Quarante-huit heures plus tard, ils les ont observés pour voir si les différentes concentrations avaient une influence sur le taux de survie. Le meilleur résultat a été obtenu pour une concentration de 1,5M, mais les deux autres solutions n'ont pas donné de résultats significativement différents.

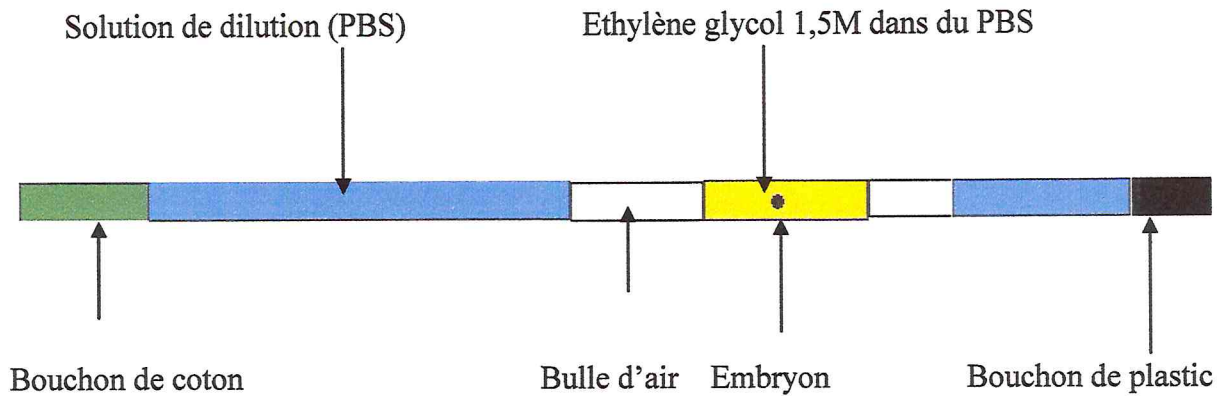


Figure 9 : Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant la congélation, contenant de l'éthylène glycol d'après Voelkel et al. (1992)

- Les paillets de congélations

La taille des pailles de transféré est souvent plastique, petit à paroi fine d'un contenu de 0.25 ou 0.5ml. En plus de la taille d'une paille, la conductibilité et le ratio volume/ surface sont est aussi des facteurs très important à prendre en considération.

Avec l'ancienne technologie, ampoule de verres sont étaient utilisé. Ils sont moins conductrices de la chaleur et le ratio volume/surface est inférieur. Avec une technologie bien avancée, l'utilisation de la paillette donne de meilleurs résultats dans la congélation de jeunes embryons (*Slade et al, 1985*).

La conductibilité d'une paille assure un échange de température plus rapide possible pendant la congélation et décongélation pour justifier ne manipulation rapide des embryons. Le titrage et tous les inscriptions de la paillette doivent être lisible une fois qu'elles sont plongées dans l'azote liquide à -196°C pour éviter la multiple sortir and entres d'une paillette chaque fois l'on veut lire ce qu'il y a écrit dessus. Voilà pourquoi des visotubes ou des codes de couleurs sont souvent utilisés.

3.10.2.2 Mise en congélation

Les molécules les plus communément utilisées sont le glycérol, le DMSO et plus récemment l'éthylène glycol. On utilise en général le glycérol à 1,0M, le DMSO à 1,5M et l'éthylène glycol à 1,2M (*Ali et Shelton, 1993*).

Pendant la mise de l'embryons dans un paillette, procéder les suivantes :

- Aspirer un quantite faible dans lequel se trouve l'embryon
- Aspirer une bulle d'air
- Aspirer l'embryon
- Aspirer un bulle d'air
- Aspirer un quantite faible dans lequel se trouve l'embryon

L'air joue un rôle très important de délimiter la région de la paillette où se trouve l'embryon. Entre deux bulles d'air, l'embryon ne peut être vers l'une ou l'autre extrémité où il risque de se coller au bouchon et d'être perdu (Voir Figure 9)

a) Contrôle de la température

Après avoir une paillette contienne une embryons, le processus qui suivre est de celle de descente de température. La paillette est place dans une boite conservée a température ambiante et elle sera placée dans le congélateur programme plutard. Les cryoprotecteurs sont ajoutés à la température ambiante, c'est-à-dire que le refroidissement commence à partir de 20°C, 25°C.

En première lieu, les paillettes sont réfrigères jusqu'à -6, -7°C à vitesse de 3°C/minute dans un bain d'azote liquide. Arrivé à cette température, il y aura une induction de la cristallisation. Après l'induction de la cristallisation et période d'équilibration de 5 minutes, il aura un ralentissement de vitesse de la descente à 1°C/min jusqu'à -30°C, 40°C. La déshydratation des cellules embryonnaires est déclenchée à ce moment là et en fin de déshydratation, l'augmentation de vitesse de refroidissement est impérative. Refroidissement lent de -28 à -35°C à raison de 0,1 °C/min. Immersion dans de l'azote liquide à -196°C.

Les temps dans chacun des bains est relativement longs et le cryoprotecteurs utilisés ont des concentrations peu toxiques ce qui donne avantage de cette méthode. Néanmoins, cette méthode besoin un congélateur programme qui est relativement chère. En plus, il faut attendre que toute les embryons soyez prêts avant démarre le cycle de refroidissement et celui-ci va prendre de temps.

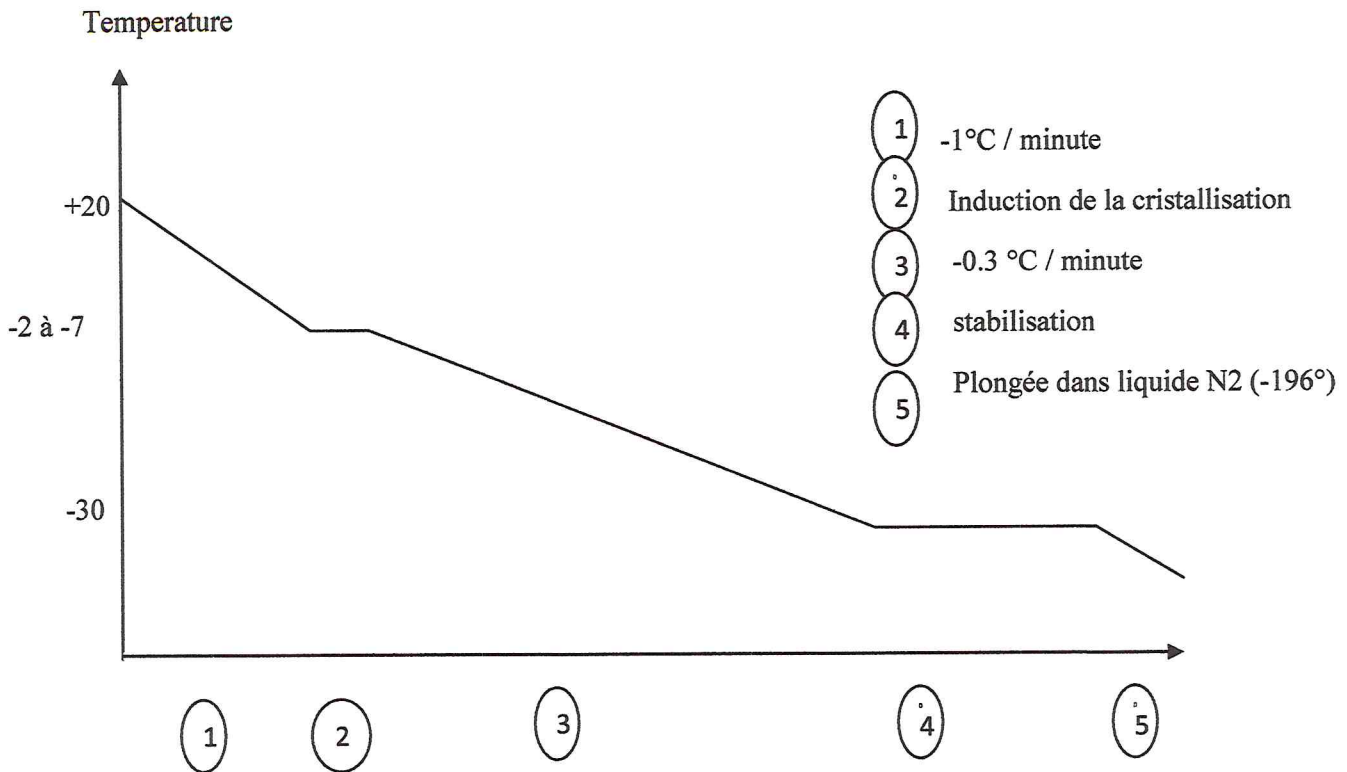


Figure 10 : La procédure du refroidissement des embryons

3.10.3 Vitrification et Vitrification ultra rapide

La vitrification est un processus thermodynamique de refroidissement au cours duquel la viscosité d'un fluide est augmentée de façon importante, jusqu'à lui donner les propriétés d'un solide. Cette méthode aboutie à éviter au maximum la formation des cristaux de glace au cours de refroidissement en transformant la phase liquide cytoplasmique en phase solide amorphe (Voire Figure N° 11).

i) Principe

Il crée une induction d'une viscosité extrême du milieu qui empêche la formation de glace intra ou extracellulaire. _ Utilisation de cryoprotecteurs pénétrants à forte concentration (25 % de glycérol et 25 % de propanediol) sont utilisées, suivie par temps de l'équilibration et refroidissement très rapide en plongeant les paillettes dans l'azote liquide. En moment de décongélation, il doit être très rapide possible par réchauffement de (250°C / min). (Hanzen, 2009)

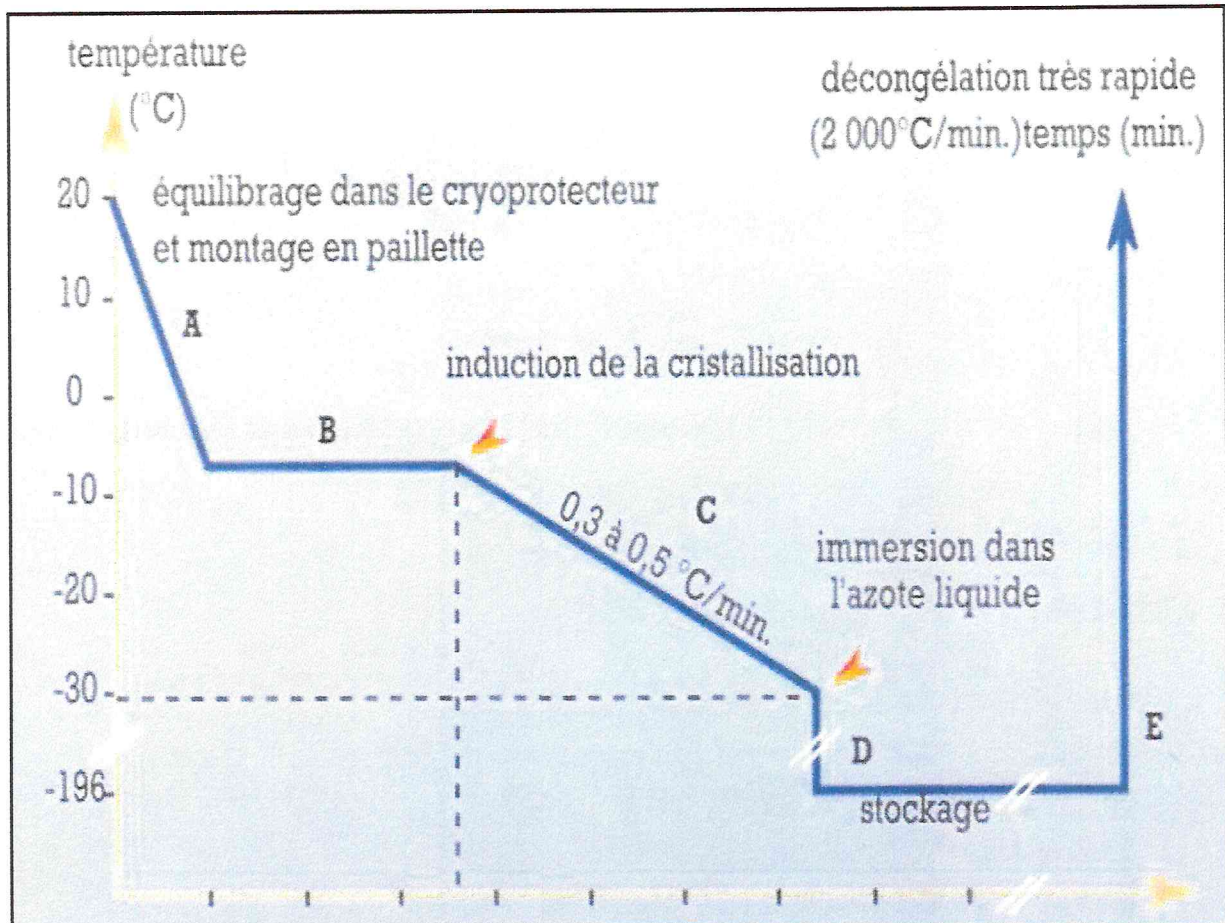


Figure 11 : Procédure de vitrification et décongélation des embryons (Bénédicte Grimard, 2003)

- Cryoprotecteurs

Une bonne solution de vitrification peut être obtenue facilement en utilisant un cryoprotecteur à forte concentration, mais c'est en général une solution qui est alors toxique pour les embryons. On utilise donc des solutions contenant un mélange de cryoprotecteurs différents pour diminuer la toxicité de chacun, ainsi que des polymères de haut poids moléculaire qui permettent de réduire les concentrations de cryoprotecteurs. Les solutions de saccharose sont également utilisées, toujours parce qu'elles évitent la sortie d'eau trop rapide des cellules (Ali et Shelton (1993).

Comme dans la méthode de congélation conventionnelle lente, les embryons subit les étapes de concentrations croissantes. Les concentrations utilise sont les élevées entre 16 % et 18% pour la technique de vitrification classique (Hochi et al 1995).

La capacité de différentes solutions à vitrifier a été étudiée en les plaçant dans des paillettes de 0,25ml et en les immergeant dans de l'azote liquide. Le but est de n'avoir de formation de cristaux ni lors du refroidissement, ni lors du réchauffement. Le DMSO et le glycérol vitrifient à 5 mol/l, l'éthylène glycol à 6,5 mol/l sont employés en association avec du sucrose et/ou du ficoll, cryoprotecteurs extracellulaires. Mais aucun ne reste complètement vitreux au cours du refroidissement. La raison proposée est qu'un noyau de glace se forme lors du refroidissement mais qu'il n'a pas le temps de grandir.

Les cryoprotecteurs sont ajoutés en deux phases :

- Quelques minutes avec des concentrations basses.
- Deuxième temps avec une concentration très élevée accompagnée d'un cryoprotecteur extracellulaire. Prendre en concentration d'une toxicité d'une concentration élevée sur les embryons

Dans la vitrification trois méthodes sont souvent utilisées. Elles sont :

■ **Vitrification classique :**

Dans cette technique, les embryons sont conditionnés dans les paillettes que celles utilisées pour la technique de congélation conventionnelle lente avec de part et d'autre de l'embryon, des bulles d'air et du sucre.

■ **Technique Open Pulled Straw (OPS)**

Dans la technique de OPS, les paillettes d'une faible épaisseur dans laquelle les embryons sont utilisés. Il y a réduction de leur diamètre (0,08 vs 1,7 mm) et réduction de l'épaisseur de leur paroi (0,07 vs 0,15 mm)

Principe :

- Incubation des embryons dans deux solutions de concentrations croissantes de DMSO et de sucrose
- Aspiration des embryons par capillarité en goutte de 2 microlitres
- Mise en place dans l'azote liquide dans une position horizontale

■ Technique de Cryoloop

La cryoloop est une technique où une boucle de nylon mince est utilisée pour suspendre un film de cryoprotecteur contenant les ovocytes et les immergeant directement dans l'azote liquide. (*Andreas Mavrides Et Al, 2002*). Elle est adaptée pour cryoconservation des embryons et des ovocytes (*Lane et Al, 1999*)

3.11 DECONGELATION

Le réchauffement des paillettes demande beaucoup moins de temps que le refroidissement. Elles sont directement placées à une température proche de la température de manipulation ultérieure dès leur sortie de la bombonne d'azote liquide.

Il en existe de deux types qualifiés de lente et de rapide. Dans l'un et l'autre cas l'objectif est de soustraire l'embryon à l'action de l'agent cryoprotecteur utilisé pour la congélation et de le réhydrater.

3.11.1 Décongélation lente (or multistep thawing)

Le contenu de la paillette est passé dans trois bains (5 minutes par bain) renfermant des concentrations décroissantes de glycérol (6.6 %, 3.3 % et 0 %) et constantes de sucrose (0.3 M), le quatrième bain ne renfermant que du PBS et assure la réhydratation de l'embryon. Cette méthode requiert du temps (1 à 2 heures) et un minimum d'équipement de laboratoire. Elle peut requérir également un microscope pour observer la qualité de l'embryon décongelé (*Hanzen, 2009*).

3.11.2 Décongélation rapide (or one-step thawing)

La paillette est décongelée à la température ambiante (20°C). Cette décongélation rapide implique cependant l'utilisation lors du montage de la paillette et donc de sa congélation l'utilisation de sucrose. Pour ce faire, l'embryon est équilibré pendant une vingtaine de minutes dans une solution de glycérol 1.36 M et de sucrose 0.25 M. Lors du montage de la paillette, on aspire successivement le sucrose 0.5M (4 cm), une bulle d'air, le mélange glycérol 1.36M et sucrose 0.25M renfermant l'embryon (1 cm), une bulle d'air et le sucrose 0.5M (6cm). La décongélation de la paillette assure le mélange des solutions et donc soustrait l'embryon au glycérol, la réhydratation de l'embryon étant assuré lors de sa mise en

place dans l'utérus. Cette méthode offre de réels avantages sur le terrain puisqu'elle dispense le praticien d'avoir du matériel de laboratoire, le transfert ressemblant dans ce cas à une insémination classique (*Hanzen, 2009*).

Le taux de survie des embryons varie de 73 à 90% pour ceux qui sont restés une ou deux minutes dans le milieu d'équilibration (La solution d'équilibration : solution de vitrification diluée à 50% dans une solution de PBS), alors qu'il chute de manière significative ($p < 0,05$) à 20% pour ceux qui y ont restés cinq minutes. Ceci peut être dû à la toxicité d'un ou des produits. Comme il s'agit de petites molécules qui traversent facilement les membranes, un temps de contact court est suffisant pour assurer une bonne cryoprotection sans engendrer de troubles par toxicité des produits (*Ishmori Et Al, 1993*).

3.12 TRANSFERT D'EMBRYON

Tout abord, il faut qu'on assure que la vache receveuse soit en bonne stade du cycle œstral, c'est-à-dire ; 6 à 7 jours post-chaudeur ou dans le cas d'un transfert à l'état frais, le transfert est faite le même jour que la récolte. A ce moment la, la vache receveuse port un corps jaune fonctionnelle qui produit la progestérone.

La méthode non-chirurgicale (transcervicale) est souvent utilisée comme celle-ci dans le processus d'insémination artificielle. Une anesthésie épidurale est réalisée et en utilisant une pistole d'insémination, les embryons sont place dans la corne utérine correspondant à l'ovaire portant le corps jaune qui doit être constante auparavant par fouille rectale or échographie.

A partir du 42^{ème} jour après le transfer, on peut réaliser un diagnostic de la gestation par échographie ou dosage hormonale (*A.H. Andrews, 2004*).

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Introduction :

La technologie de congélation des embryons bovins a permis des échanges de matériels génétiques à l'échelle nationale et internationale. En plus, elle permet de réaliser la conservation de la diversité génétique des races femelles domestique et à gérer de façon plus économique les receveuses (INRA, prod. Anim.1998).

Les premiers essais de transfert d'embryons après congélation par les méthodes classiques (congélation lente, utilisation de DMSO ou glycérol comme cryoprotecteur, dilution en plusieurs étapes lors de la décongélation) qui a été réalisé dans les années 1980 montrent un taux de gestation de l'ordre de 30 à 40%.

2. Objectif :

L'objectif de cette étude est de maîtriser le processus de production d'embryons in vivo (suivi de la cyclicité, superovulation et récolte), puis congeler les meilleurs embryons et les transférer par la suite.

3. Matériels et Méthode

3.1 Matériels

3.1.1 Animaux

Notre cheptel expérimental se compose de 6 vaches donneuses de race Holstein sélectionnées sur la base de critères zootechniques et sanitaires. Un contrôle préalable de la cyclicité a été effectué préalablement. Toutes les vaches appartiennent à la station Expérimentale de l'université de Blida et sont dans les mêmes conditions d'élevage.

Photo N° 1 : Station Expérimentale de l'université de Blida



Tableau N° 3 : Les vaches donneuses utilisées en expérimentation

	Vache 1	Vache 2	Vache 3	Vache 4	Vache 5
Age (ans)	3	5	3	5	5
Score Corporelle	3	2.5	3	3	2.5
Protocol de traitement de superovulation	8 injections	8 injections	3 injections	3 injections	3 injections

3.1.2 Médicaments et Milieux

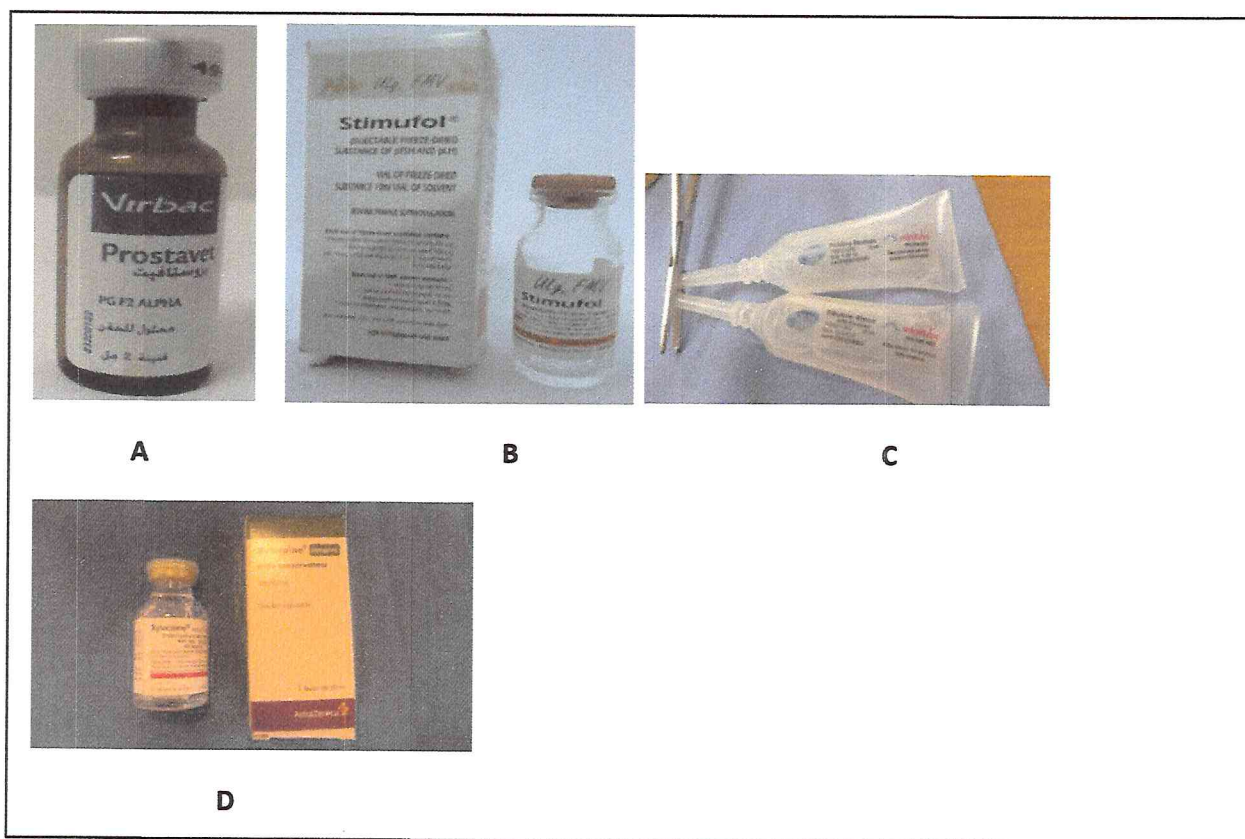


Photo N° 2 : Médicaments et Milieux A : prostaglandine, B : Stimufol, C : Cryoprotecteur, D : Xylocaine)

- Antibiotique (Tetracycline)
- Hormone : Stimufol 20% : 500µg FSH et 100 µg LH et Prostaglandine (Prostavet)
- Anesthésie Epidurale (Xylocaine 5cc)
- Cryoprotecteur (éthylène glycol)
- Azote Liquide

3.1.3 Matériels d'insémination et récolte

- Travail de contention, Pince mouchette, Licol
- Pistole d'insémination
- Sonde de récolte type Folley : Une voie permet de gonfler le ballonnet, tandis que la seconde permet d'injecter et de récupérer en alternance le liquide de récolte des embryons. Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre plus rigide
- Seringues de 20ml et 50ml : Pour dilater le ballonnet et administrer le PBS dans une sonde.
- Chemise sanitaire : Pour protéger la sonde pendant leur introduction dans le tractus.
- 02 flacons en verre de 1l : Pour collecter le liquide de lavage de chaque corne.
- Dilatateur cervicale : Pour dilater le col en cas d'obstruction
- Boîtes de pétrie quadrilles : Pour faciliter la mise en évidence des embryons
- Microscope inverse



Photo N° 3 : Matériels de la récolte embryonnaire : A : Echographe, B : Ciseaux, C : Bétadine, D : Gans, E : Sonde dilatatrice, F : Sonde de Folley avec mandrin, G : Chemise sanitaire, H : Seringue 20cc, I : Deux Seringue 50cc, J : Flacon de 900L, K : PBS, L : Xylocaine, M : Seringue 5cc

3.1.4 Matériels de recherches

- Boîte de pétri quadrillés de huit centimètre de diamètre et une plus petite de 3.5 cm de diamètre.
- tubule en silicone ;
- microscope renversé ;
- un flacon de milieu nutritif pour embryons (holding medium) ;
- paillette pour embryons

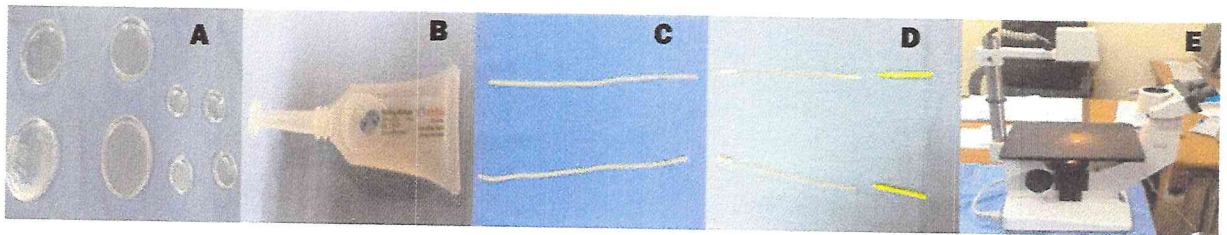


Photo N° 4 : Matériels de recherche des embryons (A : Boîte pétri moyenne et petite, B : Holding medium, C : Tubule en silicone, D : Paillette pour embryons, E : Microscope inverser)

3.1.5 Matériels de congélation

- Biocongélateur programmable ms21 (IMV, France)
- Paillette transparentes 0.25 ml

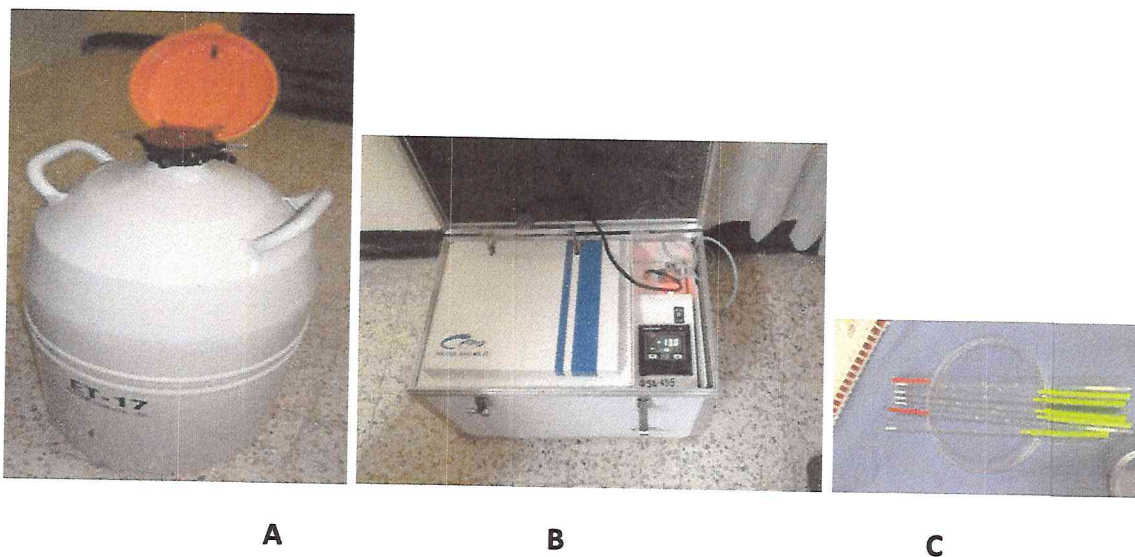


Photo N° 5 : Matériels de congélation (A : Azote liquide, B : Biocongélateur programmable, C : Paillette transparentes 0.25 ml)

3.2 Méthode

Notre objectif est d'étudier la réaction globale des vaches puis comparer les résultats des deux protocoles de superovulation utilisés.

3.2.1 Suivi de la cyclicité

L'observation quotidienne des chaleurs, est la méthode utilisée pour suivre la cyclicité des vaches dans cette étude selon le score proposé par *F van Eerdenburg, 2003*

Tableau N° 4 : Hiérarchie des signes d'œstrus d'après F van Eerdenburg, 2003

Ecoulement muqueux	3
Flehmen	3
Nervosité	5
Est montée mais n'accepte pas	10
Reniflement vulvaire d'une autre vache	10
Encolure placée sur une autre vache	15
Monte active par derrière	35
Monte active par devant	45
Acceptation du chevauchement	100

3.2.2 La superovulation

Deux protocoles de superovulation ont été utilisés. Dans le premier protocole, huit injections de pFSH (stimufol 20%) à dose décroissante utilisé sur vache 1 et vache 2. Dans le deuxième protocole, trois injections de pFSH (Stimufol 20%) sur trois vaches (Vache 3, Vache 4 et vache 5). Dans les deux protocoles, l'hormone est administrée par voie intramusculaire à J10 post chaleur de référence.

Tableau N° 5: Protocole de superovulation à 8 injections de FSH/LH

Jours	Traitement		
J0	Chaleur de référence		
	Hormone	Matin (AM)	Soir (PM)
J10	FSH/ LH	2 cc	2cc
J11		1.5cc	1.5cc
J12		1 cc plus PGF2 Alpha	1cc
J13		0.5cc	0.5cc
J14		IA ₁	IA ₂
J21	Récolte des embryons		

Tableau N° 6 : Protocole de superovulation à 3 injections

Jours		
J0	Chaleur de référence	
	Hormone	Dose /jour
J10	FSH/ LH	3 cc
J11		3 cc
J12		3 cc plus PGF2 Alpha
J14		IA ₁ , IA ₂ 12 h d'intervalle
J21		Récolte

3.2.3 La récolte d'embryon :

Tous les embryons utilisés dans cette étude sont produit in vivo. Six vaches donneuses ont été utilisées pour cette étude. La récolte des embryons a été fait au 7^{ème} jour post chaleur ou post insémination des vaches laitières, non allaitante et récoltées par la méthode non chirurgicale (transcerviale) avec une sonde à deux voies (sonde de type Folley).

- La vache est placée dans un travail de contention puis on fait une exploration rectale pour compter le nombre de corps jaune au niveau des deux ovaires.
- une anesthésie épidurale avec 5ml de Xylocaine (Chlorhydrate de Lidocaine) entre première et deuxième espace intercoccygien est réalisé pour faciliter la manipulation

de l'appareil génital puis le rectum et la région vulvaire sont lavés et désinfectés à base de bétadine solution antiseptique.

- La sonde de récolte est rincée avec PBS (Phosphate Buffered Solution), recouvert d'une chemise sanitaire et introduite dans le vagin dirigé vers le plafond pour éviter le méat urinaire. En cas d'obstruction, on a utilisé le dilateur cervical pour dilater le cervix.
- Une fois arrivé au col, la chemise sanitaire est rompue, le col est franchi et la sonde est introduite dans l'une des cornes et le ballonnet est gonflé avec 15 ml d'air.
- Puis on perfuse la corne avec le PBS (2 fois 20ml, 30 ml, 40 ml puis 50 ml, 20 ml et 30 ml d'air) et on récolte le liquide dans un flacon de 1 litre.
- On dégonfle le ballonnet et faire sortir le sonde puis on a procédé la même procédure pour l'autre corne.
- A la fin de la récolte on injecte de la prostaglandine pour induire les chaleurs et un antibiotique pour éviter les infections.

Pour rechercher des embryons, on laisse le liquide de récolte décanter pendant 15 min. Puis, on aspire le surnageant. Par la suite, on verse le liquide dans les boîtes de pétrie quadrilles et les embryons sont recherchés avec le microscope inversé.

3.2.4 La congélation des embryons :

Dix embryons de très bonne qualité (six embryon de classe 1 et quatre de classe 2) ont été congelés dans l'azote liquide.

- Après leur évaluation morphologique, les embryons sont prélevés du liquide de récolte vers un milieu de conservation pour 10 minutes à température ambiante afin d'obtenir un équilibre osmotique puis dans le milieu de cryprotection (1.5 éthylène glycol + 0.5 sucrose), puis ils sont conditionnés dans les paillette.
- les paillette sont mis dans le Biocongélateur programmable à -7°C pour une stabilisation de 5 minutes
- Induction de la cristallisation en touchant la paroi de la paillette avec une pince refroidie dans l'azote liquide, on fait ensuite une deuxième stabilisation à -7°C pendant 5 minutes.
- On amorce vers la fin la congélation avec une baisse de température de $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -30°C , puis la paillette est plongée dans l'azote liquide à -196°C jusqu'au jour du transfert.

4. RESULTATS

4.1 Venu en chaleurs de superovulation

Toutes les vaches (Vache 1 et Vache 2) qui subit un traitement de superovulation avec 8 injections de pFSH, montrent les signes de chaleurs 48 heures après l'injection de prostaglandine. Parmi les trois vaches qui sont superovulés avec trois injections, une seule vache (Vache 3), venu en chaleurs 48 heures post-prostaglandine.

Tableau N° 7 : Comparaison de venu en chaleurs de deux protocoles

Vaches	Chaleurs par rapport à l'injection de PG	
	Avant 48 h	Après 48 h
Vache 1	-	+
Vache 2	-	+
Vache 3	+	-
	-	+
Vache 4	-	+
Vache 5	-	+

4.2 Réaction Ovarienne

Les résultats de réaction des vaches au traitement de superovulation est déterminé par le nombre de corps jaunes palpable sur cornes utérine le jour même de la récolte. Les résultats de deux protocoles sont comparés comme ci-dessous :

Tableau N° 8 : La réaction ovarienne des deux protocoles

Vaches	Protocole	Nombre CJ/vache
Vache 1	8 injections	21.5
Vache 2	8 injections	4
Vache 3	3 injections	12
Vache 4	3 injections	10
Vache 5	3 injections	7.5
Moyenne		11

Le nombre de corps jaunes obtenus avec le traitement à 8 injections (protocole 1) sont supérieur par rapport à celle de 3 injections (protocole 2). Nous avons obtenus une moyenne de 12.75 corps jaunes per vache qui subit un traitement à 8 injections. Par contre, avec 3 injections, nous avons obtenus une moyenne de 9.83 corps jaunes per vache.

4.3 Résultats de la récolte

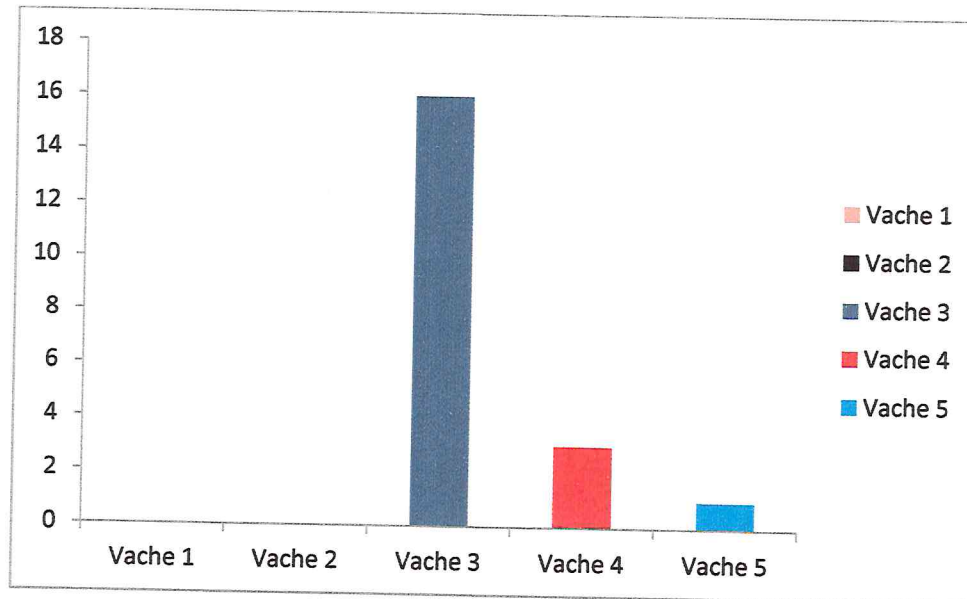
Durant de l'étude expérimentale de notre travail, on a fait 8 récoltes et on a obtenu 15 embryons dont 11 sont utilisable. Lors de la manipulation, on a perdu deux embryons. Les résultats de la récolté sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau N° 9 : Résultat de la récolté embryonnaire

Numéro de Vache	Nombre de récolte	Protocole	Nombre totale d'embryons récoltés	Nombre d'embryons utilisables	Nombre d'embryons congelables	Nombre d'ONF	Nombre d'embryons déclassés
Vache 1	02	8 injections	00	00	00	15	00
Vache 2	01	8 injections	00	00	00	00	00
Vache 3	02	3 injections	16	10	10	03	03
Vache 4	01	3 injections	03	00	00	03	03
Vache 5	02	3 injections	01	01	01	02	00
Moyenne			4	2.2	2.2	4.6	1.4

Selon les résultats, nous avons obtenus une moyenne de 4 embryons par vache, dont 2.2 sont utilisable.

Figure N° 10 : Nombre des embryons récolte



Résultats du classement des embryons

La recherche des embryons se fait sous microscope binoculaire inverse par la suite on les a classifiés (D'après INRA, UNCEIA, 1990).

Tableau N° 11 : Résultats du classement des embryons

Classe	Nombre obtenu
Classe 1	6
Classe 2	4
Classe 3	1
Dégénérés	7
Ovocytes non-fécondés	23

Tableau N° 12 : Comparaison des paramètres de deux protocoles

Paramètre	Protocole 1	Protocole 2
Venue en chaleurs (par/PG)	60 hrs	48 hrs
Nbre CJ/vache	12.75	9.83
Emb. récoltés	00	17
Emb. utilisable	00	10
ONF	15	8

4.4 Congélation

Tableau N° 13: Les embryons congelés

Catégorie d'embryon	Nombre d'embryons
Stade Blastocyste	6
Stade Morula	4
Nombre Totale des embryons congelés	10

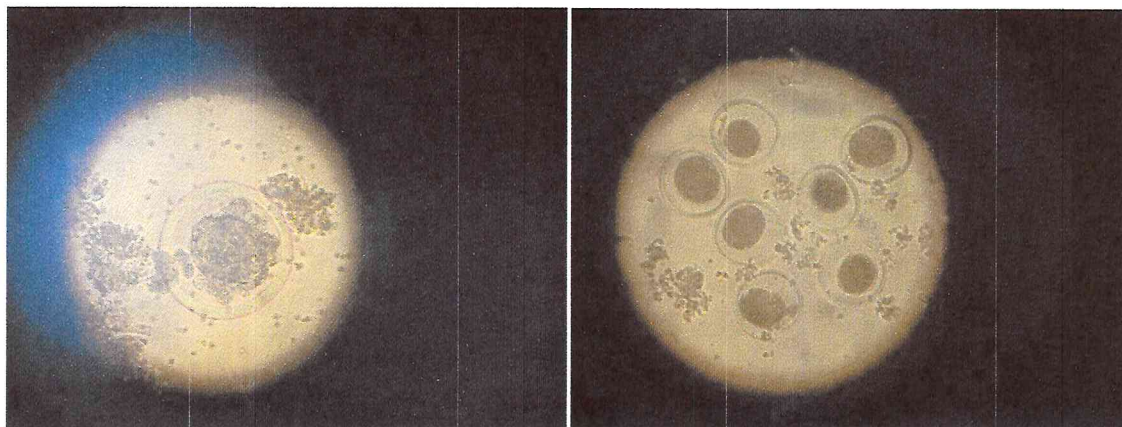


Photo N° 6 : Jeune blastocystes

Photo N° 7 : Ovocytes non-fécondés

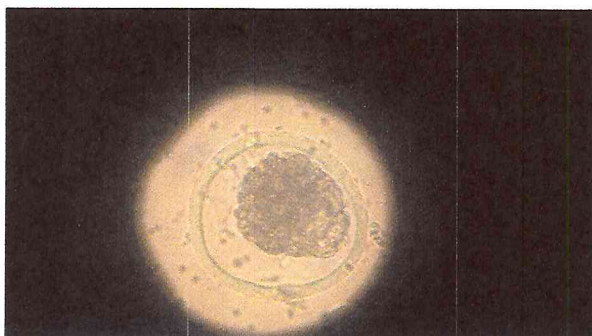


Photo N° 8 : Embryon à stade morula



Photo N° 9 : Embryon dégénère

5. Discussion

Nos résultats montrent que les vaches ont répondu au traitement de superovulation avec un intervalle moyen PG – chaleurs de superovulation de 54 h. Cette moyenne est supérieure à celle obtenue par *Ferrouk M. et al (2008)* et *dalton et al, 2000*, qui sont 39,5 h et 39.4 h respectivement.

Toutes les vaches dans notre étude ont répondu au traitement avec présentation de plus de 4 corps jaunes par vache. Ces résultats sont en conformité avec l'hypothèse de Hanzen, 2009, qui a fait une estimation générale que dans un traitement de superovulation, 85% des vaches répondent au traitement avec plus de 2 corps jaunes. La moyenne de corps jaune que nous avons obtenus sur un effectif de 5 vaches est de 11 CJ/vache, ce qui est supérieur à celui de Hady Senghor, Sénégal (1995) avec le protocole classique de 8 injections sur un effectif de 5 vaches avec 8 corps jaunes en totale et une moyenne de 5.6 corps jaunes par vache.

Sur un cheptel de 5 vaches utilisées dans notre étude, 20 embryons sont récoltés avec une moyenne de 4 embryons par vache. Ce résultat est inférieur au celui de Kellou R. et al, (2010) qui a obtenu une moyenne de 15.5 par vache d'un protocole de 3 injections (Stimufol 40%). Par contre, nos résultats sont supérieurs à celle de Hady Senghor, 1995 qui a obtenu 10 embryons avec une moyenne de 3.25 par vache sur un effectif de 4 vaches.

L'objectif de notre étude est de maîtriser les différentes étapes du processus de production d'embryons in vivo ce qui nous a conduit à comparer les résultats de deux protocoles différents de superovulation (protocole 1 et 2 respectivement à 8 et 3 injections de FSH). Pour le protocole 1, les vaches sont venues en chaleur de superovulation en moyenne de 60 heures post PGF2 alpha, alors que les vaches dans protocole 2, ont présentées les chaleurs de superovulation en moyenne de 48 heures.

Toutes les vaches dans les deux protocoles ont répondu au traitement avec des réactions ovariennes variant de 12.75 corps jaune par vache et 9.83 corps jaune par vache dans protocole 2. *Kanitz et al, 2002* ont montré que le nombre d'ovulation augmente avec la dose d' FSH jusqu'à une dose optimum au delà de laquelle la réponse au traitement de superovulation diminue. Cependant, il y a une différence notable dans les résultats de récolte et le nombre des embryons produits. Le protocole 1 ne nous a donné aucun embryon

utilisable, mais que des ovocytes non fécondés et quelques embryons dégénérés par contre le protocole 2 nous a permis d'obtenir 16 embryons en total dont 11 embryons utilisable dont 10 congelable (classe 1 et 2). Le même constat a été fait par Slezakova M et al en 2008.

Selon Bo et al. 2002, Mapleloft et al. 2002, la variation des réponses de superovulation, le temps et l'effort nécessaire, la détection des chaleurs sont les facteurs primaires affectant la production et utilisation de la technologie de transfert d'embryon dans les programmes d'amélioration génétique.

Le nombre important d'ovocytes non-fécondés (Photo n°7) que nous avons récoltés chez les vaches qui subissent 8 injections, peut être expliqué par des facteurs de stress. La répétition de traitement est stressante pour la vache et il se traduit par une diminution de la production d'embryons, diminution significative de nombres d'embryons déclassés (*Nibart et Humblot, 1997 ; Looney et al, 1981 ; Kelly et al, 1997*).

6. Conclusion

Les processus de production d'embryons in vivo ont conduit à la modification constante des protocoles de superovulation dans le but d'obtenir un nombre maximal d'embryons viable et utilisable.

Dans notre étude malgré que le protocole à 8 injections a induit une réaction ovarienne satisfaisante, le protocole à 3 injections a montré à produire fiablement les embryons viables et utilisables. La présentation des chaleurs de superovulation avant 48 heures post PGF2_{alpha} donne des meilleurs résultats en nombre et qualité d'embryon produit.

Selon ces renseignements, nous pouvons considérer le protocole à 3 injections comme satisfaisant pour la production des embryons in vivo.

7. Recommandations

- Réalisation d'une double récolte pour améliorer les résultats de récolte.
- Refaire l'expérimentation sur un effectif plus importante avec les mêmes protocoles.
- Une amélioration des conditions d'élevage surtout un point de vue alimentation.

REFERENCES

1. **A.H. Andrews, 2004**, Second edition, Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle, Blackwell Science Ltd, page 552 – 572, 634 -645
2. **A.J.Peterson, R S-F Lee (2003)**, Improving successful pregnancy after embryo transfer. Theriogenology.
3. **Bénédicte Grimard, 2003**, La transplantation embryonnaire dans l'espèce bovine, UP Zootechnie Economie Rurale
4. **Bo G.A., Mapletoft R.J. 2012**; Recent advances in the control of follicular development and superovulation protocols in cattle. 28th Scientific meeting, Saint Malo, France.
5. **Bo G.A et Al, 2014**, Historical perspective and recent research on superovulation in cattle, Theriogenology
6. **Dalton Jc et al, 2000**, The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in super ovulated cows.j.Anim.Sci.78: 2081 -2085
7. **Ch. Hanzen, 2005** La production d'embryons in vivo
8. **Ch Hanzen, 2013**, La production d'embryons in vivo
9. **D. K. Berg, J. Van Leuven et al (2010)**, Embryo loss in cattle between day 7 and day 1- of pregnancy. Theriogenology
10. **Emmeline, Marie –Alexandrine Wurth, (2010)**.thèse: Etude comparative de l'ovulation chez les mammifères.
11. **E.S.E. Hafez et B.Hafez, 7th Edition**, Reproduction in Farm Animal, Lippincott Williams et Williams, ISBN: 0-683-30577-8
12. **FAO Cooperate Document Repository, 2008**, Training Manual for Embryon transfer in Cattle.
13. **Ferrouk Mustapha, Adel Djallal et al, 2008**, production of embryos in Algerian « cheurfa » bovine breed
14. **Hady Senghor (1995)**. These : Transfert d'embryons dans une unité laitière : La soca
15. **Hanzen Ch, (2005, 2009)**. La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine. Theriogenology
16. **Hasler JF (2004)**, Factors influencing the success of embryo in Cattle, 23^{ème} congrès mondial de Buiatrie, Quebec, Canada.

17. **Jamie E. Larson**, 2011, Embryo Transfer in the Dairy Herd, Mississippi State University, Publication 2682
18. **Jared McNaughttan** (2004). The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifer embryo transfer recipients.
19. **J Derivaux F. Ectors**, 1980, Physiopathologie de la Gestation et Obstétrique Vétérinaire, Edition du Point Vétérinaire, ISBN: 2-86326-009-3
20. **Kanitz W. et al**, (2003), Super ovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Repro.Nutr.Dev.* 42(2002)
21. **Kelly et Al**, Superovulation in Cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns, *Anim Repro Sci*; 46; 1-14
22. **Kiagai**, 1995 Manual of Bovine Embryo Transfer, Japan Livestock Technology Association
23. **Luc DesCoteaux**, 2012, Gestion de la reproduction des bovins laitiers, Edition Med'Com, ISBN : 978-2-35403-093-3
24. **Monniaux D**, (2012). Super ovulatory response and embryo production in ruminants: lessons from ovary. 28th scientific meeting, Saint Malo, France
25. **Nibart et Al**, 1997, Les Gonadotropines, INRA Editions ED, Paris
26. **R.J.Mapletoft, G. A. Bo**, (2013). Innovative strategies for super ovulation in cattle. *Anim.Repro.*, v 10, n3, p 174- 179.
27. **R.J.Mapletoft**, 1985, Embryo Transfer in the cow: General procedures. *Rev. Sci.tech* 4(4), 843-858
28. **Slezakova M, et al**, (2008). The relationship between the number of corpus luteum and embryo quality. 24^{ème} 24th scientific meeting, PAU, France.
29. **UNCEIA**, 2010, UNCEIA D' après Elevage et Insémination