RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉM

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEU

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB DE BLIDA

FACULTÉ DES SCIENCES AGRO -VÉTÉRINAIRES ET BIOLOGIQUES

DÉPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES

807THV-1

Projet de fin d'étude en Vue de l'obtention du diplôme de Docteur en vétérinaire

Thème :

Production et transfert d'embryons bovins dans la région de Blida

Présenté par : **ZEBIR Ilhem**

Promoteur: **Dr ADEL Djallel** MAA USDB

Jury:

Président: **Mr. FERROUK Mustapha** MCB USDB

Examinateur : **Mr YAHIMI Abd Alkarime** MCB USDB

Année universitaire : 2012 /2013

Table des matières :

I Liste des figures et tableaux

II Abréviations

III Remerciements

IV Dédicace

V Résumé

VIAbstract

Partie bibliographique

Introduction générale.....1

Chapitre I Physiologie du fonctionnement ovarien dans l'espèce bovine

1. Introduction 2

2. Aspect morphologique du développement follicullaire :.....2

2.1. Dynamie du développement follicullaire : 2

2.1.1. Phase de multiplication.....2

2.1.2. Phase de croissance 3

2.1.2.1. Le follicule primordial.....4

2.1.2.2. Le follicule primaire 4

2.1.2.3. Le follicule secondaire 5

2.1.2.4. Le follicule tertiaire 5

2.1.2.5. Le follicule mur ou le follicule de Graaf .....5.

2.1.3. Phase de maturation 6

2.2. L'atrésie folliculaire 7

2.3. Notion des vagues follicullaire 7

2.3.1. Recrutement .....8.

2.3.2. Sélection 9

2.3.3. Dominance 10

3. Physiologie du Le cycle oestral.....11

4. Les phases du cycle oestral 12

4.1. Œstrus 12

4.2. Metoestrus 13

4.3. Dioestrus 13
4.4. Proestrus 13
5. Les hormones intervennant dans la régulation du cycle oestral. 14
5.1. Originehypothalamique:.....14
5.1.1.GnRH.....14
5.2. Origine hypophysaire : 14
5.2.1.FSH.....14
5.2.2.LH.....14
5.3. Origine folliculaire: 15
5.3.1. Action inhibitrice sur la croissance folliculaire..... 15
5.3.1.1. Inhibine 15
5.3.1.2. GCIF (Granulosa Cell Inhibitory Factor).....15
5.3.2. Action stimulante sur la croissance folliculaire..... 15
5.3.2.1. Follistatine.....15
5.3.2.2. Insuline et IGFs.....15
5.3.2.3.Somatotropine ou Growth Hormone(GH).....16
5.4. Hormones ovariennes.....16
5.4.1. OEstrogènes (17 beta oestradiol) 16
5.4.2. Progestérone.....17
5.5. Prostaglandines 17
6. fécondation et développement embryonnaire 17

Chapitre II : *Super-ovulation et récolte d'embryon*

1. Superovulation : 20
1.1. Le choix de donneuses.....20
1.1.1. Age.....20
1.1.2. Etat sanitaire 20
1.2.Les différentes hormones utilisées dans le traitement de superovulation.....21
1.2.1. Les extraits hypophysaires:.....22
1.2.1.1. FSH 22
1.2.2.eCG..... 23
.1.3. Facteurs déterminants la réponse de superovulation : 25

1.3.1 Facteurs intrinsèques à la donneuse ..... .25
1.3.1.1. Age 25
1.3.1.2. Etat sanitaire 26
1.3.1.3. Stade du cycle œstral au moment de la supeovulation.....26
1.3.1.4. Variation du temps de maturation des follicules et moment de l'IA 27
1.3.2. Facteurs extrinsèques à la donneuse.....28
1.3.2.1. Température, saison et environnement 28
1.3.2.2. Nombre de superovulations précédentes 29
1.3.2.3. Effet de l'insémination artificielle et de la semence.....29
1.3.2.4. Nutrition 29
1.3.2.5. Méthode de récolte 30
2. Récolte d'embryons 31
2.1. Méthodes de récolte.....31
2.1.1. Méthode chirurgical 31
2.1.2. Méthode non chirurgicale 32
2.2. Examen et classement des embryons : 33
Chapitre III : Cryoconservation des embryons.....*38*
1.Introduction 38
2. Principe de la cryoconservation.....38
3. Intérêt de la cryoconservation 38
4. **Types de cryoprotecteurs** 39
5. Rôle cryoprotecteurs 39
6. **Les dommages engendrés par la cryoconservation** 40
6.1. Formation de glace intra cellulaire 40
6.2. La surfusion 40
6.3.Effet solution 40
7. Les méthodes de cryoconservation.....41
7.1. La congélation lente.....41
7.1.1. Principe 41
7.1.2. Avantage 42

7.1.3. Inconvénients 42
7.2. **La vitrification**.....43
7.2.1. Principe.....43
7.2.2. Avantage.....43
7.2.3. Inconvénients 44
7.2. La vitrification ultra rapide.....44
8. **Facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation** 45
8.1. Origine des embryons (production *in vivo* ou *in vitro)* *45*
8.2. Stade de développement 46

Chapitre IV : *Le transfert embryonnaire*

1. Historique du transfert embryonnaire en Algérie 47
2. Intérêt du transfert embryonnaire chez la vache:.....47
3. Réalisation du transfert :.....49
4. Méthode chirurgicale: 49
5. Méthode non chirurgicale ou cervicale : 50

La partie expérimentale

1. Objectifs 51
2. Matériels et méthodes.....51
2.1. Matériel :..... 51
2.1.1. Lieux des expérimentations:..... 51
2.1.2. Animaux:.....52
2.1.3. Hormones et produits utilisés: 52
2.1.4 Matériel de récolte : 53
2.2. Méthode :.....54
2.2.1. Détection de chaleurs:..... 54

2.2.2 Superovulation, insémination des donneuses :.....54

2.2.2.1 Protocol de superovulation :.....54

2.2.2.2. Apparition des chaleurs et Inséminations artificielles 56

2.2.3. Récolte des embryons: 56

2.2.3.1. Technique de récolte: 56

2.2.3.2. Recherche et classification des embryons : 58

2.2.3.3.. Mise en paillette et cryoconservation :.....60

3. résultats 60

3.1. Résultat de suivie de la cyclicité: 60

3.2. Chaleurs de superovulation par rapport à l'injection de prostaglandine :.....61

3.3. Réaction ovarienne : 61

3.4. Nombre et qualité des embryons 61

4. Discussion 63

5. conclusion.....

Recommandation:

Liste des figures et tableaux :

Figure 1: Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien (d'après **Drion et al., 1996).**

Figure 2 : Rôles relatifs des gonadotrophines et des facteurs de croissance au cours développement folliculaire (d'après **WEBB, 1999).**

Figure 3 : Évènements hormonaux et ovariens du cycle oestral de la vache à 2 vagues folliculaires (**Adams et *al.* 2008).**

Figure 4 : Stade du développement embryonnaire de la fécondation à l'élongation du blastocyste (**UNCEIA** Groupe Fertilité Femelle, **2006).**

Figure 5 : Schema de traitement hormonaux des donneuses et des receveuses cyclé (**Dominique 2003).**

Figure6 : Schema de traitement hormonaux des donneuses et des receveuses cyclé(**Dominique 2003).**

Figure 7 : Collecte par voie chirurgicale (Idres T, 2011).

Figure 8 : Sonde à deux voies dite de Foley avec et sans ballonnet gonflé (Kuzan et Seidel, 1986).

Figure 9 : Position de la sonde de Foley pour un Flushing des cornes utérine (Seidel 1991).

Figure10 : Congélation lente (paillette de 0,25ml) (Guingot 2005).

Figure11: Vitrification (paillette de 0,25 ml) ou congélation lente avec transfert direct(Guingot 2005)..

Figure12: Cryoloop contenant deux embryons (d'après Lane *et al*, 1999)

Figure13: Tube où est rangée la cryoloop (d'après Lane *et al*, 1999)

Figure14 : Schéma chronologique de l'expérimentation pour la PN 903.

Photo1: Palpation transrectale en vue de l'appréciation du nombre de corps jaune.

Photo2: Anesthésie épidurale basse

Photo3: Introduction de la sonde de Folley

Photo4 : flacons en verre cotennant le liquide de rinçage des deux cornes uterines .

Photo 5: Recherche des embryons dans le liquide récolté.

Photo6: Aspiration de l'embryon avec suringue à insuline

Photo7: Holding medium Bovi Pro Minitube®.

Photo8 : embryon de stade morula classe II.

Tableau1: Stades de développement embryonnaire normale en fonction des jours de l'œstrus d'une donneuse (Seidel et al ; 1991)

Tableau2: Taux de gestation des embryons classés dans 4 groupes basés sur la morphologie (Seidel et al, 1991)

Tableau3: Notion d'embryon de vache sur des bases et des carecteristiques morphologiques (d'après Kennedy et al 1983).

Tableau 4: Classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA- UNCEIA 1990).

Tableau5: Protocoles FSH-50.

Tableau6: résultats de la cyclicité.

Tableau 7: résultat de la réaction ovarienne.

Abbreviations:

CJ: corps jaune

DMSO: dimethlsulfoxide ecg equine gonadotrophin

E2: oestradiol 17*B*

eCG : equine **C**horoionic **G**onadotrophine

ET: embryon transféré

FSH: follicle stimulating hormone

GnRH: Gonadotrophine releasing hormone

GH: Growth Hormone

hCG: human chorionic gonadotrophine

IA: insemination artifitielle

IGF-1: Insulin like growth factor 1

IA : intramusculaire

IV : intraveineuse

J : jour

LH: luteinising hormone

M : mole

Mg : milligramme

mm : millimètre

µm : micromètre

MIS :meiosis inductive substance

nbr : nombre

OMTE: ovulation multiple et transfert embryonnaire

OPS: open pulled straw

PBS: phosphate bufferd saline

PG: prostaglandine

PGF2*a*: prostaglandine 2 *a*

PMSG: pregnant mare stimulating gonadotropin

P4: progesterone

PVA: polyvinylalcool

ZP: zone pillucide

TGF-b: transforming growth factor-b.

TE: transfert embryonnaire

UA: unité armor

UI: unite international

Remerciements

Je rende grâce à Dieu le tout puissant de m'avoir illuminé et ouvert les portes du savoir et donné la volonté et le courage, pour accomplir ce travail qui est pour moi le point de départ d'une merveilleuse carrière.

Je tiens à exprimer mon gratitude à mon promoteur Dr ADEL Djallel; pour son soutien, sa grande disponibilité et ses conseils qui ont permis d'améliorer les différents chapitres de ce travail.

Mes sincères remerciements à Mr FERROUK Mustapha de m'avoir honoré en acceptant de présider le jury.

Je tiens également à remercier l'examinateur Mr YAHIMI Abdlakrim qui a bien voulu accepté d'évaluer ce travail.

Mr BOUDJAKDJI Abdelkarim ; merci pour vos aides et vos conseils

Mr LAHYANI Ismail ; merci d'avoir mis a notre disposition votre aimable établissement

Je remercie chaleureusement : tout le personnel de la station expérimentale, agent de sécurise, agents de sécurise, techniciens, magasiniers, ouvriers qui m'ont jamais refusé leurs service.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à tous mes enseignants du département de vétérinaire et un chaleureux merci à tous ceux qui m'ont aidées durant mon travail, certain par leurs connaissances scientifiques, d'autre par leurs soutien moral dans les moments difficiles ; afin d'accomplir ce modeste travail.

Merci pour tous.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents,
Pour vos mains qui ont tant travaillées,
Pour votre cœur qui m'a tant donné
Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,
Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,
Pour vous qui m'avez tant aimé.je vous aime…..
A mes sœurs ;Razika ;Dallel, Lyllia
A mes frères :Zouheyr ;Kheir eddine, Karime et Lhadj
A mes belles sœurs Amel et Widad
A mon adorable chat : Sebastien
A mes chères sœurs amies : Ibtissem ; Sabrina ; Amel ; Hadjer ; Nassima.
A mes chers frères amis : Hichem ; Basset ; Hamza ; Nacer.
que je l'ai considères comme mes frères et sœurs avec qui j'ai passé des bons moments inoubliables.

A Dr Lila ; Dr Sellou ; Dr Dalila et Dr Toudjine Malik pour leurs soutien morales dans les moments les plus difficiles.

A toute ma famille et mes amis et toutes personnes qui a aidées de prés ou de loin pour accomplir ce travail.

A toutes la promotion de Vétérinaire 2012/2013

ZEBIR Ilhem

Résumé :

Dans le but d'étudier la réaction des vaches à différents traitements de superovulation ; un lot de deux génisses donneuses d'embryons ont était utilisé au moment de leurs arrivées à leur chaleur naturel en utilisant deux protocoles différents de superovulation avec le standard pFSH 50 UA (Stimufol ®).

Le premier protocole(P1) consiste à pratiquer des injections journalières de pFSH 50 UA (qui est dilué dans 9 ml de solvant) à un intervalle de 24h et pendant 3 jours. La dernière injection est suivie d'une injection de prostaglandine *F2a* (Estrumate ®). Pour le deuxième protocole(P2) le rythme des injections se faisait selon la modalité de 2 injections de Stimufol® par jour avec intervalle de 12 h entre les injections et selon des doses décroissantes, pendant 4 jours de traitement. Au troisième jour après début de traitement de superovulation ; une double injection de la prostagladine F_2a (Estrumate ®) d'intervalle de 12h avait lieu

L'observation des chaleurs, l'insémination et la récolte on était réalisé 7jours plus tard. Les réponses au différents traitement ont était apprécié selon les critères suivants : intervalle PGF2α – début de chaleur, le nombre de corps jaune palpé sur les ovaires ; et le nombre d'embryons récoltés.

Pour le protocole 1; la vache n'a pas rentré en chaleurs après l'injection de la prostagladineF_{2a} et le nombre de corps jaune palpé était de 17 CJ.

Cependant, pour le protocole 2; l'intervalle PGF2α – début de chaleur était 48h, moyenne des corps jaune palpés était de 12.5 **CJ**, et la moyenne d'embryons récoltés était de 0.5.

Mots clés : transfert embryonnaire, superovulation, intervalle PGF2α-début de chaleur, corps jaune.

Abstract:

In the aim of studying the reaction of the cows with various treatments of superovulation; a batch of two donors of embryos was used at the time of their arrivals to their natural heat by using two different protocols of superovulation using th pFSH 50 UA (Stimufol ®).

The first protocole(P1) consists in practising injections day labourers of pFSH 50 UA (which are diluted in 9 ml of solvent) with an interval of 24h and during 3 days.The last injection is followed of a prostaglandin injection *F2a* (Estrumate ®). For the second protocole(P2) the rhythm of the injections was done according to the method of 2 daily injections of Stimufol ® with an interval of 12 H between the injections ; and according to decreasing amounts', during 4 days of treatment. At the third day after beginning of treatment of superovulation; a double injection of the prostagladine F2a (Estrumate ®) of interval of 12h took place.

The observation of heats, insemination and harvest one was carried out later 7jours. The answers to different the treatment have was appreciated according to following criteria's: interval PGF2*a* - beginning of heat, the number of yellow bodies palpated on the ovaries; and number of collected embryos.

For protocol 1; the cow did not return in heats after the injection of the prostagladine F*a* and numbers palpated yellow body was of 17 CJ.

However, for protocol 2; the interval PGF2α - beginning of heat was 48h, average palpated yellow bodies were of 12.5 **CJ**, and the average of collected embryos was 0.5.

Key words: embryonic transfer, superovulation, interval PGF2α-beginning of heat, yellow bodies.

ملخص

لدراسة تجاوب الأبقار لعلاجات مختلفة لفرط الاباضة عولجت مجموعتين من الأبقار باستخدام طريقتين مختلفتين و دلك باستخدامstandard pFSH « stimuful 50 UA »بعد دورتهما الطبيعية الطريقة الأولى تتمثل في إجراء ثلاث حقن لمدة ثلاث أيام و بفارق 24 ساعة محللة في 9 ملل من المذيب . في اليوم الثالث تضاف حقنة من «Estrumate » . بالنسبة للطريقة الثانية تتمثل في 8 حقنات منstandard pFSH « stimuful 50 UA » موزعة على 4 أيام محللة في 10 ملل الفارق بين كل واحدة 12 ساعة و بتركيز متناقص.في اليوم الثالث حقنتين من Prostaglandine «Estrumate» F2a جمعت الأجنة بعد 7 أيام من بدء ظهور الدورة ومن ثم ظهور التلقيح الاصطناعي.المقارنة بين استجابة الأبقار في الطريقتين تمت على أساس الاختلاف بين فترة حقن$PGF2\alpha$ و بدء ظهور الدورة.عدد الأجسام الصفراء وعدد الأجنة .

حصلنا على 17 جسم اصفر في الطريقة الأولى و حصلنا على 12.5 جسم اصفر.مع 0.5 جنين في الطريقة الثانية بدء الدورة بعد 48 ساعة من حقنة PGF2a جسم اصفر

كلمات مفتاحية

التحويل الجنيني .فرط الاباضة . فترة حقن$PGF2\alpha$- بدء الدورة. جسم اصفر

Partie bibliographique

Introduction générale

Les biotechnologies de la reproduction sont apparues comme l'une des clés du développement des élevages en promouvant le potentiel génétique, face aux exigences du marché qui poussaient les élevages à assurer une production plus performante et compétitifs.

Le transfert d'embryons chez les bovins constitue la deuxième génération ces biotechnologies après celle de l'insémination artificielle.

En termes simples, le transfert d'embryons consiste à prélever un embryon dans l'oviducte ou l'utérus d'un animal (femelle donneuse) et le placer dans l'oviducte ou l'utérus d'un autre animal (femelle receveuse) qui se situe à la même phase du cycle génital que la femelle donneuse (Hare 1984). Chez les bovins, on administre généralement à la femelle donneuse à haut potentiel génétique des hormones pour accroître sa ponte ovulaire (superovulation) et donc sa production d'embryons par rapport au nombre qu'elle pourrait produire dans les conditions naturelles(Hare 1984). 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 (Seidel; 1991). 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.

Deux problèmes majeurs identifiés dès le début de l'utilisation de transfert embryonnaire: le nombre moyen d'embryons récoltés par vache traitée reste faible, ce qui a pour conséquence un coût de production élevé, et la fréquence des animaux qui ne produisent aucun embryon transférable est trop élevée pour que la technique soit utilisée au mieux dans les programmes d'amélioration génétique.

Chapitre I : Physiologie du fonctionnement ovarien dans l'espèce bovine

1. Introduction :

À la naissance, les deux ovaires de la génisse disposent d'une réserve de follicules primordiaux (en majorité au stade quiescent) estimés aux environs de 133 000 (Erickson, 1966). Cette réserve reste relativement stable jusqu'à l'âge de 4 ans et tend à diminuer progressivement par la suite pour disparaître vers l'âge de 20 ans (Erickson, 1966). La croissance de ces follicules primordiaux sera initiée à divers temps de la vie de l'animal. Une très faible proportion des follicules seulement poursuivra leur croissance (99% de la réserve vont dégénérer) (Erickson, 1966).

Les modifications morphologiques et physiologiques de l'appareil génital femelle au cours de la période d'activité génitale dépendent de l'activité cyclique de l'ovaire, régulée par ses propres sécrétions hormonales, elles-mêmes sous dépendance étroite des hormones gonadotropes hypothalamo-hypophysaires (Hanzen, et al 2000).

2. Aspect morphologique du développement folliculaire :

2.1. Dynamique du développement folliculaire :

Les étapes du développement folicullaire sont au nombre de trois : la phase de multiplication, la phase de croissance et la phase de maturation. Elles sont indissociables du développement de l'ovocyte qu'ils renferment. L'étude descriptive de la folliculogénèse serait incomplète si elle n'envisageait pas également un processus qui concerne la majorité des follicules présents à la naissance sur l'ovaire, à savoir, l'atrésie (Hanzen et al ; 2000).

2.1.1. Phase de multiplication :

Vers la $6^{ème}$ semaine de la gestation chez la vache, les cellules germinales primordiales (cellules souches d'origine extra-embryonnaire), localisées au niveau de la paroi de la vésicule vitelline, colonisent, après migration au travers de l'embryon le long du mésentère dorsal de l'intestin postérieur, la crête génitale et donnent naissance aux ovogonies. Les cellules germinales souches se multiplient entre le $60^{ème}$ et le $170^{ème}$ jour de gestation (Wandji et al., 1992). Pendant la gestation un stock de 2 millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase 1: elles se transforment en ovocyte primaire. L'induction de la méiose serait contrôlée par un

facteur d'origine mésonéphrotique appelé MIS (Meiosis Inducing Substance), synthétisé par les cellules mésenchymateuses de l'ovaire (Westergaard et al, 1985). Le contact des ovogonies avec les cellules d'origine mésonéphrotique est donc indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires (Byskov, 1979). A cette même période, quelques cellules endothéliformes et une membrane conjonctive dite basale, future membrane de Slavjanski, viennent entourer l'ovocyte primaire formant ainsi les follicules primordiaux qui représentent la réserve des cellules germinales d'où s'échapperont les follicules destinés à se développer et dont quelques-uns seulement arriveront à maturité.

L'importance du stock folliculaire dépend de l'espèce (235.000 chez la vache) de la race, de l'individu, de l'âge, du niveau hormonal ou du statut de reproduction (Cahill, 1981). Cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal. Chez la vache, le nombre de follicules primordiaux a été estimé à 40.000 vers l'âge de 2 à 3 ans et à 2500 entre 12 et 14 ans (Erickson, 1966b).

2.1.2. Phase de croissance :

La phase de croissance ne concerne que 10 % du stock folliculaire. Comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et celui de l'ovulation. l'ultime fonction est de libérer, lors de l'ovulation, un ovule (ovocyte mature prêt à être fécondé et à se développer). La croissance de follicule est donc indissociable de celle de l'ovocyte qu'il contient (Fair, 2003).

Cette phase se caractérise par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme. Les follicules en croissance sont actuellement classées en deux catégories selon leurs stade de développement (Drion et al ., 1996) : les follicules pré-antraux correspondent aux follicules prémordiaux ,aux follicules primaires et aux secondaires, les follicules cavitaires ou antraux correspondent aux follicules tertiaires. Le terme de Degraff ne s'applique qu'un follicule mûr **(figure 1)**

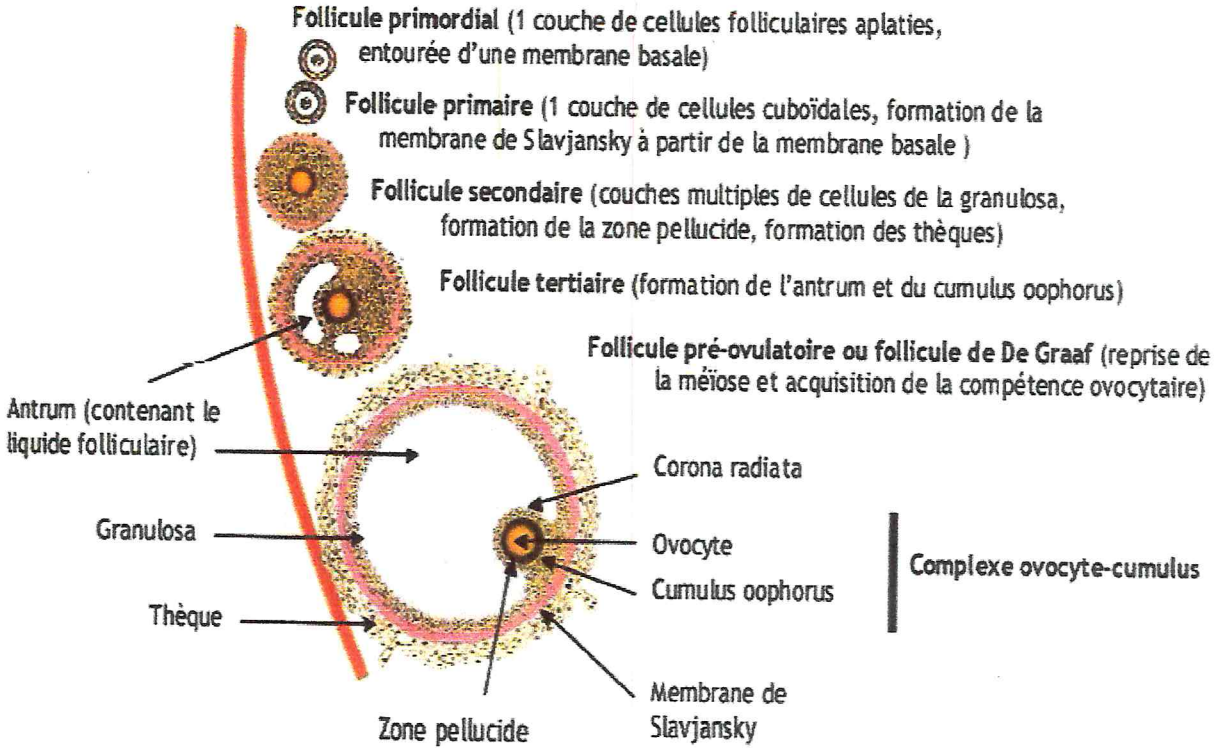


Figure 1 : Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien (d'après Drion et al., 1996.

2.1.2.1. Le follicule primordial :

Centré par l'ovocyte I, est entouré de quelques cellules folliculaires endothéliformes. Habituellement localisé en périphérie de l'ovaire,

il représente le stade folliculaire quiescent. L'ovocyte, de diamètre compris entre 20 et 35 um, se trouve bloqué au stade diplotène de la prophase de sa première division méiotique (ovocytes primaires).

2.1.2.2. Le follicule primaire :

Il se caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par l'agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise et sécrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse: la zone pellucide, qu'est constituée de trois zones ZP1, ZP2, ZP3. Seule la glycoprotéine ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (Yanagimachi, 1994). La ZP2 intervient lors de la fécondation en fixant transitoirement la tête du spermatozoïde pendant que celui-ci traverse la zone pellucide. La ZP1, composant le

moins abondant (10 %), assure la stabilité de la zone pellucide jusqu'au stade blastocytaire (Hanzen et al 2000).

2.1.2.3. Le follicule secondaire :

L'ovocyte a atteint son volume maximal. Il s'est entouré d'unepellucide bien différenciée et de deux ou trois couches de cellules cubiques formant la granulosa.
L'ensemble est limité extérieurement par la membrane basale qui s'est transformée en membrane de Slavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de protéohéparane sulfate (Hanzen ,et al 2000).

2.1.2.4. Le follicule tertiaire :

Il est dit cavitaire en raison de l'apparition au sein des couches de cellules folliculaires de petites cavités résultant de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de la sécrétion des cellules de la granuleuse. Ces cavités finissent par confluer pour former l'antrum.
Le développement progressif de l'antrum entraîne la séparation des cellules de la granuleuse en cellules du cumulus. Celles-ci se différencient en corona radiata, couche cellulaire entourant directement l'ovocyte. Ces cellules du cumulus et de la corona présentent de nombreuses zones jonctionnelles (GAP junction) qui constituent autant de moyens de communication entre l'ovocyte et la cavité folliculaire.
Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante compris entre 25 et 50 (Armstrong, 1993). Il dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules qui s'atrésient (Armstrong, 1993).

Le volume de l'ovocyte demeure inchangé mais les cellules qui l'entourent se disposent de manière radiée, d'où le nom de corona radiata donné à cette couche cellulaire péri-ovocytaire en continuité avec la granulosa par le cumulus oophorus. A ce stade, et chez tous les mammifères, le follicule cavitaire s'entoure, en dehors de la membrane de Slavjanski, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riches en ARN et en enzymes nécessaires à la stéroïdogenèse, et par la thèque externe formée d'un tassement de tissu conjonctif du stroma ovarien.

2.1.2.5. Le follicule mûr :

Follicule de Degraaf repesent: la phase terminale du développement folliculaire. Cette phase ne concerne qu'un follicule sur 1000 entré en croissance (Saumande, 1991).

Le follicule mûr se caractérise par une taille maximale de 25 mm chez la vache, par un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse. Gonflé de liquide, le follicule affleure en surface de l'ovaire. L'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et du cumuls oophorus. Les thèques interne et externe sont bien différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne. La thèque interne est une glande à part entière. La thèque externe est de nature fibreuse. Une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide follicullaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et la membrane basale, chez la vache , il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0,13 mm atteigne la taille préovulatoire (Lussier et al,1987).

2.1.3. Phase de maturation :

Elle concerne surtout l'ovocyte. Cette phase représente l'ensemble des modifications nucléaires cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte de l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde. Elle est induite par le pic ovulatoire. Lorsque l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa maturation nucléaire proprement dite, c'est-àdire la reprise de la méiose. Celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire : l'ovocyte I se transforme en ovocyte II. Lors du cycle sexuel, la maturation nucléaire ne survient qu'après la décharge ovulante.

La reprise de la division méiotique n'a pas lieu tant que l'ovocyte reste en contact avec les cellules de la granuleuse.

L'activation des récepteurs à la LH des cellules de la granuleuse induite lors de la décharge ovulante permet non seulement à l'ovocyte de reprendre sa méiose (maturation nucléaire), mais également de réaliser sa maturation cytoplasmique, préalable essentiel au succès de la fécondation (Hanzen et al 2000). La maturation cytoplasmique de l'ovocyte se caractérise par la migration des granules corticaux vers la périphérie de l'ovocyte, juste sous la membrane plasmique. Ces granules contiennent une ovopéroxidase qui, lors de la fécondation, a pour effet d'empêcher la pénétration de spermatozoïdes supplémentaires et dès lors de prévenir la polyspermie. Le cytoplasme est également le siège d'importantes protéosynthèses préparant l'ovocyte à une éventuelle fécondation et contribuant au développement précoce de l'embryon.

La maturation membranaire comprend l'ensemble des processus permettant la reconnaissance spécifique de l'ovocyte par le spermatozoïde. La membrane pellucide

synthétisée pendant la croissance ovocytaire joue un rôle important lors de la fertilisation. Elle doit notamment ne laisser pénétrer dans l'ovocyte que le spermatozoïde fécondant, favoriser et préparer la fusion spermatozoïde-ovule et protéger l'ovocyte contre la polyspermie (Hanzen et al, 2000).

2.2. L'atrésie folliculaire:

Elle constitue le devenir de la majorité (99. 9 %) des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle joue donc indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation. Elle peut se produire n'importe quel moment de la folliculogénèse.

L'atrésie est contrôlé par un mécanisme de la mort célullaire programmé appelé apoptose pour les stades antraux l'atresie est souvent entrainée lors de la sélection, par une réduction de la FSH secondaire aux sécretion d'oestradiol et d'inhibine par le follicule dominant. Sa durée, ses causes et son mécanisme sont encore mal connus faute d'une détection précoce et fiable. Cytologiquement, elle n'est identifiable que chez les follicules primaires, secondaires ou tertiaires par la mise en évidence d'apoptose (corps apoptotiques) dans les cellules de la granuleuse (Hughes et Gorospe, 1991). Biochimiquement, elle s'accompagne d'une augmentation des concentrations en enzymes lysosomales et en glycosaminoglycans ainsi que d'une diminution des concentrations en oestradiol (Mariana et al, 1991). La granuleuse disparaît progressivement et le cumulus se dissocie. L'ovocyte dégénéré reste la dernière cellule identifiable.

Sur le plan fonctionnel, la distinction entre les follicules atrétiques ou non peut être réalisée par la détermination du rapport de leurs concentrations en oestradiol/progestérone (Ireland et Roche, 1982), ou mieux encore, par le rapport de leurs concentrations en oestradiol/ocytocine (Meidan et al., 1992).

2.3. La notion des vagues follicullaire :

On parle de vagues folicullaires pour décrire le phénomène cyclique et continue selon lequel des follicules entrent dans un schéma de croissance puis de décroissance aboutissant soit à l'ovulation soit à l'atrésie d'un ou de plusieurs follicules, selon les espèces.

Le cycle oestral des vaches se compose de 2 ou 3 vagues folliculaires:

Les cycles à 2 vagues durent 2 à 3 jours de moins que les cycles à 3 vagues (19 – 20 jours contre 22-23 jours.) (Noseir ,2003 ; Adams et al .,2008).

La tendance chez les vaches laitières à fort potentiel laitier, telles que les Prim'Holstein , est d'avoir des cycles à 2 vagues (Townson et al., 2002) contrairement aux génisses laitières et aux vaches des races allaitantes qui ont une prédominance de cycle à 3 vagues follicullaires (Gunther et al , 1989) .

Lors de cycle à 3 vagues, on observe, 2 vagues anovulatoires avant une dérnière vagues ovulatoire (Macmillan et al ., 2003). Ces vagues folliculaire intérrèssent des follicules provenant des 2 ovaires évoluant de manière synchronisée, répondant aux variation hormonal systémiques et locale comme une seule entité (Adams et al,2008). La durée d'une vagues comprise entre 7 et 10 jours selon le nombre de vagues dans un cycle (Picard-Hagen et al., 2008). L'emergence des vagues est observée à J1 et J9 à 10 du cycle pour les cycle à 2 vagues, alors qu'elle se fait à J1 J8 à 9 et J16 pour les cycle à 3 vagues (Ennuyer,2000, cité par huyart,2004).

2.3.1. Recrutement :

Correspond à l'émergence d'une cohorte de follicules tertiaires entre J0 (ovulation) et J2 d'un cycle oestral. Cette étape marque le début d'une nouvelle vague folliculaire.
Les follicules sont visualisés à l'examen échographique lorsqu'ils mesurent entre 4-5 mm (Ginther *et al.*, 2001). L'émergence d'une nouvelle vague folliculaire est initiée par un pic de sécrétion de FSH. Après le retrait expérimental du follicule dominant par aspiration, on observe dans les 12heures un pic de FSH et l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire dans les 24 heures (Adams *et al.*, 2008). Cette phase du cycle est caractérisée par sa « quasi indépendance» hormonale. Mise en évidence suite à l'observation qu'une croissance folliculaire précoce persiste après une hypophysectomie chez la brebis (Driancourt *et al.*, 1987). Une complémentation des animaux hypophysectomisés en hormones gonadotropes a cependant démontré un recrutement plus efficace, c'est pourquoi leur rôle n'est pas nul. Une fois recrutés, la dynamique des follicules est dépendante des variations hormonales qui conditionnent leur maturation jusqu'à stade de follicules préovulatoires.

2.3.2. Sélection :

Cette phase est commune à certains follicules (au nombre de 7 à 11 généralement) qui permet de réduire au sein d'une cohorte le nombre de follicules primordiaux au quota ovulatoire spécifique d'une espèce .

La sélection est achevée lorsque le nombre de follicules sains d'une cohorte en cours de croissance équivaut au nombre de follicules qui ovuleront. Chez la vache, espèce mono-ovulante, on observe pendant la phase de sélection une divergence dans la croissance des deux plus grands follicules: ce moment correspond à la déviation. Généralement la déviation survient entre 60 et 62 heures après le recrutement, au moment où le plus grand follicule a atteint le diamètre de 8,5 mm (Ginther *et al.*, 2001 ; Lopez *et al.*, 2005a).

La FSH est reconnue aujourd'hui comme une des hormones clé du processus de sélection d'un follicule unique chez les espèces mono-ovulantes. En effet l'administration de FSH pendant la phase de croissance avant la déviation inhibe le processus de déviation et conduit au développement de follicules co-dominants (Mihm *et al.*, 2002). Or, au cours de la croissance des follicules, les cellules de la granulosa secrètent de manière active des oestrogènes et de l'inhibine. L'oestradiol exerce un rétrocontrôle positif, se traduisant par une augmentation de la fréquence des pulses de LH; alors qu'il exerce également concomitamment un rétrocontrole négatif sur la production de FSH (Picard-Hagen et al., 2008). Jusqu'au moment de la déviation, tous les follicules possèdent la capacité de devenir dominants si le follicule de plus grande taille est retiré par aspiration (Ginther *et al.*, 2001). En effet, la prévention de la chute de la FSH par injection de cette hormone à petite dose conduit à une polyovulation (Ennuyer, 2000). Lorsqu'un follicule dominant a acquis suffisamment de récepteurs à LH pour lui permettre de subsister quand le taux de FSH diminue, il sécrète de grandes quantités d'oestrogènes et continue à croître en raison de l'augmentation de sa propre sensibilité à la FSH et à la LH, et par production de facteurs locaux, notamment des IGF. L'action de l'IGF-I semble régulée par la concentration en ses protéines-ligands, les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) : une diminution de la concentration en IGFBP, entraînant une plus grande biodisponibilité de l'IGF-I, serait déterminante dans le mécanisme d'acquisition de la dominance (Austin *et al.*, 2001 ; Monget *et al.*, 2002). La sécrétion réduite de FSH ne permet plus en revanche la croissance des follicules non sélectionnés (Ennuyer, 2000).

2.3.3. **Dominance :**

Fait suit à la sélection et associe à l'amorce de la régression des autres follicules recrutés et au blockage du recrutement de nouveaux follicules (Driancourt et al 1991).

Chez la vache, un seul follicule accède au rang de dominant et continue sa croissance alors que les follicules subordonnés continuent de régresser sous l'action combinée de l'inhibine et de l'oestradiol.

Le follicule dominant provoque l'atresie des follicules subalterne 2 à 4 jours aprés le début de la vague de croissance follicullaire, et est caractérisé par:

.sa taille supérieure à celle des autres follicules et (une vitesse de croissance superieure) jusqu'à atteindre 15 mm de diametre avant l'ovulation ;

. la thèque: aquisition de récepteur à la LH associe à la sécrition active de la LH par l'hypophyse, d'où une sécrition élevée de l'AMPc dans les cellules follicullaires;

. la granulosa: forte activité aromatase liee à la synthèse d'ostradiol, avec amplification de la synthèse de l'IGF-1;

.liquide follicullaire : rapport oestrogene/progesterone superieure à un.

Ainsi une vascularisation plus importante et une expression de récepteurs à FSH et LH dans les cellules de la thèque augmentée par rapport à celle des autres follicules .

Contrairement à ce qui était supposé, l'acquisition de récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa du follicule dominant, le rendant ainsi insensible à la baisse de FSH et lui permettant de poursuivre sa croissance sous dépendance de la LH dans un contexte de faible concentration de FSH, n'est pas le facteur déclenchant de la déviation mais une caractéristique du développement précoce du follicule dominant. Après la déviation, la LH contribue à la croissance et au bon fonctionnement du follicule de plus grand diamètre. Les follicules subordonnés, moins ou non pourvus en récepteurs à LH, ne poursuivent pas leur croissance et s'atrésient (Lopez *et al.*, 2005a).

La LH assure la maturation de follicule dominant dont l'avenir dépend de la fréquence des décharges de LH, régulés par la GnRH. Lorsque un corps jaune est présent une fréquence de décharge de LH toutes les 3 ou 4 heurs aboutit à la perte de dominance et à l'atrésie de follicule, donc à l'absence d'ovulation et d'oestrus. Une nouvelle vague follicullaire émerge alors précédé par augmentation transitoire de FSH. Lorsque la fréquence est d'un pic par heur, l'ovulation peut avoir lieu. Cette fréquence n'est atteinte que lorsque la levée de l'inhibition de la progestérone sur la production de la GnRH, à la suite de la lutéolyse (Ennuyer, 2000).

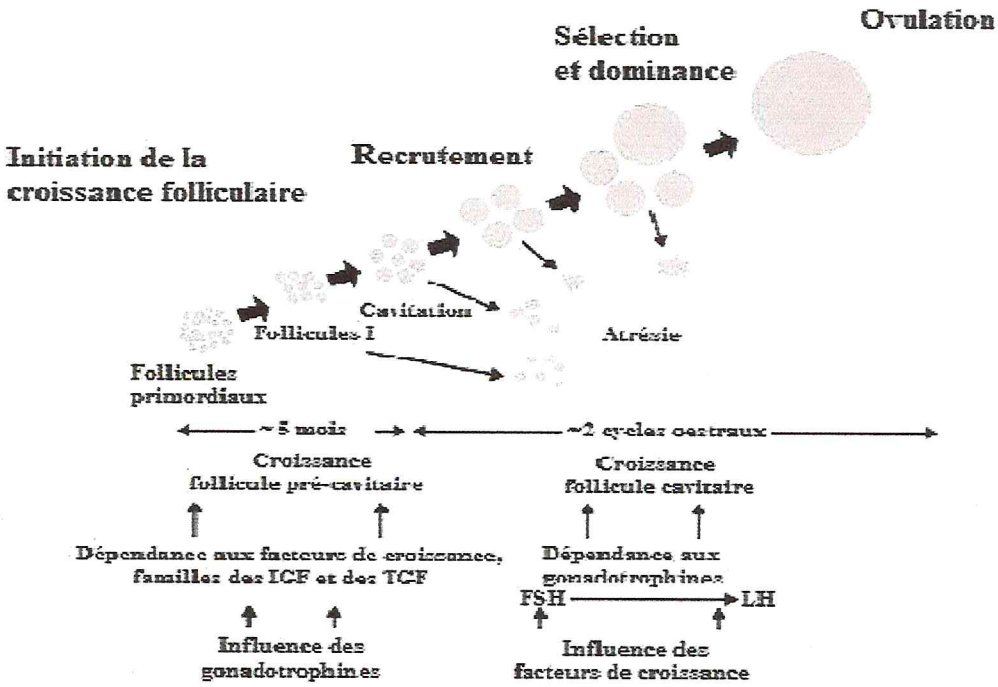


Figure 2 : Rôles relatifs des gonadotrophines et des facteurs de croissance au cours développement folliculaire (d'après WEBB, 1999).

3. Physiologie du cycle oestral de la vache:

La vache est une espèce poly-oestrienne de type continu avec une durée moyenne de cycle de 21/22 jours chez la femelle multipare et de 20 jours chez la génisse (Mialot *et al*, 2001). L'activité sexuelle débute à la puberté, quand l'animal a atteint 50 à 60 % de son poids adulte, puis elle est marquée par cette activité cyclique, caractérisée par l'apparition périodique de l'oestrus. Presque la totalité des génisses laitières sont cyclées à 15 mois (Mialot *et al*, 2001).

Le cycle oestral de la vache est le résultat des interactions de plusieurs hormones sécrétées par l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure, les ovaires et l'utérus (Mapletoft, 2006). Parmi ces hormones figure l'hormone hypothalamique GnRH (Gonadotropin-Releasing hormone), les hormones hypophysaires FSH (Follicle Stimulating Hormone), LH (Luteinizing Hormone) et ocytocine, les hormones ovariennes l'androstènedione, l'estradiol 17 β (E2) et la progestérone (P4), et la prostaglandine F 2α (PGF 2α) produite par les cellules endométriales.

4. Phases du cycle oestral :

Le cycle oestral de la vache dure en moyenne 18 à 24 jours. La phase folliculaire du cycle oestral de la vache est assimilée à une série de vagues folliculaires (Rajakoski, 1960). En fonction des vaches, un cycle peut renfermer 2, 3 voire même 4 vagues folliculaires (Zeitoun et *al*., 1999) et comporte 4 phases :

4.1. OEstrus ou chaleur : Jour 0 (J 0)

L'oestrus ou chaleur est la période d'acceptation du mâle et de la saillie. C'est la période du maturité folliculaire au niveau de l'ovaire, suivie de l'ovulation.

L'oestrus dure de quelques heures à 24 heures pendant laquelle un mugissement, une hyperactivité et une décharge de glaire cervicale peuvent être observés (Roelofs et *al*., 2005). L'ovulation a lieu 6 à 14 h après la fin de l'oestrus et est suivie par la formation du corps jaune et l'installation d'un état prégravidique de l'utérus, correspondant à la période d'installation de la fonction lutéale (Derivaux *et al*, 1986).

L'apparition de l'oestrus est précédée par une augmentation graduelle de la concentration de la FSH associé à une concentration maximale de la LH (Bernard et *al*, 1984). Vingt quatre heures avant le début de l'eostrus, la concentration de l'E2 est à son maximale (Glencross et Pope, 1981).

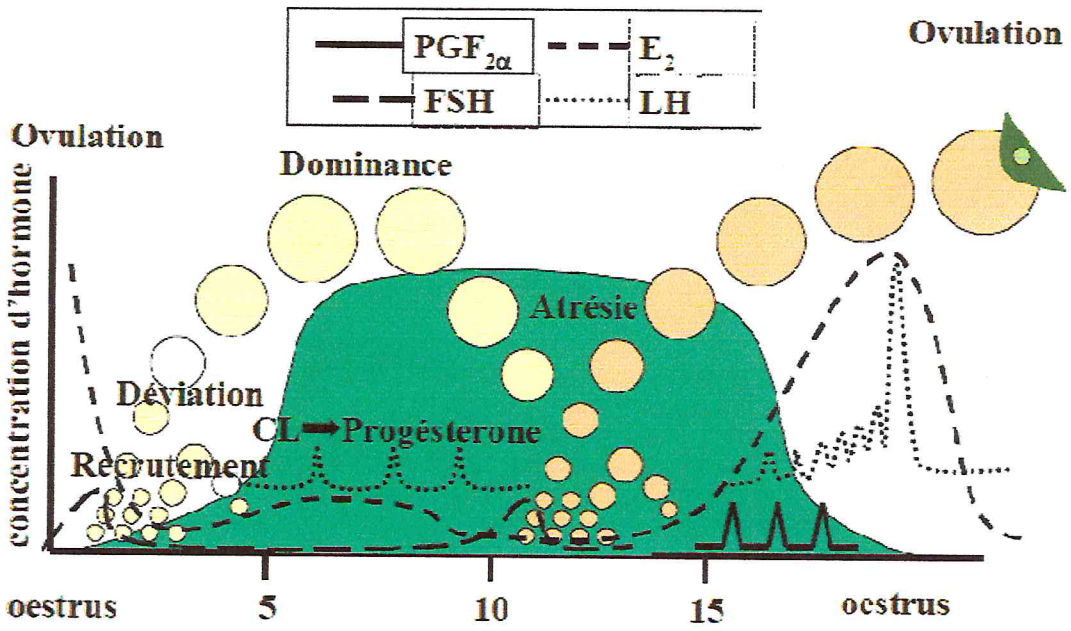


Figure 3 : Évènements hormonaux et ovariens du cycle oestral de la vache à 2 vagues folliculaires (Adams et *al*. 2008).

4.2. Metoestrus : J 1 à J 3

C'est la période d'ovulation qui est un processus inflammatoire (Richards et *al*, 2002). L'ovulation est accompagnée de la relâche post ovulatoire de la FSH qui permet le recrutement et l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire. À J 1, la première vague folliculaire débute et les follicules émergent possèdent un diamètre de à 3 à 4 mm (Lussier et *al*., 1994). La période est suivie par le début de la phase lutéale durant laquelle, une faible concentration de P4, d'E2 ainsi que de LH est observée (Niswender et *al*., 2000).

La croissance des follicules de la nouvelle vague émergente se poursuit et les cellules de la granulosa du follicule ovulé commencent déjà à sécréter une petite quantité de P4 et à former le nouveau corps jaune (CJ) (Roelofs et *al*, 2005).

4.3. Dioestrus : J 4 à J 16

C'est la phase la plus longue du cycle, car elle dure environ 12 jours et se divise en trois périodes distincts :

- **Début du dioestrus (J 4 à J 5)** : Caractérisé par la sélection du follicule dominant qui est dans 80% des cas, le follicule possédant un diamètre de 9 mm (Kulick et *al*., 2001).
- **Milieu du dioestrus (J 5 à J 10)** : Entre J 8 et J 10, le CJ est à son développement maximal et sécrète une concentration maximale de P4. Sous l'action de cette dernière, les cellules endométriales restent dans un état quiescentes.
- **Fin du dioestrus (J 10 à J 16)** : La présence de la concentration élevée de P4 fait qu'il y a une augmentation moins marquée de LH durant la deuxième vague (Kulicke et *al*., 2001). Sous l'action de la P4, les récepteurs de P4 des céllules endométriales se désensibilisent et favorisent la synhtèse des récepteurs d'E2. La fixation de E2 à son récepteur stimule à son tour la synthèse des récepteurs de l'ocytocine et par conséquent la synthèse et la sécrétion de PGF 2α (Okuda et *al*., 2002).

4.4. Proestrus : J 16 à J 21

Vers la fin du dioestrus, les neurones hypophysaires sécrètent l'ocytocine qui induit au niveau des cellules de l'endomètre la sécrétion de PGF 2α. Cette hormone stimule la production d'ocytocine par le CJ qui à son tour augmente la production de PGF 2α. Cette dernière induit la lyse du CJ et entraîne une diminution de P4 à sa concentration basale (Poyser, 1995). Le proestrus correspond au début de la phase folliculaire. La croissance folliculaire se poursuit jusqu'à la sélection du follicule dominant (Lussier et *al*., 1994). De J 16 à J 19, la fréquence de relâche de LH augmente et la production d'E2 par le follicule dominant atteint son seuil critique provoquant la relâche préovulatoire de LH et par conséquent l'apparition de l'estrus (Hansen et Convey, 1983).

5. Les hormones intervenant dans la régulation du cycle œstral

Au cours d'un cycle œstral, les follicules sont soumis à l'action de diverses molécules:

5.1. D'origine hypothalamique:

5.1.1. GnRH :

Ou gonadolibérine, est une neuro-hormone peptidique synthétisée dans les corps des neurones hypothalamiques et c'est elle l'initiateur et le régulateur de la fonction reproductrice. La GnRH se lie aux récepteurs spécifiques situés sur les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, ce qui provoque la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines FSH et de LH (Roche 1997).

5.2. D'origine hypophysaire :

Les activités biologiques de la FSH et de la LH sont pratiquement toujours associées. Cette synergie est de type séquentielle (une hormone préparant le terrain pour l'autre) ou parfois simultanée.

5.2.1. FSH :

Est une glycoprotéine synthétisée par l'antéhypophyse. La FSH principalement assure le développement de l'ovaire, la croissance folliculaire, prépare l'action de la LH par fragilisation de la membrane de follicule et stimule la synthèse des œstrogènes par les follicules (Rieutort, 1995). La FSH contrôle l'aromatase, enzyme responsable de l'aromatisation des androgènes en œstrogènes et dont l'activité est plus importante dans le follicule dominant que dans les follicules dominés (Hanzen2000). L'émergence d'une nouvelle vague folliculaire est initiée par un pic de sécrétion de FSH (Diskin *et al.* 2000).

5.2.2. La LH :

Dont l'action a été préparée par la FSH, assure plus particulièrement la maturation folliculaire, provoque l'ovulation, la reprise de la méiose au niveau de l'ovocyte, la formation du corps jaune et la sécrétion de progestérone par les cellules lutéales (Bertrand *et al.* 1976, Bruyas 1991). La décharge cyclique de LH, ou « pic ovulatoire », qui est responsable de l'ovulation est induit lorsqu'un certain seuil plasmatique d'oestradiol 17 β est atteint (Lyimo *et al.* 2000).

La concentration en FSH est basse et les follicules subordonnés, moins pourvus en récepteurs à LH, ne seraient pas capables de poursuivre leur croissance et s'atrésient (Lopez et al., 2005a).

5.3. D'origine folliculaire: protéines et peptides (activine, inhibine, follistatine, IGF) et hormones stéroïdiennes ou non (17β-oestradiol et progestérone).

5.3.1. Action inhibitrice sur la croissance folliculaire

5.3.1.1. Inhibine

L'inhibine est une glycoprotéine synthétisée par les cellules de la granulosa du follicule en cours de croissance. Elle est identifiée comme étant, avant la déviation, la principale responsable de la baisse du taux de FSH (Lopez *et al.*, 2005a) par une action inhibitrice sur sa synthèse hypophysaire. Ainsi l'administration à des vaches d'un sérum anti-inhibine à J12 du cycle suivie d'une injection de prostaglandine provoque une augmentation dose-dépendante de la concentration en FSH ainsi que du taux d'ovulation (Akagi et al., 1997).

5.3.1.2. GCIF (Granulosa Cell Inhibitory Factor)

Est un composé ovarien nouvellement identifié, il se pourrait que ce peptide soit un des inhibiteurs spécifiques de la croissance folliculaire des petits et moyens follicules. Il est produit par les cellules de la granulosa du follicule dominant et serait donc responsable de l'atrésie des follicules subordonnés. Deux observations ont conduit à émettre cette hypothèse :

- la sensibilité des cellules de la granulosa des follicules de petite et moyenne taille, même pour des concentrations basses, à l'action inhibitrice exercée par le GCIF (Morris et al., 2002).
- Le fait que le follicule dominant soit le principal producteur de GCIF (Morris et al., 2002).

5.3.2. Action stimulante sur la croissance folliculaire

5.3.2.1. **Follistatine**

La follistatine est une protéine de liaison de l'activine, un autre peptide ovarien exerçant par une action paracrine et autocrine des effets inverses de l'inhibine.

5.3.2.2. Insuline et IGFs

Les IGFs, produits par l'ovaire lui-même, combinent actions endo, para et autocrines sur l'ovaire et le taux d'ovulation (Hunter *et al.*, 2004) en stimulant la croissance et la différentiation folliculaire (Rivera et Fortune, 2001) et en optimisant l'action de FSH et LH (Lopez et al., 2005a). Elles s'opposent par leurs effets à l'atrésie des follicules.

Le système IGF est formé de deux ligands (IGF-1 et IGF-2), de deux types de récepteurs (1 et 2) et de six protéines de liaison différentes (IGFBP 1 à 6).

Les effets des IGFs sont sous contrôle des récepteurs présents au niveau des cellules de la granulosa, de la thèque et des cellules lutéales. La biodisponibilité des IGFs dépend également des IGFBPs qui limitent les interactions ligand-récepteur et de la concentration en protéases qui libèrent les IGFs de leur site de fixation aux IGFBPs.

Le rôle des IGFs dans l'acquisition de dominance d'un follicule (production d'oestrogènes dans un contexte de FSH faible) est suggéré par la mise en évidence d'une activité protéasique d' IGFBP-4 plus intense dans le liquide folliculaire du follicule dominant par rapport aux autres follicules subordonnés 2-3 jours après l'émergence d'une vague folliculaire (Rivera *et al.*, 2001).

5.3.2.3. Somatotropine ou Growth Hormone (GH)

Ce peptide hypophysaire a une action directe sur le corps jaune et le follicule, et indirecte via IGF-1. Ses effets sur la folliculogenèse, initialement indépendamment puis sous dépendance gonadotrope, consistent à favoriser la prolifération cellulaire et à inhiber l'atrésie des follicules. De plus, il agit indirectement sur la qualité de l'ovocyte en accélérant et en coordonnant sa maturation nucléaire et cytoplasmique. Il augmente la production d'hormones stéroïdiennes et facilite l'ovulation (Hull et Harvey, 2001).

5.4. Hormones ovariennes

5.4.1. OEstrogènes (17 beta oestradiol)

Ils sont synthétisés à partir des androgènes (androstènedione secrétée par les cellules de la thèque) par l'aromatase (cytochrome P450 CYP19) dans les cellules de la granulosa. L'activité de l'aromatase est sous dépendance de la FSH (Herath *et al*, 2007). L'oestradiol a un effet trophique sur l'ovocyte et les cellules folliculaires.

Au cours de la croissance des follicules, les cellules de la granulosa secrètent de manière active des oestrogènes. Lors de la phase folliculaire, la concentration en oestradiol augmente et agit par rétrocontrôle négatif (diminution de la quantité de récepteurs à FSH et LH sur les cellules de la granulosa) sur la sécrétion hypophysaire de LH et FSH (Herath *et al.*, 2007). Dans un contexte de concentration élevée en oestrogènes et de concentration basse en FSH et en progestérone, la sécrétion massive de LH provoque l'ovulation. À partir de la lutéinisation des cellules folliculaires, l'oestradiol n'est plus synthétisé par les cellules de la granulosa.

5.4.2. Progestérone

Hormone stéroïdienne synthétisée par les cellules lutéales de corps jaune, elle est le précurseur de l'androstènedione à partir de laquelle la testostérone et l'œstradiol sont synthétisés. C'est donc une hormone clé du système reproducteur de la vache. Ces effets sont démultipliés en présence d'œstradiol par augmentation du nombre de récepteurs à la progestérone. Son rôle dans le maintien de la gestation est reconnu (Graham et Clarke, 1997). La progestérone, exerce un rétrocontrôle négatif sur la production de GnRH, FSH et LH.

5.5. Prostaglandines :

La Prostaglandin (PGF2 α) est synthétisée par l'utérus à la fin de la phase lutéale lorsque la vache n'est pas gestante. Elle provoque la lyse du corps jaune et l'arrêt de la sécrétion de progestérone (Bruyas, 1991).

6. Fécondation et développement embryonnaire:

La fécondation a lieu dans l'ampoule de l'oviducte et se caractérise par la fusion des pronuclé des gamètes mâle (spermatozoïde) et femelle (ovocyte). L'ovocyte bloqué en métaphase II lors de l'ovulation, reprend sa division cellulaire. Puis, débute la période embryonnaire caractérisée par une succession de mitoses et l'apparition des premières différenciations qui vont conduire au stade blastocyste (figure4).

Jour *	Etape	Lieu	Description	
1	Fécondation	OVIDUCTE	La fécondation marque le début de la période embryonnaire. C'est l'ensemble des transformations qui se produisent dans l'œuf, suite à l'interaction et à la fusion des gamètes.	
2 - 4	Segmentation		La première étape du développement de l'œuf fécondé ou zygote est appelée segmentation et correspond à des divisions répétées, qui aboutissent à la formation de cellules semblables de plus en plus petites ou blastomères.	
5	Morula (150 µm)	UTERUS	L'étape de compaction, c'est-à-dire liaison intime entre les cellules, survient au stade morula (32-64 cellules), environ 5 jours après les chaleurs. Pendant la compaction, la morphologie des blastomères évolue de façon différenciée pour aboutir à la formation du blastocyste.	
7-8	Blastocyste (150-350 µm)		Le blastocyste est défini par la présence d'une cavité centrale, le blastocœle, entouré par une couche de cellules, appelée trophoblaste (futur placenta) et par un petit groupe de cellules formant le bouton embryonnaire (futur veau). Il est entouré de la zone pellucide, qui joue le rôle de barrière protectrice.	
9-10	Eclosion (400 µm -> 2 cm)		L'éclosion correspond à la perte de la zone pellucide par le blastocyste. Celle-ci s'amincit puis se rompt suite à l'expansion du blastocœle de l'embryon.	
11	Elongation		A partir du 11ème jour, le blastocyste perd sa forme sphérique et s'allonge très rapidement : c'est l'élongation. Pendant cette période, il envahit progressivement la cavité utérine, qu'il occupe en totalité vers le 18ème jour. Il atteint alors 40 cm.	

* par rapport aux chaleurs

source images de 1 à 5 UNCEIA et 6 INRA

Figure 4 : Stade du développement embryonnaire de la fécondation à l'élongation du blastocyste (UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006).

Pendant cette étape de segmentation de l'œuf (ou zygote), les mitoses répétées aboutissent à la formation des blastomères, cellules semblables et de plus en plus petites jusqu'au stade morula. La mise en route du génome embryonnaire se produit à un moment précis du développement embryonnaire, au stade 8-16 cellules. Tout retard à la mise en route de la lecture du génome embryonnaire met l'embryon en danger. Le zygote arrive à la jonction utéro-tubaire 24-48 heures après la fécondation, il est généralement au stade 8 cellules. L'entrée dans l'utérus se fait au stade 16-32 cellules, 5-6 jours après la fécondation. Le phénomène de compaction qui a lieu 6-7 jours après la fécondation (au stade 64 cellules) aboutit à la formation d'une cavité blastocoelique et à l'expansion du blastocyste. Le blastocyste de 7-10 jours est sphérique avec une cavité centrale, le blastocoele, complètement

entouré par une assise cellulaire appelé trophectoderme ou trophoblaste et par un petit groupe de cellule situé sous le trophectoderme, la masse cellulaire interne ou disque embryonnaire. Le trophoblaste formé d'une seule couche de cellules minces et à noyaux petits est étroitement appliqué contre la membrane vitelline et la zone pellucide (ZN) commence à s'amincir. L'expansion du blastocyste suite à une accumulation de liquide provoque une augmentation de son diamètre. L'éclosion (sortie de la zone pellucide), étape cruciale du développement, se produit alors vers 9 à 10 jours après la fécondation. Dès lors la croissance est rapide, les parties extra-embryonnaires s'allongent en envahissant la cavité utérine. Le blastocyste s'allonge de 0,40 mm de long sur 0,25 mm de large à plus d'un mètre 4 semaines plus tard, c'est la phase de l'élongation. L'embryon se délimite vers 18 jours et les premiers somites se forment vers le 19ème jour. A cette date l'embryon est long de 3-4 mm, la fermeture du tube neural est déjà commencée. Le coeur commence à battre. L'organogenèse de l'embryon continue et s'achève vers 42 jours de gestation (Anonyme, 1972). L'implantation dans l'utérus se produit vers le 19ème jour chez la vache (Guillomot, 2001) et aboutit à la mise en place des structures placentaires. Après l'orientation du blastocyste, il y a apposition entre le trophectoderme et l'épithélium utérin. Cette phase s'accompagne d'une réduction des microvillosités de la membrane des cellules trophoblastiques contribuant à un rapprochement étroit des deux tissus. Un système d'interpénétration des microvillosités utérines et de la membrane plasmique du trophoblaste se met en place. Le trophoblaste s'insère entre les cellules épithéliales sans les lyser, assurant l'ancrage du blastocyste à l'endomètre. L'invasion par intrusion est limitée à un nombre restreint de cellules particulières, les cellules binucléées du trophoblaste qui fusionnent avec les cellules de l'endomètre formant ainsi un syncytium alternant avec un épithélium simple (Wooding et Wathes, 1980). Cela aboutit à la mise en place d'un placenta épithéliochorial (cellules trophoblastiques au contact des cellules épithéliales utérines) et partiellement syndesmo-chorial. L'implantation implique une synchronisation précise entre le stade de développement du blastocyste et la réceptivité utérine au début du processus. Après son bon établissement, la nutrition de l'embryon et sa protection sont assurées au travers de la placentation.

Chapitre II : Superovulation et récolte des embryons:

1. La superovulation :

La Superovulation est la première étape du programme de transfert embryonnaire .C'est un traitement à base d'hormones gonadotropes exogènes capables de stimuler la croissance, la maturation de nombreux follicules et l'ovulation de ceci (Briante et al 2007).

Donc l'objectif de ce traitement est produire le maximum d'ovocytes fécondables et d'embryons transférable capables de produire une gestation (Armstrong ; 1993. mapletoft ; 2002).

1.1. Choix des donneuses :

Le choix des donneuses est basé sur des critères d'ascendance, du potentiel génétique et de confirmation, en plus des exigences de l'intégrité du tractus génital et de la régularité de la reproduction. Le plus souvent, la sélection de la donneuse s'opère en fonction de son mérite génétique. La donneuse doit être de la classe très bonne ou excellente en termes de conformité (Mapletoft, 1985). Le choix peut être aussi fait en fonction des caractères bien fixés et transmis dans la lignée (le nombre de filles dans l'étable par exemple).

1.1.1. Age :

Keller et Teepker, 1990; la donneuse doit avoir un minimum de 8 mois d'âge mais dans la plupart des cas, les donneuses choisies sont en majorité des vaches du fait de la connaissance de leurs performances productives et reproductrice.

Lamonthe signale que plus la donneuse avance en âge, plus la réponse à la superovulation est erratique et il conseille une tranche d'âge entre 5 et 10ans.

1.1.2. Etat sanitaire:

L'anamnèse reproductrice de la donneuse est très importante (Hanzen, 2009). Un examen général et génital de la donneuse peut être fait pour sélectionner la donneuse potentielle et pour avoir une bonne réponse (Mapletoft, 1985). Les vaches possédant des chaleurs irrégulières, des kystes ovariens et des infections utérines sont à éliminer. Les donneuses à sélectionner sont, par exemple, celles qui sont normales aux examens général et génital (sécrétions génitales normales) et celles qui ont des manifestations des chaleurs

régulières à intervalles de 2 voire 3 œstrus et des mises bas normales (Hanzen 2010). Le rétablissement des fonctions reproductrices, incluant l'involution utérine complète, la reprise du cycle œstral et l'élimination des infections utérines, est indispensable avant la superovulation. De plus, la donneuse sélectionnée devrait avoir terminé sa période d'annovulation postpartum. Aussi, une période d'au moins 70 jours après mise bas est nécessaire avant la super ovulation (Mapletoft, 2006). À 70 jours en lait (JEL), le pic de lactation est atteint, la balance énergétique négative diminue progressivement et permet une fonction reproductrice efficiente (Santos et *al.*, 2008).

La donneuse peut être aussi choisie en fonction de son profil de P4. Une mesure de la concentration de P4 dans le sang (Callesen et *al.*, 1988) et dans le lait (Herrler et *al.*, 1990) durant la période pré-ovulatoire permet d'exclure les donneuses non potentielles. Le nombre d'embryons transférables varie significativement en fonction de la concentration dans le lait et du profil plasmatique de P4 (Callesen et *al.*, 1988). Selon Herrler et al. (1990), les donneuses ayant une concentration de P4<10.7 ± 1.3 ng/mL produisent moins de CJ, d'ovocytes et/ou embryons et d'embryons transférables comparativement aux donneuses ayant une concentration de P4 ≥ 10.7 ± 1.3 ng/mL (3.4 ± 1.0 vs 10.8 ± 0.7 CJ; 1.7 ± 0.8 vs 6.2 ± 0.9 ovocytes et/ou embryons; 1.2 ± 0.7 vs 2.8 ± 0.4 ET).

L'état sanitaire de la donneuse conditionne certainement en grande partie non seulement le nombre d'embryons récupérés, mais aussi la qualité des embryons. Sur le plan général, la donneuse devra être indemne de toute maladie susceptible d'être transmise à l'embryon (tuberculose et surtout la brucellose). Les traitements antiparasitaires et vaccination aurront été effectués 30 jours au moins avant le traitement de superovulation (Hanzen, 2009).

1.2. Les différentes hormones utilisées dans le traitement de superovulation

L'initiation de la sperovulation consiste à supprimer les effets du follicule dominant et à initier une nouvelle vague folliculaire pour avoir une ovulation simultanée de plusieurs follicules à l'aide de gonadotrophines, préparées à partir des extraits pituitaires de porc et de eCG (Murphy et *al*, 1984).

Chez la vache trois différents types de gonadotrophins ont été employés pour induire la superovulation; gonadotrophines des extraits pituitaires porcin ou d'autres animaux domestiques(ovins et bovins), gonadotrophin chorionic équin (eCG) et gonadotrophin menopausal humain (hMG) (Alkemade et al ; 1993. Murphy et al 1984).

Les gonadotrophines diffèrent l'une de l'autre par leurs compositions en FSH et LH (Murphy et *al*, 1984). La vache superovulé semble mieux rependre au traitement gonadotrophine si ce dernier est commencé autour du jour 10 du cycle (Foot et al 1970, Phillippo et al 1975, Sreenan et al 1977, Mapletoft 1985).

L'initiation du traitement de SOV entre le 8ème et le 12ème jour du cycle oestral a permis d'avoir une meilleure réponse (Bo et *al.*, 1995). Il semble que la période entre le 8ème et le 12ème jour du cycle coïncide avec le moment de l'émergence de la deuxième vague (chez les vaches à 2 et 3 vagues folliculaires) durant la quelle il y a croissance d'une cohorte de follicules (Ginther et *al.*, 1989).

1.2.1. Les extraits hypophysaires:

1.2.1.1. FSH: Follicular Stimuling Hormone

Plusieurs produits ont été disponibles sur le marché : FSH-P (100% FSH); NIH-FSH-P1 (68% FSH et 32% LH); Folltropin V® (est un extrait pituitaire porcin constitué de 84% FSH et 16% LH, Mapletoft et al., 2002). Actuellement, au Canada, l'hormone la plus utilisée dans le traitement de SOV est la Folltropin V® (Mapletoft, 2002).

La société Mérial (Bd Sylvain Dupuis 143 1070 Bruxelles) commercialise le Stimufol. Ce produit contient 500 µg de FSH porcine et 100 µg de LH porcine. Il est fabriqué par le laboratoire de Physiologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire.

Récemment la pFSH a été modifié chimiquement avec un polyéthylène glycol (PEG) pour former des dérivés : PEGylatedpFSH. Les résultats indiquent que la PEGylatedpFSH est encore bioactifs bien que cette activité est réduite et l'élimination d'immunoréactivité par PEGylation suggère cette modification mérite la création d'un produit utile dans l'induction de superovulation bovine (UCHIYAMA Y ; 2009)

La FSH possède une demi-vie plus courte (5 à 6 heures) que la PMSG (Hanzen ; 2010). Sa moindre richesse en acide sialique (5 %) oblige des injections répétées pour induire une superovulation avec succès (Mapletoft, 2002, Monniaux et al 1983). Sa concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et n'est plus décelables 12 heures après l'injection.

La durée du régime habituel est de 4 ou 5 jours, avec des injections bijournalières avec une dose totale de 28 à 50 mg (Armure) d'un extrait pituitaire brut (Fsh-p) ou 400 mg Nih-fsh-pi de extrait pituitaire épuré, ® de Folltropin - V.

Quarante huit à 72 h après le déclenchement du le traitement, la PGF est injecté pour induire le luteolysis. L'oestrus se produit entre 36 et 48 h, avec l'ovulation 24 et 36 h plus tard (Mapletoft, 2002).(figure 5 et 6)

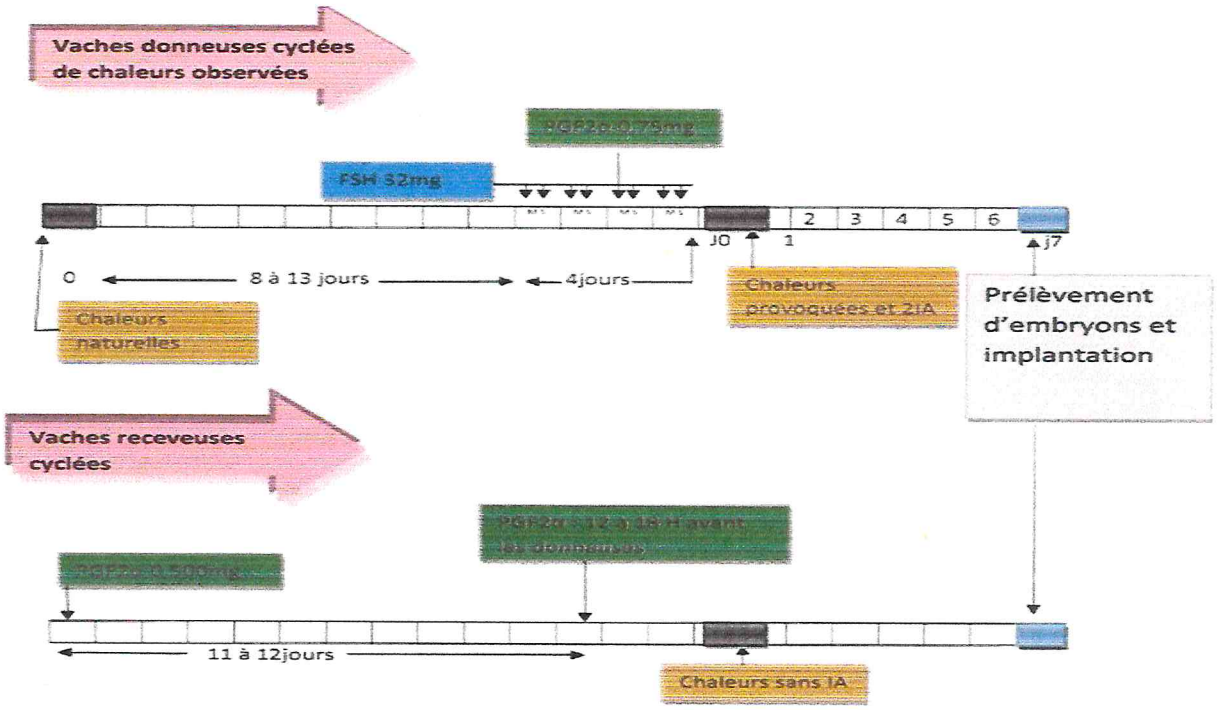


Figure 5 : Schema de traitement hormonaux des donneuses et des receveuses cyclé(Dominique 2003).

L'utilisation répétée de FSH n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la eCG. La société Mérial (Bd Sylvain Dupuis 143 1070 Bruxelles) commercialise le Stimufol. Ce produit contient 500 µg de FSH porcine et 100 µg de LH porcine. Il est fabriqué par le laboratoire de Physiologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire.

1.2.2. eCG : equine Chorionic Gonadotrophine

Anciennement; PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) ; extraite du sérum de jument gravide entre le 42ème et le 100ème jour de gestation. Le gonadotrophin chorionic équin est une glycoprotéine complexe avec les deux activités de la FSH et celle de LH (Murphy 1984). Le rapport FSH/LH dépend du stade de gestation de la jument. Elle est injectée par voie IM à une dose comprise entre 1500 à 3.000 UI. Sa concentration est maximale dans l'organisme 15 à 32 heures après son injection (Hanzen , 2010).

On lui a montré pour avoir une demi vie (de 40 h) imputable à sa richesse en acide sialique (13 %) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale (Mapletoft 2002). Elle persiste jusqu'à 10 jours dans la circulation de bovin (Dieleman, 1993)

Ainsi elle est injectée une fois a une dose de 1500 à 2000 UI suivie de l'injection de la PGF, 48 h plus tard (Dieleman, 1993). La longue demi vie d'eCG est a l'origine d'une stimulation ovarienne continue, d'où la formation des kystes folliculaires, des profils anormales d'endocrines ainsi qu'une qualité réduite d'embryons (Moor 1993, Saummande 1978. Mickel 1984). Aussi il est indispensable de lui adjoindre une injection intraveineuse d'anticorps anti-eCG à l'heure de première insémination, 12 à 18 h après le début de l'œstrus (Dielemen 1993. Ganzales 1994). Ces anticorps ont pour objet d'inhiber l'action de la eCG et ce faisant le développement d'une seconde vague de croissance folliculaire et d'éviter la formation de follicules kystiques. Elle n'induit qu'une superovulation limitée chez les bovins.le nombre d'embryons de bonne qualité produits par vache donneuse est comparable à celui obtenu avec FSH (Chupind, 1988).

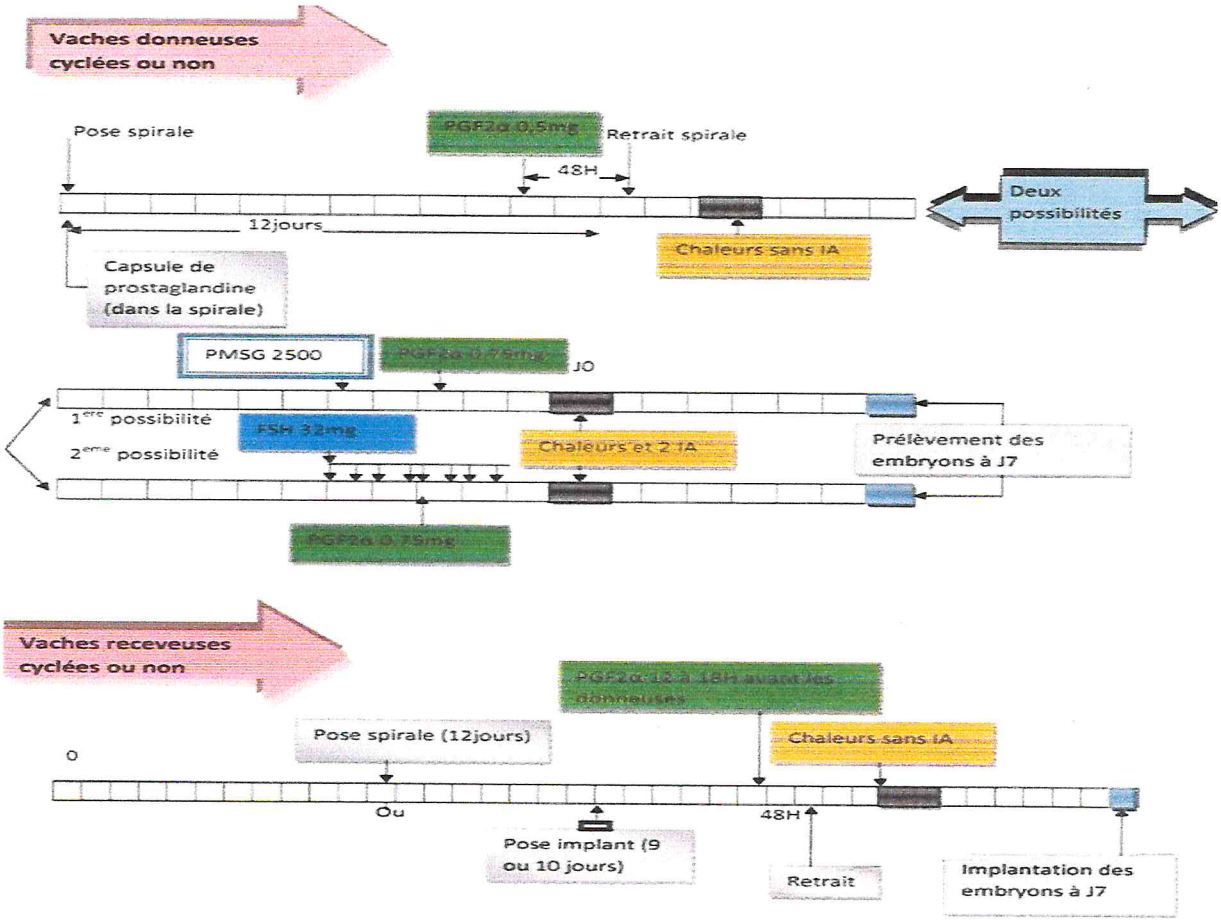


Figure 6: Schema de traitement hormonaux des donneuses et des receveuses cyclé(Dominique 2003).

La répétition des injections de eCG à 1 voire deux mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné la réaction antigénique possible.

*Prostaglandine (PGF_2a)

Dans tous les cas, ces traitements sont renforcés par une injection de prostaglandine 48h après le début du traitement de la superovulation. Cette injection est destinée à dissoudre le corps jaune éventuel, qui s'opposrait à l'ovulation. (figures 5 et 6).

1.3. Facteurs déterminants la réponse de superovulation:

Deux problèmes majeurs sont identifiés dés le début de l'utilisation de la technique de TE: le nombre moyen d'embryons récolté par vache traitée reste faible, ce qui a par conséquence un cout de production élevé, et la fréquence des animaux qui ne produisent aucun ET est trop élevé pour que la technique soit utilisée au mieux dans les programmes d'amélioration génétique (J. Saumande1995).

La variabilité de la réponse ovulatoire des donneuses rend difficile la planification rigoureuse du nombre de femelles receveuses et limite le développement du transfert embryonnaire.

La faible réponse de la SOV peut être due à la perturbation des fonctions physiologiques de l'axe hypothalamo-hypophysaire et ovaro-utérin durant le traitement (Kafi et McGowan, 1997). Il semble même que le faible nombre d'ET récolté résulte de la perturbation du transport des spermatozoïdes dans l'oviducte (Kafi et McGowan, 1997).

1.3.1 Facteurs intrinsèques à la donneuse

1.3.1.1. Âge :

Lerner (1986) rapporte que l'augmentation de l'âge de la donneuse a une influence négative sur la réussite de la SOV et sur la production d'ET. Cette influence négative résulte de la variation de la réponse à la FSH. Il semble qu'à partir de 6 à 9 ans, les vaches tendent à donner un grand nombre d'ovocytes non fécondés et un faible nombre d'ET. Cette diminution est due à la réduction du nombre des follicules capables de répondre au traitement de gonadotrophines (Lerner et *al.*, 1986) ou de la compétence des ovocytes (Pritpal et *al.*, 2007).

Cependant l'âge n'est pas le facteur déterminant de la variation de la réponse de la SOV (Hasler, 1992). Le faible taux de récolte chez les donneuses âgées serait due à la réduction de la compétence des ovocytes à ovuler (Pritpal et *al.*, 2007).

1.3.1.2. Etat de santé:

-La présence d'infections virales: l'impact des infections à pestivirus sur la réponse de la SOV a été évalué par Kafi et *al.* (1997). Les résultats montrent que les vaches infectées donnent peu de CJ palpable et un faible nombre d'ET par rapport aux vaches non infectées de BVD et IBR. Il semble qu'un faible taux d'ovulation est la cause de la faible réponse des vaches infectées.

- La présence d'infections utérines: plusieurs facteurs comme la rétention placentaire, la dystocie et délai d'expulsion des lochies prédisposent la vache aux infections bactériennes utérines. Suite au vêlage, la majorité des vaches se retrouve avec une contamination bactérienne de l'utérus. Les bactéries les plus impliquées sont *Escherichia coli*, *Arcanobactérium pyogenes*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Staphilococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium spp*, *Bacterioides spp* et *Fusobacterium spp* (Bondurant, 1999; Sheldon, 2004).

La présence de certaines bactéries dans l'utérus génère une inflammation utérine (métrite, endométrite) agissant au niveau des ovaires, de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Sheldon, 2004) qui, par conséquent, pourrait modifier la réponse de la SOV. La plupart des infections utérines ont été associées aux modifications de profils hormonaux des vaches qui peuvent être à l'origine de la variation des réponses de la SOV. Par exemple, une endométrite clinique ou subclinique peut être associée à un profil anormal de la P4 entrainant une anovulation, des kystes ovariennes et une longue phase lutéale (Opsomer et *al*, 2000; Royal et al, 2000). Ces anomalies résultent de la perturbation des sécrétions de GnRH par les produits libérés par les bactéries (Karsch et *al*, 2002).

1.3.1.3. Stade du cycle œstral au moment de la superovulation

Le statut ovarien ainsi que la qualité de l'ovocyte au moment de la SOV a toujours été considéré comme le facteur déterminant de la réponse à la SOV chez la vache (Monniaux et *al*, 1983; Bo et *al*, 2002). Il semble que la réponse à la SOV peut être prédite en fonction du nombre de follicules supérieure ou égale à 2 mm de diamètre au moment de l'émergence de la vague folliculaire (Singh et *al*, 2004).

La présence du follicule dominant est un facteur limitant de la réussite de la SOV (Guilbault et *al*, 1991; Huhtinen et *al*, 1992; Lussier et *al*, 1995).

Une diminution de la réponse à la SOV et un faible nombre d'embryons récoltés ont été attribués à la présence de follicules dominants, de plus de 10 mm de diamètre, au moment de la SOV (Grasso, 1989). Ces résultats ont été confirmés par Bungartz et Niemann (1994) sur la base de SOV faite en présence de follicule dominant. L'initiation de la SOV en présence ou après la sélection du follicule dominant résulte en un faible taux d'ovulation à cause de son effet inhibiteur sur la croissance des petits follicules recrutés durant la SOV (Adams et *al*, 1993). Par contre, la suppression du follicule dominant 48 heures avant la SOV a un effet promoteur de la croissance folliculaire et donne lieu à un taux d'ovulation élevée avec moins de variations du nombre d'ET (Guilbault et *al*, 1991; Kim et *al*, 2001). L'initiation de la SOV en présence de 9 à 10 follicules de 3 à 8 mm de diamètre donne lieu à une augmentation significative du taux d'ovulation et de nombre d'ET (Bergfelt et *al*, 1994; Garcia et *al*, 1998). Les résultats de SOV sont les mêmes si les traitements ont été initiés au moment de l'émergence de la première ou de la deuxième vague du fait qu'il n'y a pas de différence du nombre de follicules recrutés, du nombre d'ovulations induites et du nombre d'embryons et d'ovocytes récoltés entre l'initiation de la SOV durant la première ou la deuxième vague folliculaire (Adams, 1994). Par contre, l'initiation de la SOV 1 jour après l'émergence des vagues semble réduire la réponse du traitement car peu de follicules sont recrutés résultant en un faible taux d'ovulation (Nasser et *al*., 1993).

1.3.1.4. Variation du temps de maturation des follicules et moment de l'IA

Il semble que la différence en termes de stade de développement des embryons récoltés après la SOV résulte de la variation du temps de maturation des follicules et du moment de l'IA (Dominko et Firsti, 1997).

En effet, 35 heures après IA, la plupart des embryons sont au stade de 2 cellules. L'IA juste après la formation des corps polaire de l'ovocyte donne lieu à une diminution du taux de clivage de l'embryon au stade de 8 cellules. Par contre, la retardation de l'IA améliore significativement le développement des embryons au stade de 8 cellules, car ce délai permet un bon développement et une bonne maturation de l'ovocyte et éventuellement la réussite de la fécondation (Dominko et Firsti, 1997).

Durant la SOV, des follicules ovulent alors que d'autres n'ont pas encore achevés leur croissance. La maturation des follicules des vaches surovulées ne se fait pas en même temps. La SOV induit une relâche précoce de la LH qui ne permet pas aux follicules d'acquérir une maturation adéquate. Ce phénomène résulte de la perte des activités mitotiques et de l'expansion de la membrane de la granulosa des follicules 24 à 26 heures après le pic de LH

(De Loos et *al*, 1991b). Ces anomalies ont été rapportés, surtout lorsque la SOV a été faite à l'aide de l'eCG (Murphy et Martinuk, 1991; Laurincik et *al*., 1993a).
L'asynchronie de l'ovulation des follicules résulte de l'action de la LH contenu dans les gonadotrophines utilisées et la production de P4 vers la fin de la SOV (Callesen et *al*., 1988). La LH des gonadotrophines induit l'ovulation des follicules larges au début de la SOV tandis que la présence de P4 élevé (due à la supplémentation de P4, CIDR) durant la période préovulatoire entraine la défaillance de l'expression de la chaleur ainsi que la relâche de la LH. Cette dernière perturbe l'activité mitotique des follicules qui retarde l'ovulation (Foote et Ellington, 1988).

Dans le cas de l'insémination artificielle (IA) programmée à un moment déterminé après l'arrêt du traitement, le succès de la fécondation des ovocytes est en partie limité par la variabilité du moment de l'ovulation par rapport à l'IA (Ponsart et al 2004).
La tendance à observer de meilleurs résultats de production d'embryons chez des donneuses inséminées plus de 10 h après le pic de LH, suggère que le moment de l'IA pourrait être optimisé, ce qui permettrait d'une part d'agir sur une variabilité intrinsèque de l'animal (stock de follicules stimulables) et d'autre part, d'obtenir des réponses moyennes optimales (Lafri M et al 2008).

1.3.2. Facteurs extrinsèques à la donneuse

1.3.2.1. Température, saison et environnement

Les génisses surovulées sous l'influence du stress thermique produisent plus d'embryons anormaux (Putney et *al*., 1988). Les températures et humidité élevées altèrent la croissance des follicules (Wolfenson et *al*., 1995) en affectant négativement les cascades enzymatiques de la stéroïdogenèse des cellules de la thèque des follicules (Misra et *al*., 1993) qui entraine une production d'embryons de mauvaise qualité (Kafi et McGowan, 1997).

L'effet de la saison sur la réponse de la SOV résulte de l'effet du stress thermique sur la vache (Kafi et McGowan, 1997). Les études menées par Misra (1993) et Ryan et *al*. (1993) indiquent que la réponse de la SOV durant l'été donne lieu à un faible taux de fécondation et de nombre d'ET. Le faible taux de fécondation des ovocytes pendant l'été résulte de l'effet du stress thermique sur la maturation des ovocytes (Sartori et *al*, 2002).

L'impact de l'environnement sur l'efficacité de la SOV réside sur l'action du stress environnemental sur la sécrétion des gonadotrophines. Il semble que le transport des vaches

durant le traitement de SOV à la FSH donne lieu à un faible taux d'ovulation due à la sécrétion de cortisol (Edwards et *al*, 1987; Gilad et *al*, 1993).

1.3.2.2. Nombre de SOV précédentes :

En général, la fréquence des surovulations affecte la réponse ovarienne des vaches. Le taux de fertilisation est négativement affecté par le nombre de surovulation (Hasler et *al*., 1983).

Le taux passe de 77% (à la première récolte) à 44% après 10 SOV consécutives. Toutefois, les faits sont contradictoires (Hasler et *al*, 1983).

Henzen, 2004: le traitement de la SOV n'a pas un effet négatif sur la fertilité ultérieure des vaches ; 98% des vaches peuvent être inséminées dans les 25 jours suivant la récolte.

1.3.2.3. Effet de l'insémination artificielle et de la semence :

Le nombre d'insémination a été progressivement réduit à deux (12h après le début des chaleurs) sans que le pourcentage d'œufs soit affecté (J. Sanmande, 1995). Il a été montré que si l'œstrus était détecté avec beaucoup de rigueur une seule IA est suffisante (Lacaze et al 1992). Ces même auteures non pas mis en évidence l'effet taureau. Et il faut penser que le choix de taureau dépend en premier lieu de la caractéristique d'origine génétique.

Il y a une corrélation positive entre la fertilité de la semence utilisée et le taux de fécondation des ovocytes chez les vaches surovulées (Callaghan et King, 1980). Le taux de fécondation varie de 89% pour une semence dont la fertilité est au dessus de la moyenne, à 70% pour une semence dont la fertilité est en dessous de la moyenne. En outre, la congélation de la semence semble avoir un effet négatif sur la fécondation des ovocytes. La comparaison de 5 semences congelées montre que le pourcentage d'embryons récoltés variait de 32,6 à 84,4% (Misra et *al*, 1999b). Par ailleurs, il semble que le nombre d'embryons récoltés résulte du nombre de spermatozoïdes contenu dans la semence (Kafi et McGowan, 1997).

1.3.2.4. Nutrition

La relation entre la nutrition et la reproduction est complexe car la nutrition agit à différents niveaux du système reproducteur (Santos et *al*., 2008). Briant et al,2007 ; Santos et *al*, 2008: l'état corporel et le statut nutritionnel interviennent précocement et tout au long du

processus de croissance folliculaire, notamment sur le nombre de follicule recrutés, donc la nutrition de la donneuse peut influencer la qualité des ovocytes et des embryons récoltés ().

La réduction de l'apport alimentaire affecte la croissance folliculaire et contribue, par conséquent, aux variations de la réponse à la SOV (Murphy et *al.*, 1990). La persistance d'une balance énergétique négative postpartum (BEN) favorise la mobilisation des acides gras libres. Ces derniers; qui à leur tour, affectent la viabilité des embryons (Leroy et *al*, 2008). La réponse à une SOV varie en fonction des conditions de chair des donneuses (Baruselli et *al.*, 2006). Une variation du taux d'ovulation de 39,7 à 56,7% résulte de l'augmentation de la condition de chair de 3,0 à 4,0. Une supplémentation en minéraux et en vitamines de la diète des donneuses serait nécessaire (Vaughan, 1990). Les effets négatifs d'une suralimentation au moment de l'insémination et pendant le développement embryonnaire est de plus en plus évident et s'expriment par une augmentation du métabolisme des hormones stéroïdiennes au niveau du foie ce qui provoque une diminution de P4 circulante et par conséquent une diminution du développement et de viabilité de l'embryon (Santos et *al.*, 2008). Par exemple, une hyperglycémie chez la vache est associée à la production d'embryons de mauvaise qualité (Gong et *al*, 2002). Alors qu'une hyperinsulinémie et une augmentation de l'insulin like growth factor 1(IGF-1) affectent le transport de glucose au niveau de l'embryon, et le rend vulnérable à l'apoptose (Armstrong et *al*, 2002).

1.3.2.5. Méthode de récolte

Le faible taux de récolte embryonnaire ne résulte pas seulement de la réponse à la SOV. La méthode non chirurgicale est la plus utilisée, car elle est répétable, se fait à la ferme et n'affecte pas le tractus reproducteur. Le taux de récolte d'embryon par cette méthode varie selon les études. Ces variations peuvent être dues aux différences entre les techniques utilisées, l'habilité de la personne et les variations des traitements de SOV. Il est évident qu'il y a des variations dans la technique de récolte non chirurgicale. Selon les études de **Sartori** et ***al.* (2002),** le taux de récolte d'embryons varie en fonction de l'endroit où le ballonnet est placé. La pose du ballonnet dans les pointes des cornes donne un taux de récolte de 30,9% tandis que la pose du ballonnet juste après la bifurcation des cornes donne un taux de récolte de 60,3%.

2. Récolte :

Après leur sortie de l'oviducte (J_4-J_5), les embryons sont collectés dans l'utérus avant leur éclosion (qui a lieu à J_9), La collecte est donc réalisée entre J_6 et J_8 après IA et presque toujours à J_7 (Nibart, 1991).

Tableau1: stades de développement embryonnaire normale en fonction des jours de l'œstrus d'une donneuse (Seidel et al ; 1991)

Stade de développement	Jours après début de l'œstrus
1-cellule	0-2
2-cellules	1-3
4-cellules	2-3
8-cellules	3-5*
16-cellule	4-5*
Jeune morula	5-6
Morula compacte « tight morula »	5-7
Jeune blastocyste	7-8
blastocyste	7-9
Blastocyste expansif	8-10
Blastocyste éclos	9-11

* Embryon en général se déplace de l'oviducte vers l'utérus du stade 8 au 16 cellules

1. Techniques de récoltes :

1.1. Récolte invasive « chirurgicale » :

Réalisée sous anesthésie générale la récolte invasive était, autrefois, la seule technique de collecte des embryons, à la faveur d'une incision au niveau de ligne blanche en avant du pis, l'utérus était extériorisé, une incision d'un cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter à deux voies (sonde de FOLLEY). Le ballonnet était ensuite gonflé. (Curtis *et al,* 1991).

Le liquide de récolte était injecté vie une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet qui assure l'étanchéité. Après récolte, le ballonnet est dégonflé, l'utérus et les plans chirurgicaux sont suturés. Cette technique à pour avantages un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80 %), la possibilité de juger la réponse ovarienne au traitement de superovulation par un comptage direct des corps jaunes. Elle

fut pratiquement abandonnée étant donné la lourdeur de sa mise en œuvre mais aussi la difficulté de la pratiquer plusieurs fois chez un même sujet (Curtis *et al,* 1991).

Figure 7 : Collecte par voie chirurgicale (Idres T, 2011)

1.2. Récolte non chirurgicale : ou dite par voix cervicale :

cette procédure plus ou moins récente a permis de facilité la récolte embryonnaire pour le praticien du TE, en plus de la réduction des risques de complications chez la donneuse (complication opératoires et postopératoires (Gordon , 1996).

La toute première étape de cette technique est la palpation ovarienne pour estimer le nombre de corps jaunes sur chaque ovaire et donc d'évaluer la réponse superovulatoire (dans certain circonstance les donneuses qui ont mal ou pas répondu, ne sont récoltés) (Seidel, 1992).

Une anesthésie épidurale basse est recommandée pour la procédure de récolte non chirurgicale. La zone d'élection pour l'anesthésie est la base de l'insertion de la queue avec le sacrom ; plus précisément entre la $1^{ère}$ et la $2^{ème}$ vertèbre coccygienne. La zone est tendue et lavée avec du savon iodé et ensuite badigeonné avec de l'alcool à 70° pour prévenir les infections spinales. Une quantité de 5 ml d'une solution stérile de 2% de procaïne est suffisante. Une bonne épidurale basse se constate par une flaccidité de la queue (Seidel, 1992).

Lorsque l'anesthésie prend effet, la queue est attachée sur un coté l'arrière train est nettoyé de ma bouse et de la boue le rectum est vidé de toute matière fécale. La zone vulvaire est nettoyée entièrement, par un bon lavage au savon iodé puis un rinçage abondant est pratiqué

L'opération proprement dite commence par l'introduction de la sonde de Foley (voir figure8) entre les deux lèvres vulvaires puis le passage de celles-ci à travers les anneaux cervicaux l'operation est entièrement guidée par l'autre main, placée dans le rectum (Seidel, 1992).

Lors du passage de la sonde de Foley dans l'utérus ; on a le choix entre deux approches pour positionner le ballonnet; celles-ci sont nommées « Flushing » du corps ou des cornes. La première se fait en gonflant le ballonnet juste après le cervix. 10 à 20 CC d'air suffisent avant de le clamper. Un excès de gonflement peut provoquer la rupture de l'endomètre. La deuxième se fait toute en plaçant le ballonnet à l'entrée de la corne choisie après la bifurcation (à travers 3 à 4 cm après celle-ci) (voir figure9).

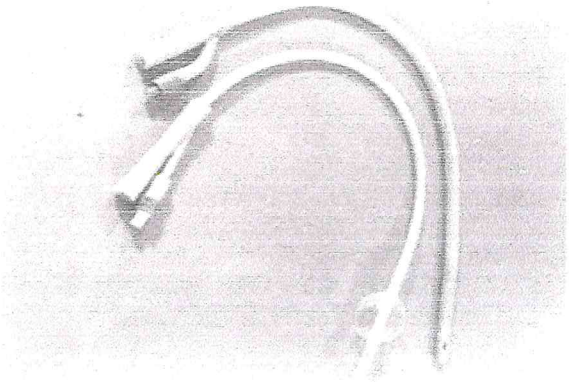


Figure8:sonde à deux voies dite de Foley avec sans ballonnet gonflé.(Kuzan et Seidel, 1986)

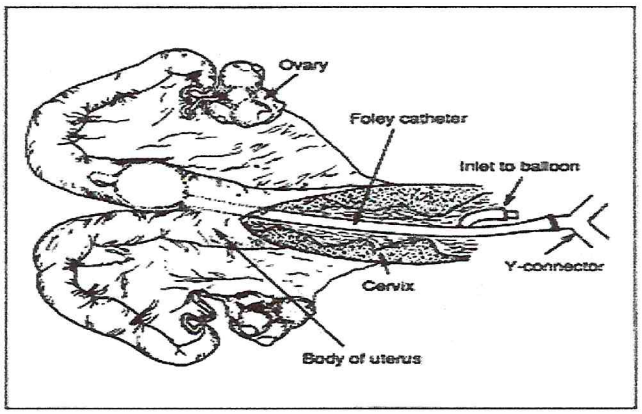


Figure9: position de la sonde de Foley pour un Flushing et des cornes (Seidel 1991).

La technique se résume à injecter le liquide de récolte préalablement chauffé à la température du corps puis le récupéré (la récupération se fait automatiquement pour la sonde à trois voies « capillarité » car la voie de drainage est différente de la voie d'injection des liquide de récolte, alors que la sonde à 2 voies se fait avec aspiration des fluides par la meme voie d'administration grace à une grosse suringue . Un massage utérin durant l'opération est préconisé pour détacher d'éventuels embryons accrochés ou piégés sur la paroi. Les liquides récoltés sont envoyés au laboratoire et ils sont laissés pour décompter ou sinon filtrés à travers des filtres spéciax pour embryons de la taille de 75µm. Le culot ou le sédiment résultant est examiné sous un bon binoculaire (Seidel, 1992).

2.2. Examen et classification des embryons:

Les embryons récoltés après superovulation se présentent sous des aspects morphologiques divers.

Il est important d'apprécier la qualité des embryons avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques éventuelles (Hanzen ; 2000). Les plus importants critères de tout schéma de classification des embryons doivent être basés sur les caractères

morphologiques facilement reconnaissables, et devront être retenus en relation aux taux de gestation estimés, et attendus pour chaque grade (Seidel et al, 1991) (tableau 2). Le tableau fournit une classification des embryons selon 4 catégories d'embryons transférable, évaluant le meilleurs taux de gestation pour chaque groupe.

Tableau2: taux de gestation des embryons classés dans 4 groupes basés sur la morphologie (Seidel et al, 1991)

Classification	Nombre	Pourcentage des embryons	Taux de gestation
Excellent	275	54	63[a]
Bon	152	30	58[a]
Moyen	42	8	31[b]
Pauvre	42	8	12[c]

[a, b, c] taux de gestation avec différentiels P<05

Il est clair que ce type de système de classification des rangs d'embryons est raisonable, puisqu'il se base sur des données statistiques (Elsden *et al.*, 1978).

L'évaluation de la qualité des embryons se fait par l'intermédiaire de la taille, de la couleur, du nombre et de la compacité des cellules, de la taille de l'espace périvitellin, du nombre de cellules dégénérées, et du nombre et de la taille des vésicules.

L'INRA-UNCEIA donne une définition précise de quatre qualités différentes.

Tableau 3: classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA- UNCEIA 1990).

Classification	Qualité	Description
1	Excellent	Embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique avec des cellules de couleurs et de texture comparables. Blastomères polygonaux au stade morula aspect compact.
	Bon	Embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte . Ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique. Ou exclusion de quelque blastomères dans l'espace périvitellin.
2	Moyen	Embryon en retard de développement 1 à 2 jours blastomères sphériques au stade morula ou des défauts bien précis comme : Nombreuse cellule échappées dans l'espace périvitellin, des vésicules des cellules dégénérées blastomères de taille variable. Aspect plus clair ou plus sombre que normal.
3	Médiocre	Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, de tailles différentes, des vésicules grosses et nombreuses ; mais présence d'une masse celullaire homogène qui apparait viable.
4	Mort ou dégénéré	Arrét de développement à un stade précoce. Celulles dégénées.

Quelques uns des laboratoires ont un classement de 6 niveaux; pour ceux classés congelables ou transférable est fondé sur une classification finale avant congélation ou transfert, cette étapes est basé sur un remplissage d'un formulaire à point, détaillant quelques critères suivants: l'âge(jours après l'œstrus), nombres de cellules, couleurs de cytoplasme, zone de dégénérescence, nombres de blastomère expulsées, taille de l'espace périvitellin, stade de développement embryonnaire et le nombre de jours de retard s'il existe par rapport à la normale. Après cette notation les embryons sont classés dans les 6 catégories suivantes :

- **Excellent:** parfait embryon pour son stade
- **Bon:** imperfections insignifiants tel que une zone pellucide ovale et un petit nombre de cellules expulsés ou une forme légèrement asymétrique.

- **Moyen:** anomalies peu nombreuses à titre d'exemple: un nombre modéré de cellules expulsées, petite taille un peu de dégénérescence ou un retard de développement d'un jour.
- **Pauvre:** dégénérescence considérable, cellules vésicules, grande variation de taille de cellules, défaut de compaction, très petit et/ou un retard de 2 jours.
- **Dégénéré**: de sévère dégénérescence sans valeur transférable.
- **Non fécondé ou embryon avec 2 - 3 cellules.**

Il est souvent impossible de déterminer si un embryon est très dégénéré ou c'est un ovocyte non fécondé, même si l'embryon contient 2 ou 3 cellules par ce qu'un ovocyte non fécondé peut être fragmenté (Amara 2003).

D'après Kennedy et al (1983); Cinq échelles ont été utilisées pour repartir morphologiquement les embryons des vaches avant et après une cryoconcervation. Les détails de ce système de classification sont montrés dans ce tableau n'3:

Tableau 3: notion d'embryon de vache sur des bases et des carecteristiques morphologiques (d'après Kennedy et al 1983).

Le niveau	La qualité	Caractères typiques des embryons
Grade 1	Excellent	Embryon parfaitement symétrique, montrant de la granulation égale et un contour précis, distinct; aucune expulsion de blastomère. l'embryon devra être à l'étape attendue de son développement par rapport à son âge.
Grade 2	Bon	Embryon montrant une granulation égale avec un contour précis et distinct, quelques blastomères expulsés et un nombre précis de blastomère dégénérés; par fois de forme asymétriques symétrique.
Grade 3	Moyen	Les embryons sont intactes mais avec un contour brumeux par endroit défaut évident et apparent tel que des cellules expulsé vésiculisation, et quelques-uns des blastomères dégénérés.
Grade 4	Pauvre	Les embryons montrent de la granulation irrégulière un contour brumeux beaucoup d'expulsion de blastomères et une dégénérescence évidente quelques fois de formes anormale.
Grade 5	Dégénéré	La dégénérescence est danc prononcée avec une impossibilité de déterminer le stade exacte de développement; quelques fois de formes anormale.

Le devenir de l'embryon peut dépendre de ces qualités, car l'IETS que si les embryons de qualité 1 à 3 sont transférables en frais, et seul les embryons de qualité 1 sont congelables (Legrand, 2003).

Chaque embryon est alors logé dans une paillette, entre deux bulles d'air, paillette obturée par des poudres de différentes couleurs pour identification.

Apres, les embryons sélectionnés pour la congélation passent dans un congélateur progressifs, jusqu'à -196°. Les autres maintenus à -15°, sont utilisables sur les receveuses dans un délai de 24 à 36 heures (Hanzen; 2000).

Chapitre III La cryoconservation des embryons:

1. Introduction :

La conservation des embryons récoltés sur un animal donneur ou obtenus par fécondation *in vitro* constitue une étape essentielle du transfert d'embryons. Cette conservation peut s'envisager à court ou long terme (Hanzen. 2010).

Les premières conservations d'embryons par le froid chez la vache datent des années 70 (Wilmut et Rowson 1973). Un refroidissement lent (0,2°C/min) en présence de DMSO comme cryoprotecteur était utilisé, avant stockage des embryns dans l'azote liquide (-196° C).

Dans les années 80 se développe une nouvelle technique de cryoconservation, la vitrification, qui consiste à plonger très vite les embryons dans l'azote liquide (Rall et Fahy 1985, Scheffen *et al* 1986).

Aujourd'hui, grâce aux énormes progrès réalisés, la cryoconservation des embryons fait partie des biotechnologies de pointe (Guingot, 2005). Les avantages économiques, sanitaires et génétiques apportés par cette technique sont très importants pour les éleveurs et les sélectionneurs. En Europe, en 2003, plus de la moitié des transferts embryonnaires bovins se sont faits à partir d'embryons cryoconservé (Guingot, 2005).

Une multitude de protocoles sont réalisés, allant de la congélation lente, à la vitrification traditionnelle ou ultra rapide, avec différents cryoprotecteurs organiques pénétrant dans les cellules ou non.

2. Principe de la cryoconservation:

La cryoconservation doit permettre le ralentissement, voire l'arrêt de tous les phénomènes biologiques; à des températures inférieures à - 150° C, les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées: le temps cellulaire est suspendu (Guignot, 2005). Cependant, à cette température, l'eau, constituant majeur de l'embryon, est sous forme solide. Le problème de la cryoconservation réside donc dans le fait d'atteindre des températures très basses et d'en revenir sans trop de dommages, c'est-à dire de permettre à l'embryon, lors du réchauffement, de revenir à un état liquide viable (Guignot, 2005).

3. Intérêt de la cryoconservation:

- La cryoconservation des embryons a un intérêt économique et génétique non négligeable.

- ❖ Elle permet la sauvegarde des espèces et des races en voie d'extinction, le maintien et le stockage de la biodiversité dans une cryobanque nationale.
- ❖ Le transport de matériel génétique plus facilement que l'animal sur pied, évitant ainsi la perte d'animaux importants génétiquement pendant le transport, réduisant les risques sanitaires et permettant une commercialisation plus facile et moins coûteuse d'animaux à forte valeur génétique.
- ❖ La cryoconservation permet également une régénération plus facile et plus rapide des lignées lors de maladies ou de catastrophes impliquant la disparition d'un troupeau entier.

Enfin, c'est une technique qui a un avantage certain en terme de taux de survie après transfert par rapport à la cryoconservation des ovocytes. Cette dernière; est loin de pouvoir rentrer dans des programmes de conservation de la diversification génétique. car, pour l'instant, elle est encore au stade expérimental avec des résultats très limités et surtout très peu de données après transfert.

4. Type de cryoprotecteurs:

Il existe 2 types:

Cryoprotecteurs pénétrant

- ceux qui pénètrent dans les cellules de l'embryon (glycérol, DiMethylSulfOxyde (DMSO), éthanol, éthylène glycol)

Cryoprotecteurs non pénétrant

- ceux qui restent à l'extérieur des cellules (Polyvinylpyrrolidone (PVP), saccharose, glucose).

Ces substances sont en général ajoutées en différentes étapes pour éviter les chocs osmotiques qui pourraient endommager les cellules embryonnaires. 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 (Groza et al ; 2009).

5. Rôle des cryoprotecteurs:

Tous les cryoprotecteurs ont pour but de préserver l'embryon de la formation de cristaux de glace intracellulaires pendant le refroidissement, de faciliter la déshydratation des cellules, de protéger les membranes cellulaires et d'éviter le phénomène de recristallisation lors du réchauffement de l'embryon avant transfert dans une femelle receveuse.

6. Les dommages engendrés :

La congélation cellulaire constitue un processus physicochimique complexe de la température et le transport de l'eau entre la cellule et le milieu environnant (Mapletoft, 1985).Il existe un taux de refroidissement optimum pour chaque type cellulaire. Il dépend de la taille de la cellule, son rapport volume/surface, sa perméabilité à l'eau, et au coefficient de la température de cette perméabilité (Mapletoft, 1985).

Des cellules sont blessées durant la congélation et le dégel principalement par les effets de la solution et par la formation de glace intracellulaire (Mapletoft, 1985).

5.1. Formation de glace intra cellulaire:

Au cours du refroidissement l'eau des cellules embryonnaires se transforme en cristaux de glace intracellulaire, au fur et à mesure que la température décroît, la taille des cristaux qui se forment augmente, ce qui présente un risque de lésion pour les membranes et les organites cellulaires, tels l'appareil de Golgi, les mitochondries, les lysosomes, ainsi qu'un risque de dénaturation du cytosquelette des cellules. Ces risques peuvent altérer de façon critique les fonctions de la cellule (Guignot, 2005).

5.2. La surfusion:

La glace ne se forme le plus souvent que si le point de congélation est dépassé. Cependant, il arrive que des températures inférieures à celles du point de congélation puissent être atteintes sans qu'il n'y ait formation de glace. C'est l'état de surfusion. Il est particulièrement instable. Il suffit d'une vibration, d'un choc mécanique, d'une injection d'azote liquide ou d'une impureté pour initier le processus de cristallisation (Hanzen, 2010). Une fois amorcé ce processus de cristallisation (seeding), on constate que la température remonte jusqu'à celle correspondant au point de congélation de la solution utilisée. Un pic de surfusion trop important (> 2°C) est préjudiciable à la survie des embryons (Hanzen, 2010).

5.3. Effet solution :

Pour éviter intracellulaire la congélation, embryons doit être refroidie à lC/min ou plus lent. Cependant, un taux trop bas du refroidissement peut également endommager des cellules par ce qui désigné sous le nom de l'effet de solution

Lors du refroidissement, les premiers cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire, induisant une augmentation des sels dissous dans ce compartiment et une hypertonicité de celui-ci. Par osmose, l'eau des cellules embryonnaires va donc sortir dans le milieu extracellulaire. C'est l'effet solution (Gongnot, 2005). Il présente un grand risque pour

l'embryon, car une augmentation trop forte de la concentration des solutés intracellulaires entraînerait la modification de la structure tertiaire et le fonctionnement des protéines, et la mort cellulaire par effet de salage. De plus, il pourrait induire une trop forte contraction du volume embryonnaire (Gongnot ; 2005). Même avec une certaine résistance mécanique à l'étirement de la membrane plasmique, à chaque déshydratation et réhydratation, le volume cellulaire est modifié, générant des stress mécaniques pour la membrane, et une modification trop rapide de la surface cellulaire entraînerait des ruptures irréversibles de celle-ci.

7. Les méthodes de cryoconservation:

7.1. La congélation lente:

7.1.1. Principe :

C'est l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon. Les cryoprotecteurs utilisés sont le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO ou encore le propane-diol, à la concentration de 10 % environ. L'incorporation des cryoprotecteurs a tendance à se faire en une seule étape actuellement, mais elle peut se faire en plusieurs étapes : les embryons sont alors déposés dans différents bains de concentrations croissantes en cryoprotecteurs environ 5 minutes dans chaque bain), afin d'éviter les chocs osmotiques importants.

Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes de 0,25 ml (figure10) qui vont être réfrigérées suivant un protocole précis, nécessitant un appareil de congélation programmable pour régler les différents paliers de refroidissement successifs. La température descend tout d'abord jusqu'à - 7° C à la vitesse de 1 à 3° C/min pour les appareils programmables 3(congélateur à circulation d'eau notamment); pour les autres appareils (congélateur à bain d'alcool et à azote liquide), la descente jusqu'à - 7° C n'est pas programmable, les paillettes sont déposées dans l'appareil de congélation préalablement refroidi à - 7° C. Dans tous les cas, les paillettes sont maintenues à - 7° C pendant 5 minutes environ, avant l'induction de la cristallisation (« seeding ») par refroidissement localisé de celles-ci à l'aide d'une pince refroidie dans l'azote ou grâce à un système incorporé à l'appareil de congélation.

La cristallisation doit être induite par l'opérateur avant qu'elle ne se fasse de manière spontanée afin d'éviter une congélation des cellules à une température trop basse qui entraînerait une baisse brutale de la température (pic de surfusion) dans la paillette et provoquerait par conséquence des dégâts cellulaires.

La température de « seeding » dépend du point de congélation de la solution, donc elle peut varier en fonction des cryoprotecteurs utilisés (- 6° C à - 7° C). De - 7° C à 30° C, la température descend très lentement (0,1 à 0,3° C/min) pour permettre la déshydratation des embryons.

En fonction des protocoles, l'arrêt de la descente progressive de température se fait entre - 25° C et - 35° C. Les paillettes sont ensuite rapidement plongées dans l'azote liquide à - 196° C, pour éviter une déshydratation trop poussée qui serait létale pour l'embryon. Dans ces conditions de cryoconservation, la déshydratation des cellules embryonnaires n'est donc que partielle : il reste une certaine quantité d'eau intracellulaire qui se transforme en glace. Pour empêcher le phénomène de recristallisation de cette eau au dégel, il faut décongeler rapidement les paillettes. Elles sont donc plongées rapidement dans un bain-marie à une température comprise entre 22 et 37° C selon les protocoles. La vitesse de réchauffement est de l'ordre de 2 500° C/min.

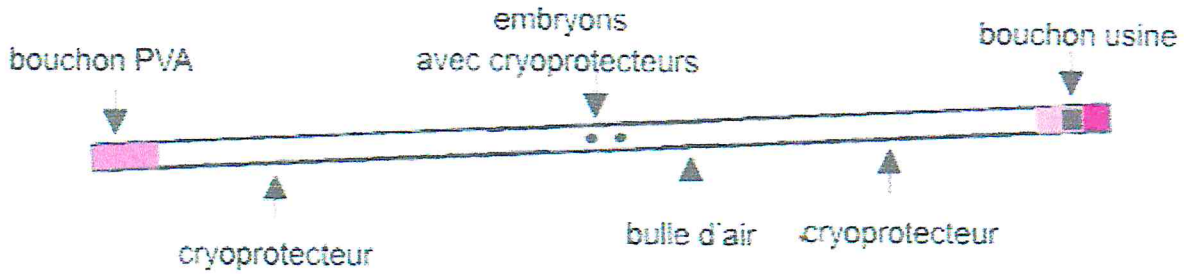


Figure10 : Congélation lente (paillette de 0,25ml)

7.1.2. Avantage:

Cette technique est facile à mettre en œuvre. Les temps dans chacun des bains sont relativement longs, ce qui peut permettre à une personne peu expérimentée de pratiquer cette -

-Les cryoprotecteurs sont utilisés à des concentrations relativement peu toxiques. Elles donnent des résultats très reproductibles et qui sont à peine inférieurs à ceux obtenus après transfert des embryons frais, environ 10 à 15 % de moins (Hasler 2001). La possibilité de faire des transferts directs évite d'avoir recours à une équipe de spécialistes pour faire le transfert, et les taux de mises bas sont aussi bons qu'après retrait des cryoprotecteurs (Baril *et al* 2001a, Martinez *et al* 2002a).

7.1.3. Inconvénients:

-Cette technique est très coûteuse en temps et en argent. Pour le refroidissement, il faut nécessairement faire l'achat d'un congélateur programmable. Un cycle de refroidissement ne

peut être lancé que lorsque tous les embryons sont prêts à être congelés ce qui fait que certains embryons peuvent attendre avant d'être refroidis.

-D'autre part, cette technique ne convient pas à toutes les espèces, notamment l'espèce porcine, ni à tous les stades de développement. Or, c'est la technique classiquement utilisée sur le terrain pour la congélation des embryons bovins, caprins et ovins produits *in vivo* (Guignot, 2003).

7.2. La vitrification:

7.2.1. Principe

Méthode de cryoconservation extrêmement simple, visant à obtenir un embryon à l'état « vitreux » (Ponsart et al 2004), par remplacement plus important de l'eau intracellulaire par des agents cryoprotecteurs en plus haute concentration (6 à 7,5 M) et en doses croissantes couplée à un refroidissement très rapide (ponsart et al 2004), pour limiter les chocs osmotiques liés aux très fortes concentrations en cryoprotecteurs utilisées, l'eau passant en effet beaucoup plus vite les membranes que les cryoprotecteurs, même de petite taille (Guignot, 2005). Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes, avec de part et d'autre de l'embryon, des colonnes de solution de dilution contenant des sucres (galactose, saccharose, tréhalose…) puis immédiatement et rapidement plongés dans l'azote liquide (refroidissement de l'ordre de -2500°C/min, en paillette de 0,25 ml (figure11). Au dégel, les paillettes sont rapidement plongées dans un bain marie à 25 – 30°C. Les embryons sont ensuite rincés et transférés dans une femelle receveuse (Baril et al 2001a, 2001b).

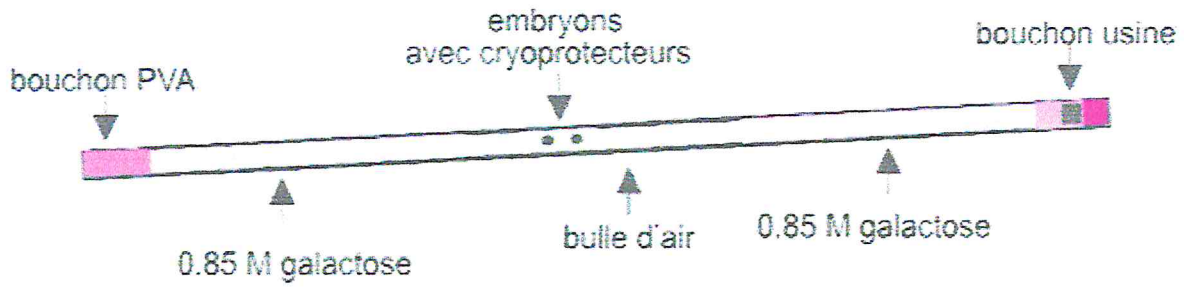


Figure11: vitrification (paillette de 0,25 ml) ou congélation lente avec transfert direct.

7.2.2. Avantage :

Cette technique est très rapide, elle ne nécessite pas d'équipements coûteux, et les embryons peuvent être vitrifiés au fur et à mesure de leur collecte (pas de temps d'attente contrairement à la technique de congélation lente).

Le passage direct de l'état liquide à l'état solide est un point très important surtout pour les embryons supportant mal le refroidissement comme les embryons de porc.

7.2.3. Inconvénients :

-Il est difficile d'appliquer cette méthode de façon tout à fait répétable en ferme, du fait du manque de "souplesse" des protocoles (Ponsart,2004), lié à la toxicité des cryoprotecteurs utilisés à fortes concentrations et à l'enchaînement d'étapes d'équilibration extrêmement courtes et précises(Guignot, 2005) ; le temps de passage dans chacun des bains, surtout le dernier est très critique : la déshydratation de l'embryon doit s'arrêter à un temps précis, dépendant de la vitesse de pénétration des cryoprotecteurs et de leur concentration ainsi que de la température d'incubation. Il faut donc respecter scrupuleusement les temps imposés, d'où la nécessité d'avoir une main un peu experte pour réaliser cette technique (Guignot, 2005).

-Cette méthode est encore au stade expérimental pour les embryons porcins et équins. Chez les embryons bovins, caprins et ovins, la congélation lente est entrée dans la pratique, et donne des résultats très satisfaisant sur le terrain et similaires à la vitrification (Guignot, 2003).

7.2. La vitrification ultra rapide:

Repose comme son nom l'indique sur des vitesses de refroidissement encore plus rapide, de l'ordre de 20 000°C/min. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié et à la faible épaisseur des parois des paillettes dans lesquelles sont montés les embryons: des paillettes étirées (Open Pulled Straw d'où le nom de la technique : OPS). Cette technique a permis de conserver l'embryon de porc (Berthelot *et al*, 2000). Un autre système, la« cryoloop », permet également d'atteindre des vitesses de refroidissement très rapides (Guignot, 2003). (Figures12 et 13).

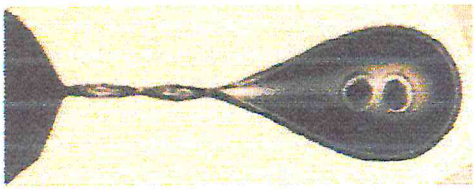


Figure:12 Cryoloop contenant deux embryons (d'après Lane *et al*, 1999).

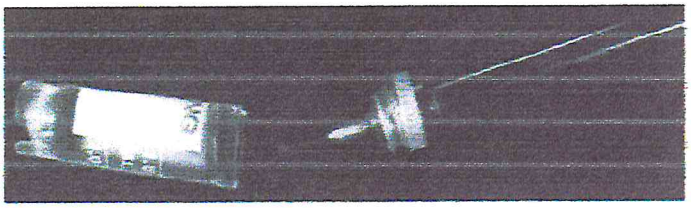


Figure13:Tube où est rangée la cryoloop (d'après Lane *et al*, 1999)

8. Facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation :

Plusieurs facteurs inhérents à la qualité de l'embryon modifient les taux de survie après gel/dégel de celui-ci. Ce sont, l'origine de l'embryon, son stade de développement au moment du refroidissement et l'espèce dont il est issu (Guignot; 2005).

8.1. Origine des embryons (production *in vivo* ou *in vitro*):

Niemann (1991), Hasler (2001), Martinez *et al* (2002b) ont prouvés que dans l'espèce bovine, le taux de mise bas à partir d'embryons produits *in vivo*, et congelés, n'est que légèrement inférieur à celui obtenu après transfert des embryons à l'état frais.

Chez la chèvre comme chez la vache, seulement 30 % de survie embryonnaire ont été obtenus après transfert d'embryons produits *in vitro* et vitrifiés (Vajta *et al* 1997b, Lane *et al* 1998, Traldi 2000) et 42 % après congélation lente (Hasler *et al* 1995).

Les embryons produits *in vitro* différent énormément de ceux produits *in vivo* de par leur structure cellulaire (Crosier *et al*, 2001, Fair *et al* 2001), leur métabolisme et cette différence est dépendante des conditions de culture *in vitro* appliquées. Les embryons produits *in vitro* ont notamment un espace périvitellin plus grand, une plus grande richesse en vacuoles, un nombre réduit de blastomères et de mitochondries, des jonctions entre les cellules trophoblastiques moins nombreuses et une densité plus faible due à un rapport lipides / protéines plus élevé comparés aux embryons produits *in vivo* (Leibo et Loskutoff 1993, Abd El Razek *et al* 2000, Crosier *et al* 2001), ce qui peut expliquer leur forte sensibilité à la congélation. En effet, par exemple, les désordres du métabolisme lipidique induits par la culture *in vitro* peuvent entraîner des changements de la composition lipidique des membranes, et donc des différences de perméabilité aux cryoprotecteurs, ainsi que des changements de stabilité et de résistance membranaires. Des cultures d'embryons *in vitro* sur tapis cellulaires (Rizos *et al* 2001),ou encore les cultures d'embryons en absence de sérum (Abe *et al* 2002, Hoshi 2003), substance connue pour augmenter le taux de triglycérides dans l'embryon par rapport à un embryon produit *in vivo* (Ferguson et Leese 1999), Sont parmis les conditions de culture *in vitro qui* permettent d'obtenir des embryons de qualité quasi équivalente à celle des embryons produits *in vivo*, pour ce qui est de leur résistance au froid. La culture d'embryons bovins issu de fécondation *in vitro* du stade de deux cellules jusqu'au stade blastocyste dans des oviductes de brebis, permet d'obtenir des embryons presque aussi résistants au froid que les embryons produits *in vivo* (Rizos *et al* 2002). L'ajout d'agents antioxydants comme le B mercaptoethanol protégeant l'embryon du stress oxydatif lié à la culture *in vitro* (Feugang *et al* 2004) ou l'utilisation de milieux séquentiels mieux adaptés aux besoins évolutifs de l'embryon pourraient également améliorer leur résistance.

8.2. Stade de développement

Les stades avancés de développement embryonnaire tolèrent généralement mieux la cryoconservation. Dans l'espèce bovine, 40 % de mise bas sont obtenus à partir de blastocystes produits *in vivo* et congelés contre seulement18 % à partir de morula (Martinez *et al* 2002a). Des résultats légèrement inférieurs sont obtenus à partir d'embryons produits *in vitro* et vitrifiés : 32 % de gestation à J 90 avec des blastocytes contre 11 % avec des morula (Pugh *et al* 2000). Par contre, dans l'espèce humaine, comme chez la souris, les embryons plus jeunes sont plus résistants au froid (Mukaida *et al* 2003).

Dans l'espèce équine l'apparition d'une capsule autour des embryons, qui est synthétisée par une coopération entre les cellules du trophoblaste et les cellules de l'endomètre, et ceci quelques heures après l'arrivée de l'embryon dans l'utérus. Seuls les embryons qui ont atteint le stade blastocyste ont donc une capsule de nature glycoprotéique, la capsule a une structure très compacte et très stable qui limite la diffusion des cryoprotecteurs jusqu'au centre de l'embryon et rend la cryoconservation des blastocystes très difficile (Legrand *et al* 2000). Par opposition, les plus jeunes embryons, au stade morula et très jeune blastocyste, de taille inférieure à 300 µm et qui eux n'ont pas de capsule, peuvent être cryoconservés avec plus de succès (Hochi *et al* 1995).

Chapitre IV : Transfert embryonnaire.

1. Intérêt du transfert embryonnaire chez la vache:

Depuis la production du premier veau par transfert d'embryon en 1951, la méthode a été progressivement améliorée et peut désormais être utilisée à des fins commerciales (Mapletoft 1985) :

Dans les pays du tiers monde, le TE trouve ses avantages dans l'introduction de race génétiquement supérieures ; par l'utilisation de femelles bovines indigènes en tant que receveuses. Les embryons transférés acquièrent, de ce fait, une immunisation passive (dite colostrale) relative aux germes présents dans leur nouvel environnement (Seidel G.E. et Seidel S.M. 1981. Youssao *et al,* 2000 Fieni et al 2008). Le transfert d'embryons offre donc des perspectives de recherche favorables à l'amélioration des performances de reproduction (Hare1984).

Utilisé comme vecteur du progrès génétique dans les schémas de sélection, le TE permet, dans les pays développés, une augmentation des performances de production au niveau individuel et donc à l'échelle de l'élevage, (Menissier, 1982).

L'avènement du transfert embryonnaire (TE) a mis à contribution l'apport génétique femelle d'élite en leur permettant d'avoir un plus grand nombre de descendance de qualité sanitaire contrôlée par an (Thibier, 1990).

L'embryon congelé permet sous un faible volume d'exporter de très nombreux animaux (Fieni et al 2008). Et donc promouvant ainsi le capital génétique d'une région à travers le monde (Gerris *et al,* 2005). L'échange de gènes à travers le monde passe dans des conditions de haute sécurité sanitaire (Thibier et Nibart 1991).

La réduction de l'intervalle de génération contribue à une pression de sélection plus importante aboutissant à un progrès génétique plus rapide (Thibier, 1990). Ce dernier est exploiter afin d'orienter les productions d'un élevage ou de les améliorer ou encore de repeupler un troupeau décimé par un abattage sanitaire (Scherzer *et al,* 2007).

Le rendement d'une vache à l'âge de 6 ans tourne autour de 3 veaux, ce même résultats peut être obtenu à l'âge de 2 ans grâce au TE (Colleau *et al,* 1998 ; Gerris *et al,* 2009).

En dépit de l'impact qu'aura un programme de production d'embryon chez des génisses impubères, ces dernières peuvent être exclusivement destinées à être pourvoyeuse d'embryons durant leurs carrières reproductrices.

Les applications de cette méthode sont nombreuses dans le domaine de la recherche mais son enjeu économique se situe surtout dans les programmes de sélection bovine. L'intensité de sélection des femelles peut être doublée dans les troupeaux d'élite, accroissant ainsi les possibilités de produire des taureaux d'insémination et des génisses à hautes performances (Mapletoft 1985).

La technique du transfert d'embryons peut être utilisée aussi pour la détection de caractères récessifs, la production de jumeaux chez les vaches allaitantes, la conservation du matériel génétique de vaches définitivement malades ou de troupeaux infectés (Mapletoft 1985).

Le TE a contribué à engendrer les biotechnologies de la reproduction de 3e génération (sexage d'embryons, fécondation in vitro et reprogrammation nucléaire) (Thibier et Nibart 1991).

2. Historique du transfert embryonnaire chez la vache en Algérie :

L'Algérie accuse un retard indéniable en matière de biotechnologies de l'embryon, les quelques travaux effectués dans ce domaine constituent des sujets de thèses de doctorat, de mémoires de magister et de fin d'étude, c'est à dire que le transfert embryonnaire, et toutes les étapes préalables lui étant attribuées, n'est qu'au stade expérimental.

En 2003, a étudie les réponses aux traitements de superovulation des femelles laitières en testant un extrait hypophysaire le Pluset ® (Laboratoires Calier, S.A., Espagne) et abouti à des résultats pas très concluants .

En 2004, a entreprend une étude comparative de deux extraits hypophysaires en vue de la production d'embryons, il compare ses résultats obtenus en utilisant le Stimufol ® (FMV ULG, Belgique) et ceux obtenus par Amara en 2003 qui a utilisé le Pluset ®, Adel conclut à la supériorité des résultats obtenus par le produit qu'il a utilisé.

En 2006, Kaidi réalise, une étude contributive au transfert embryonnaire chez la vache laitière et compare la réponse aux traitements de superovulation des vaches améliorées et des vaches de race locale.

En 2008, la première publication relative à la race locale parait, entreprise par Ferrouk*et et al,..,* elle rapporte les premiers résultats de la production et du transfert embryonnaire issus de race locale.

En 2011, Idres Takfarines s'intéresse aux doses de Stimufol ® à utiliser chez les races locales afin d'assurer une réponse optimale en terme de superovulation toujours dans l'optique du transfert embryonnaire, pour ce faire, il compara deux doses, 32mg et 40mg et mit en exergue, en passant, plusieurs données sur la physiologie de la reproduction des femelles de races locale.

3. Réalisation du transfert :

Une fois les embryons récoltés, classés et conditionnés, ils sont mis en place dans les receveuses selon deux méthodes : une méthode chirurgicale par le flanc et l'autre méthode non chirurgicale empruntant la voie vaginale et cervicale.

3.1. La méthode chirurgicale:

Le transfert d'embryon a d'abord été mis au point par transposition des méthodes chirurgicales proposées par la recherche vétérinaire (Rowson *et al.*, 1969) et cette méthode a été utilisée en station, puis en ferme, depuis 1951 jusqu'en 1980-1981 (Ponsart 2004) .

Une préparation chirurgicale du creux du flanc précède une anesthésie locale de la peau et des tissus plus profonds. Après incision cutanée, une dissection mousse des muscles abdominaux suivie d'une ponction du péritoine sont réalisées. La corne utérine est saisie et extériorisée dans sa partie proximale. Une incision ponctiforme de sa paroi permet le passage de la paillette montée au préalable sur une seringue de 1 ml. L'embryon est alors déposé dans la lumière utérine. La perforation utérine n'est refermée qu'avec une compression hémostatique de la paroi. Les plans musculaires, sous-cutanés et cutanés sont suturés (Philippe-Olivier, 2001). Des traitements anti-inflammatoire et antibiotique sont administrés pendant trois à cinq jours (East L et al 1999)

Cette méthode permet d'opérer dans des conditions strictement stériles et donc d'éviter toute contamination de la lumière utérine lors du dépôt de l'embryon (Philippe-Olivier, 2001).

Une des raisons de l'utilisation de la methode chirurgicale est de donner à la receveuse et à l'embryon de grande chance de gestation. D'après Coulthard (1991), si l'embryon à été congelé puis décongelé ou de classe 2, 10% d'amélioration dans le taux de géstation sont produis lors de l'approche chirurgicale au niveau de flanc, avec comparaison avec la methode non chirurgicale.

Cependant, la méthode chirurgicale d'implantation des embryons étant lourde et contraignante, des travaux ont été menés à partir de 1975 afin de mettre au point une méthode d'implantation non chirurgicale; beaucoup plus pratique et moins coûteuse dans les programmes de sélection (Fieni et al 2008).

3.2. Méthode non chirurgicale ou cervicale :

Elle consiste à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus par voie vaginale (Renard *et al*, 1977. Philippe-Olivier, 2001. Ponsart, 2004.). Cette méthode, facile à mettre en œuvre et donc elle a été à l'origine du réel développement du TE (Ponsart et al, 2004).

L'état général de chaque femelle est évalué. Une palpation transrectale est systématiquement réalisée afin de vérifier la présence d'un corps jaune, d'évaluer sa qualité et de le latéraliser. Une injection épidurale de Lidocaïne est ensuite réalisée à raison de 10 ml pour une vache de 700 kg et de 5 ml pour une génisse de 400 kg. La dose est alors de 7 ml pour une vache et 5 ml pour une génisse. L'efficacité de l'injection de lidocaïne est évaluée par la relaxation de la queue de l'animal (Legrand 2003).

Quand celle-ci est relâchée et ne réagit plus aux stimulations, le transfert peut avoir lieu.

Le pistolet est introduit dans le vestibule en écartant les lèvres de la vulve, puis dans le vagin. Avec l'autre main, par palpation transrectale, le pistolet est guidé jusqu'au col. Il faut alors perforer la chemise sanitaire, franchir le col et déposer l'embryon dans la corne ipsilatérale au corps jaune, le plus loin possible. Le pistolet est ensuite retiré (Legrand 2003). Des infections par des germes non pathogènes ont notamment été décrites (Lagneaux , 1988). Les taux de gestation ont connu une augmentation spectaculaire dès les premières années d'utilisation (Ponsart 2004). Dès 1981, des taux de gestation de l'ordre de 50 % ont en effet été obtenus en ferme, seulement inférieurs de 10 % à ceux obtenus par transfert chirurgical (Heyman, 1982 ; Nibart, 1982).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Objectifs

L'objectif de notre travail consiste à étudier la réaction des vaches à différents traitements de superovulation.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel :

2.1.1. Lieux des expérimentations:

La 1ère expérimentation à été réalisée au niveau de la station expérimentale de la faculté agro vétérinaire de l'université Saad Dahleb de Blida.

La 2ème expérimentation a était réalisé au niveau du complexe de l'élevage bovin **LAHYANI et fils** au niveau de la commune de H'TATBA au lieu-dit TEKTEKA ; ce complexe s'est spécialisé, depuis plusieurs années, dans l'élevage de bovins laitier « Holstein » importé du Canada, actuellement, une diversification de la production est envisagée avec l'introduction de bovins « Charolais ».

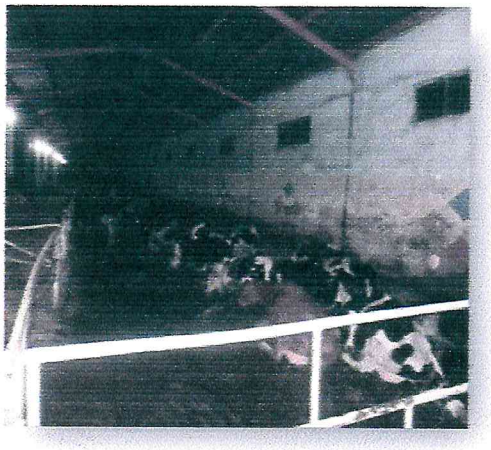


Photo1 : Complexe Lahyani et fils de HTATBA.

Photo2 : Station éxperimentale de la faculté vétérinaire de Blida

2.1.2. Animaux:

Le travail s'est déroulé au niveau de la station expérimentale de la faculté de Blida, a porté sur 02 de vaches pie noires de race holshtein âgées de 4 et 6 ans. Avec état d'embonpoint égal à 3.

Les vaches ont été choisies selon l'état corporel et après un examen général puis un examen spécial de l'appareil génital et qui n'a révélé aucune affection apparente du tractus génital. Les vaches avaient une cyclicité régulière.

Et concernant le travail qui avait lieu au niveau du complexe de l'élevage bovin **LAHYANI et fils** ; était réalisé sur trois génisses; la première génisse (PN 903) qui était en chaleur et qui a fait l'objet de notre travail. C'est une Holstein pie noire. Les génisses sont nées suite à un TE en utilisant des embryons sexés femelles.

2.1.3. Hormones et produits utilisés:

Extraits hypophysaires :

STIMUFOL ® (ULg FMV PhR, Sart-Tilman, Belgique) est un extrait hypophysaire comprenant deux fractions, de la follitropine et de la lutropine d'origine porcine sous forme lyophilisée à reconstituer avant l'emploi.

Un flacon de solvant composé de :

Chloride de sodium	**90mg**
Parahydroxybénzoates de méthyle	**10mg**
Parahydroxybénzoates de propyle	**2,5 mg**
Solution de reconstitution physiologique apyrogène	**10 ml**

Prostaglandine :

Le produit utilisé, lors de l'expérimentation, était le Cloprosténol (ESTRUMAT®*Schering-Plough*) qui est un analogue de synthèse de la prostaglandine F2 α (PG) qui a un effet luteolytique.

2.1.4. Matériel de récolte :

-Sonde avec mandrin métallique à deux voies (sonde de folley); une voie pour gonfler le ballonnet et l'autre pour l'injection et la récupération du liquide de lavage des cornes utérine. La sonde est stérilisée et désinfectée.

-Milieu de conservation PBS: c'est le tampon phosphate salin (phosphate buffered saline.)

-Milieu et matériel de congélation :

-Ethylène glycol.

-Milieu de conservation pour le lavage des embryons « olding medium **Bovi ProMinitube®**»

-Plaque chauffante pour maintenir les embryons dans une température de 37°C.

-Paillette de conservation des embryons.

-Seringue à insuline pour la manipulation des embryons.

-Congélateur réglable

-Gants pour le fouillé rectal.

-Papier hygiénique, eau tiède.

-Microscope pour la mise en évidence des embryons.

-Boites de pétrie quadrillées.

-Bouteille stérile d'un litre permettant de contenir le liquide de lavage.

-Anesthésie: Xylocaine à 2%.

-Seringue de 50ml qui sert à administrer et recupérer le liquide de lavage de la corne utérine.

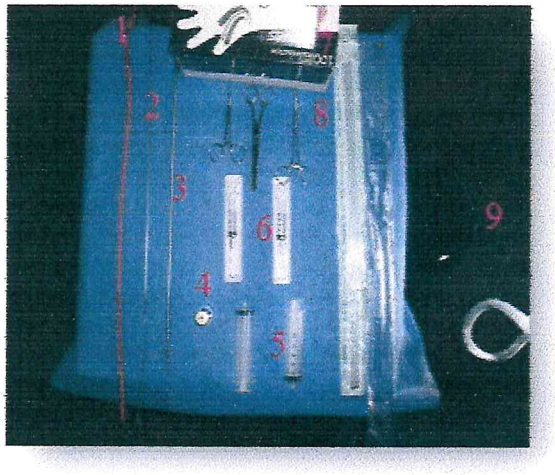
-Sonde dilatatrice

-Seringues de: 20ml et 10 ml 5 ml

-Alcool pour désinfecter et des compresses

- Pinces chirurgicux

-Bio-congélateur réglable



1 - Sonde FOLEY 2 – Mandrin

3-Dilatateur du cervix 4- Xylocaine® 2% 5- Seringue a 50cc 6 – Seringue de 10cc 7- Gants de fouillet rectale 8- pinces hémostatique et ciseau 9 – Seau c.

2.2. Méthode :

2.2.1. Détection de chaleurs:

Nous avons suivi le cycle de chaque vache pendant 3 chaleurs successives. Le contrôle de la cyclicité à été fait par un examen quotidien en examinant les vaches 30 minutes par jour dans une aire d'exercice. L'acceptation de chevauchement par des vaches congénères, l'écoulement muqueux abondant et la congestion vulvaire était considérée comme des signes majeurs de chaleurs. Des palpations transrectales ont été réalisées pour confirmer la présence d'un follicule dominant.

2.2.2. Superovulation, insémination des donneuses :

2.2.2.1. Protocol de superovulation :

Le traitement de superovulation (SOV) a été initie le 11éme jours après manifestation de chaleurs naturelle pour le premier protocole, et le 10 éme jour pour le deuxième protocole.

a. Protocole 1:

Avec le STIMUFOL ®pFSH 50 UA ; trois injections intramusculaires d'intervalle 24h ont été effectuées et pendant trois jours. Le produit est dilué dans une quantité de 9 ml de solvant ; dont 3 ml pour chaque injection. Afin de provoqué la lutéolyse et déclencher les

chaleurs pour une IA éventuelle; une injection de 2 ml de prostaglandine$F_{2}a$ (Cloprosténol) avait lieu après la dernière injection de pFSH.

b. **Protocole 2 :**

Le traitement a été réalisé par des injections intramusculaires de STIMUFOL ® (pFSH 50 UA) dilué dans 10ml de solvant. Protocol de 8 injections de pFSH50 dont 2 injections par jour espacée d'intervalle de 12 h ; administré par l'éleveur pendant 4 jours. Au troisième jour après début de traitement de superovulation; une double injection de la prostagladine $F_{2}a$ (Cloprosténol) avait lieu (voir figure14). Sachant que cette genisse PN 903 a été traitée et récoltée deux fois avec le même protocole; dont le protocole 2 pour le premier traitement et le protocole 3 pour le deuxième (voir tableau5).

Tableau 5: Schéma de traitements hormonaux des vaches.

	Jours		STIMUFOL ®		ESTRUMAT ®	
			Matin (10h15)	Soir (22h15)	Matin (10h30)	Soir (22h30)
Protocole 1	J11	22/03/2013	3ml			
	J12	23/03/2013	3ml			
	J13	24/03/2013	3ml		2 ml à 13h	
Protocole 2	J_{10}	15 avril 2013	6 mg (2 ml)	6 mg(2 ml)	--	--
	J_{11}	16/04/ 2013	5 mg(1,5 ml)	5 mg(1,5 ml)	--	--
	J_{12}	17 /04/ 2013	3 mg(1 ml)	3 mg(1 ml)	2 ml	2 ml
	J_{13}	18 /04/ 2013	2 mg(0,5ml)	2 mg(0,5ml)	--	--
Protocole 3	J_{10}	11/05/2013	FSH 2ml	FSH 2ml		
	J_{11}	12/05/2013	FSH 1,5 ml	FSH 1,5ml		
	J_{12}	13/05/2013	FSH 1 ml	FSH 1 ml	*2ml*	*2ml*
	J_{13}	14/05/2013	FSH 0,5 ml	FSH 0,5 ml		

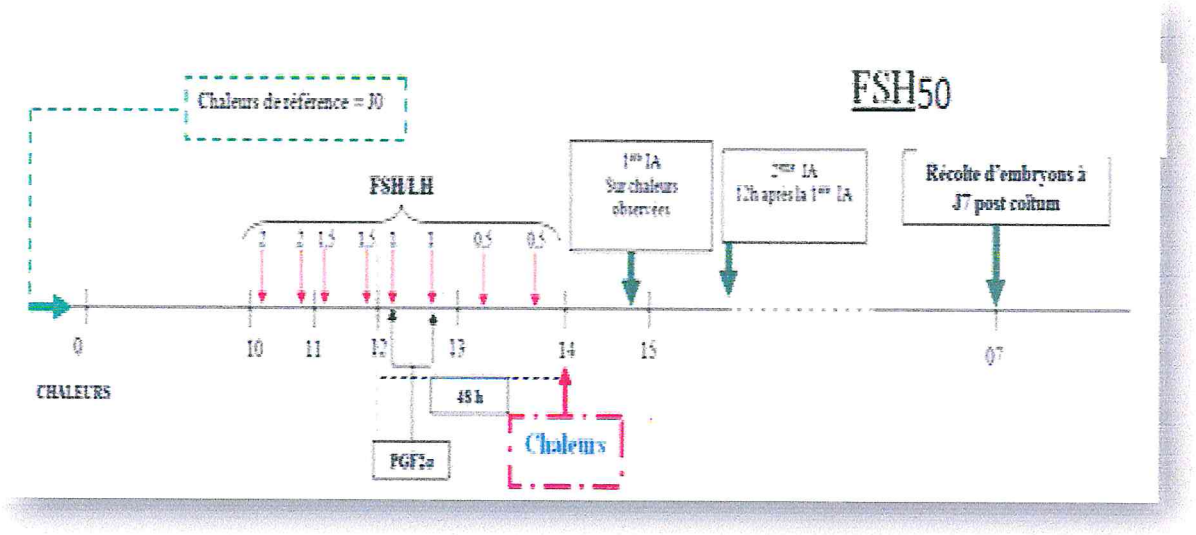


Figure 14: Schéma chronologique de l'expérimentation pour la PN 903.

Durant les jours de l'application du traitement de superovulation, les femelles traitées étaient mise à l'écart des autres vaches pour mieux les manipuler.

2.2.2.2. Apparition des chaleurs et insémination artificielle

Apres l'injection de la prostagladine F_2a (Cloprosténol) la génisse PN 903 a manifesté ses chaleurs. Une double IA avait lieu 12h après début des chaleurs dont l'intervalle entre les deux IA réalisé est de 12h.

La génisse était inséminée à l'aide d'une semence d'un taureau de race pie noire Holstein avec deux paillettes pour chaque insémination.

2.2.3 Récolte des embryons:

Durant la période du notre pratique, on a récolté la vache PN 903 deux fois. La première récolte a été effectuée au $7^{ème}$ jour après l'insémination artificielle. Cependant, la deuxième récolte avait lieu au $6^{ème}$ jour après insémination artificielle.

2.2.3.1. Technique de récolte:

La technique réalisée pour nos récoltes est la non chirurgicale (dite par voie cervicale). Une exploration rectale des ovaires est effectuée pour estimer le nombre d'embryons à récolter.

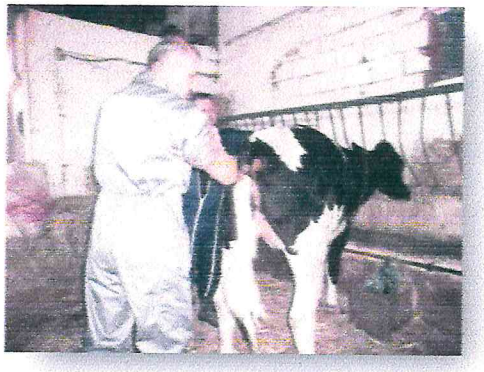


Figure3: Palpation transrectale en vue de l'appréciation du nombre de corps jaune.

-Rasage de la région périnéale puis la bien désinfecté avec de la bétadine.

-Par la suite une anesthésie épidurale basse est effectuée à raison de 5 ml de xylocaine à 2 % dans l'espace vertébral de la 1ere et la 2ème vertèbre coccygienne **(voir photo).**

Photo5: anesthésie épidurale basse

-délicatement, on introduit la sonde à 45° vers le haut pour éviter le méat urinaire, puis on pénètre le col (vu l'anatomie de l'appareil génital de la vache, la sonde va se diriger facilement vers la corne droite).

-A l'entrée de la corne, le mandrin est légèrement retiré de la sonde pour permettre d'avancer la sonde plus profondément (3 à 4 cm en avant de la bifurcation), guidé par la main présente dans le rectum. Après la fixation de la sonde par gonflement du ballonnet (10à 15 ml d'air) le mandrin est totalement retiré.

Photo4: introduction de la sonde de Folley

-On effectue un rinçage de la corne utérine droite dans le but de récupérer les embryons qui s'y trouvent. Cela est fait en injectant et récupérant à travers la sonde une solution PBS avec des volumes croissantes (2x20ml; 2x30ml; 2x40ml; 50ml et en fin 50 ml dont 20ml air et 30ml PBS) avec des massages de la corne. Le liquide est ensuite aspiré après chaque injection puis versé dans un flacon stérile en verre.

-Une fois l'opération terminée au niveau de la corne droite, le mandrin est remit, le ballonnet dégonflé, la sonde légèrement retiré et placée à l'entrée de la corne gauche.

-L'opération est répétée de la même manière qu'avec la corne droite.

Une fois le rinçage des deux cornes terminé, on dégonfle le ballonnet, on retire la sonde on injecte un antibiotique et 5ml de PGF2a en IM.

2.2.3.2. Recherche et classification des embryons :

Les flacons en verre contenant le liquide de rinçage des cornes utérines sont laissés à décompter pendant 10 à 15 minutes sur une plaque chauffante à 37°C, après quoi, le liquide est siphonné de sorte à ne laisser que 100 ml à peu prés du contenu du flacon (photo).

Photo6 : flacons en verre cotennant le liquide de rinçage des deux cornes uterines .

Le décantât est ensuite versé dans des boites de Pétri quadrillées et mises sous une loupe binoculaire Nikon ® (figure), la recherche des embryons peut alors commencer.

L'opérateur peut procéder de la manière qui lui convient le mieux, il faut juste, qu'à la fin de la recherche, tous les carrées soient passés.

Photo7 : Recherche des embryons dans le liquide de rinçage des cornes.

Dans notre travail et afin de pouvoir apprécier et de classer les embryons trouvés , nous nous sommes référés, aux critères morphologiques de qualité et de viabilité dictés par **l'INRA- UNCEIA 1990**

Une fois l'embryon repéré, il est déposé dans une cupule contenant du Holding Medium BoviPro® pendant quelques minutes. L'embryon a subit deux lavages dont la durée du chaque lavage est environ 5 min. A chaque fois qu'on vue changer le milieu on remet l'embryons sous microscope pour qu'on puisse le remonté dans la paillette. Pendant toute la durée de la manipulation l'embryon doit être maintenu dans une température de 37°C.

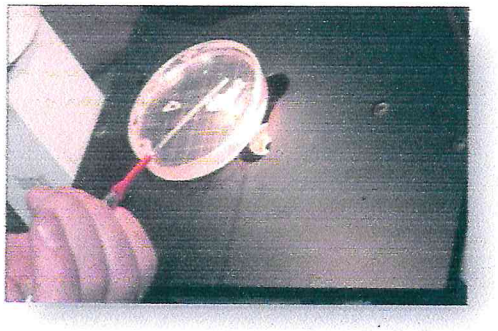


Photo8: Aspiration de l'embryon avec seringue à insuline.

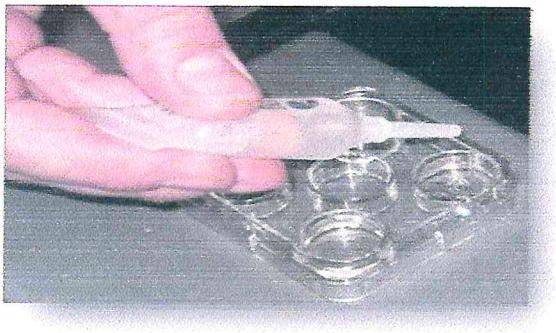


photo9: HoldingmediumBoviProMinitube®

2.2.3.3. Mise en paillette et cryoconservation :

Dans ce travail, on a considéré l'embryon obtenu de la classe II comme transférable et congelable.

A l'aide d'une seringue d'insuline montée sur paillette on aspire l'embryon : une petite quantité de holding medium, du l'air ; en suite l'embryons dans son milieu de congélation, puis du l'air ; et enfin une autre fois le milieu de conservation et on ferme la paillette avec une **colle polyvinyle.**

Pour la congélation on a utilisé la méthode de la congélation lente :

Il faut remplir le biocongelateur avec l'azote liquide, et régler à -7°C jusqu'à stabilisation. Apres, on dépose les paillette dans le biocongélateur pendant 5 min à -7°C.

Pour la cristallisation; on prend la pince métallique prévue à cet effet et plangé dans l'azote, on touchant les deux extrémités de la paillette (sans toucher l'embryon) ; puis on laisse se stabiliser pendant dix min -7°C. En suite, déclencher la congélation lente « **seeding** » et on laisse la température baisser jusqu'à -35°C.

Une fois la température escomptée atteinte (-35°C) ; on plange la paillette dans l'azote liquide.

3. Résultats

3.1. Résultat de suivie de la cyclicité:

Les animaux du notre expérimentation ont montrés une cyclicité régulière (voir tableau) Des palpations transrectales ont été réalisé pour confirmer la présence d'un corps jaune cyclique (chaque 11 jours). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 6: résultat de suivie de la cyclicité des vaches.

Vaches	1ère chaleur	2ème chaleur	3ème chaleur
PN 07004	09/01/2013	30/01/2013	07/03/2013
PN 09003	29/12/2012	20/01/2013	11/02/2013
PN 903.	25/02/2013	15/03/2013	05/04/2013

La cyclicité été confirmée par des examens transrectales toute en appréciant la population ovarienne présente. Une alternance follicule – corps jaune est met en évidence chaque 11 jours.

L'acceptation du chevauchement par des vaches congénères, l'écoulement muqueux abondant et la congestion vulvaire était considérée comme des signes majeurs de chaleurs. La durée du cycle de toutes les femelles est de 21 jours durant au moins 3 chaleurs successives.

La vache PN 07004 a présenté un dérèglement de cycle et l'examen du son tractus génital à révélé une métrite et pour cette raison elle a était met sous un traitement et écarté de l'expérimentation.

3.2. Chaleurs de superovulation par rapport à l'injection de prostaglandine :

Pour la PN 09003, aucun signe de chaleur n'a apparu malgré le respecté du protocole et les doses du traitement et même les moments des injections.

Cependant, chez la génisse PN 903 et dans les deux protocoles; l'intervalle entre l'injection de $PGF_2 a$ et le début des chaleurs est d'environ de 48h.

3. 3. Réaction ovarienne :

La réponse ovarienne au traitement de superovulation est estimée par un fouillet rectal juste avant la récolte. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 7: résultat de la réaction ovarienne.

	OD	OG	Total	Moyenne
P N 09003protocol1	8	9	17	8.5
PN903 (protocole 2)	11	10	21	10.5
PN903 (protocole3)	2	2	4	2

Soit une moyenne de **14 CJ** pour chaque vache.

3.4. Nombre et qualité des embryons

La vache 09003 n'a pas présentée des signe de chaleurs et elle n'a pas été inséminée et donc elle n'a pas été récoltée.

Dans notre travail et sur les deux récoltes effectuées sur la même génisse PN 903; On a pu mettre en évidence un seul embryon du stade morula de classe I (photo).

Pour la PN 903 et dans le protocole 2 et malgré la bonne réponse ovarienne au traitement de SOV (OG 10;OD 11) et malgré que la récolte fût effectuée dans des bonnes conditions; aucun embryon n'est récolté.

Lors de la deuxième récolte qui est effectuée sur la même femelle 903 et avec les mêmes conditions de récolte, mais avec des doses différentes de FSH et avec une semence différente. La réponse à la SOV était faible (2 CJ OG, 2 CJ OD) on a pu récolter qu'un seul embryon du stade morula de classe II. Pour la classification de l'embryon nous nous sommes référés, aux critères morphologiques de qualité et de viabilité dictés par **l'INRA-UNCEIA1990.**

photo10 : Embryon de stade morula classe II.

4. Discussion :

***L'intervalle PG-début des chaleurs :**

La FSH qui est une gonadotrophine majeure utilisée en superovulation bovine, est usuellement utilisable en multiple injections biquotidiennes (8 à 10 fois) pendant 4 à 5 jours , (Looney et al 1981 et Ushinohama et al 1998). La réduction du nombre d'injection de la pFSH pour la superovulation sans diminution du rendement peut etre moin stressant pour les animaux donneurs ; elle fait réduire la main d'œuvre requise pour la production des embryons. Plusieurs études ont visé à la réduction du nombre requis des injections de la FSHp était procédés ; inclus l'étude qui utilisait une seule injection de la pFSH dissoute dans le PVP (polyvinilpyrolidone) ou celle qui utilisait une seule injection journalière de la pFSH établie pendant trois à cinq jours (Looney et al 1981 Kelly et al 1997, Yamamoto et al 1995, Sugano et Shinogi, 1999, Martens et al 2005, Yamamoto et al 1992). Toute fois, l'application pratique des études était limitée.

Dans notre expérimentation et pour la vache PN 09003 et qui a subi le protocol de superovulation à trois injections de pFSH 50 UA; n'a pas manifesté des signes de chaleurs après l'injection du prostaglandine *F2a*, celà peut etre due probablement au conditions d'elevage et à une alimentation déséquilibrée. En effet (Santos et *al*, 2008) ont montré aussi l'effet d'environnement dans les élevages et l'alimentation comme un effet défavorable sur la réponse des donneuses . En général la répitition des traitements se traduit par une diminution de la production d'embryons , l'augmentation du rang de collecte à pour effet une baisse significative du nombre d'embryons transférables et une augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés et du nombre d'embryons dégénéres (Nibart et Humblot, 1997).

Tout retard au début des manifestations œstrales est synonyme de retard de maturation ovocytaire et plus précisément, de maturation nucléaire (Briante ; 2007).

Lors d'une manifestation tardive ou de manières très variables des chaleurs, et après la réalisation des IA à des heures fixes lors de cycles maîtrisés des vaches ; des anomalies de fécondation peuvent être observées justifiant la qualité inférieure des embryons récoltés (Briante ; 2007).

Concernant le protocole avec des injections bijournalière a doses décroissante ; l'intervalle PG-début des chaleurs était de 48h, ce qui est un résultat supérieur de ceux obtenus dans plusieurs travaux ; (Idres, 2011) a obtenu dans ses recherches un intervalle de

37,27 h pour la totalité de l'effectif utilisé, avec une moyenne de 39,00 h pour le groupe FSH-32 et 35,79 h pour le groupe FSH-40 ; Ferrouk et al. (2008) ont obtenu un intervalle de 39,5h ± 3,26h. Un intervalle moyen PG-début des chaleurs de 42h dans un troupeau de vaches de race Montbéliarde a été rapporté dans une étude antérieure (Laizeau, 2009). Cet intervalle est caractérisé par une variabilité considérée comme l'un des facteurs limitant la production qualitative des embryons (Laizeau, 2009).

*La réponse ovarienne :

La courte demi vie de la FSH necessite des traitements biquotidiens, qui sont strissants et source d'erreurs . Des protocoles recents du traitement ont permis la superovulation avec une seule injection ou deux injections de la FSHp 48heures d'intervalle (Reuben et al ; 2011).

Durat le 2ème et le 3ème protocol une moyenne de 14 CJ par vache . ce résultat est superieur a celui obtenue par (Son et al ; 2007) et qui était de 10.0 CJ et en utilisant une dose total de 24 mg FSHp donné en six doses décroissantes pendant trois jours. Lubbadech et al 1980) a obtenu par 17.9 CJ ; en utilisant une dose total de 50 mg de pFSH donnée en dose décroissante et en quatre injections journalière en sous cutanée.

Pour Ferrouk et al,. (2008), le nombre de CJ palpé a était de 7,5 ± 3,26 largement inférieur à notre ce qui prouve la diversité a la réponse au traitement de superovulation qui peut être différente d'une race à une autre, d'un animal à un autre et même d'une collecte à une autre. En Afrique, des moyennes de 6,50 CJ et de 14,40 CJ ont été rapportées, respectivement, chez la race Baoulé au Soudan (Chicoteau, 1989) et la race Ndama en Gambie (Jordt *et al,* 1992) traitées avec une dose de 40 mg de pFSH. Une moyenne de corps jaunes était de 6,90 CJ chez la race Baoulé au Burkina-Faso traitée avec 32mg de pFSH (Bianchi *et al,* 1986).

Afin d'expliquer la faiblesse de leurs résultats, les auteurs précédemment cités (Bianchi *et al* , en 1989. Chicoteau, 1986) avancent les hypothèses suivants : des extraits de FSH inappropriées aux races locales étudiées (lots d'extraits hypophysaires, dont le rapport LH/FSH est souvent variable ou des doses insuffisantes pour des réponses optimales), des excès de poids et des BCS importants au moment de l'instauration des traitements et enfin, des conditions d'élevage souvent incontrôlables et difficiles à standardiser surtout en milieux villageois.

* La récolte des embryon :

Deux problèmes majeurs sont identifiés dés le début de l'utilisation de la technique de TE: le nombre moyen d'embryons récolté par vache traitée reste faible, ce qui a par conséquence un cout de production élevé, et la fréquence des animaux qui ne produisent aucun ET est trop élevé pour que la technique soit utilisée au mieux dans les programmes d'amélioration génétique(Saumande1995).

Lors de la première récolte et malgré la très bonne réponse au traitement de superovulation constatée après dénombrement des corps jaune présents sur les ovaires (21 CJ) ; aucune structure (embryon, ovocyte et zone pellucide vide) n'a été repéré. Pour essayer d'expliqué le résultat négatif, plusieurs hypothèses ont été émises:

1- ovulation prématurée (ovulation précoce) : durant la superovulation, certains follicules ovulent alors que d'autres n'ont pas encore achevés leur croissance. La maturation des follicules des vaches surovulées ne se fait pas en même temps (Briante Et al 2007). La SOV induit une relâche précoce de la LH qui ne permet pas aux follicules d'acquérir une maturation adéquate (De Loos et *al*, 1991b). Ce phénomène résulte de la perte des activités mitotiques et de l'expansion de la membrane de la granulosa des follicules 24 à 26 heures après le pic de LH (De Loos et *al*, 1991b). L'asynchronie de l'ovulation des follicules résulte de l'action de la LH contenu dans les gonadotrophines utilisées et la production de P4 vers la fin de la superovulation (Callesen et *al*.,1988).

La LH des gonadotrophines induit l'ovulation des follicules larges, et donc la production une source de production de P4 aura lieu dans les étapes ultérieurs du traitement de superovulation, en particulier au moment de l'IA (Callesen et *al*., 1988). La présence d'un taux élevé de progestérone (> 1rig/ml), (Kafi, Mcgowan ,1997) durant la période pré-ovulatoire, peut entraîner l'échec de l'expression de œstrus et / ou l'échec d'un pic de LH. La relâche de la LH perturbe l'activité mitotique des follicules qui retarde l'ovulation (Foote et Ellington, 1988).

Callesen *et al,* (1986) a rapporté que L'incidence de l'ovulation prématurée chez les bovins superovulées était approximativement à 13%, et que le traitement pFSH induit moins d'ovulations prématurés (9%) que le traitement avec eCG (14%), et l'incidence d'ovulations prématurés était plus élevé chez les génisses (21%) que chez les vaches (3%).

Il semble même que le faible nombre d'ET récolté résulte de la perturbation du transport des spermatozoïdes dans l'oviducte (Kafi et McGowan, 1997).

2-Luteinisation des follicules: Au stade préovulatoire, certains follicules se transforment progressivement et partiellement en structures comparables à un corps jaune, sans que l'ovulation ne soit détectable à l'échographie (Briant; 2007). En fait, contrairement à une ovulation normale où le follicule se rompt, celui-ci se remplit progressivement de cellules qui sécrètent de la progestérone. Ces follicules surviennent dans 4 à 8 % des cycles non stimulés (Ginther et Pierson1989, Mc Cue et Squires 2002, Briant2004).

3. Anovulation des follicules : Dans la première récolte aucune structure n'a était mis en évidence (embryon, ovocyte ou bien une zone pellucide vide) ; cela peut être due selon (Nibart *et al* 1988, Humblot *et al* 1994) a une anovulation des follicules qui est consécutive à l'absence de pic de LH. Cela pourait être du à une erreur d'injection de la prostaglandine au troisième jour du traitement de superovulation. Cependant, d'autres causes sont probables car certains follicules n'ovulent pas, même après administration de LH ou d'une molécule à effet équivalent (Liu et Sirois 1998). Contrairement aux follicules «normaux» qui montrent une diminution de la sécrétion d'oestradiol et une augmentation de la progestérone 15 à 17 h après le pic de LH, les follicules anovulatoires contiennent encore de l'oestradiol 30 h après ce pic (Callesen *et al* 1986). Ce défaut d'ovulation a été associé à une absence d'expression de la prostaglandine G/H synthase 2 (PGHS2), enzyme clé dans la synthèse des prostaglandines, induite dans les cellules de granulosa par le pic préovulatoire de LH endogène. Celle-ci serait consécutive à une désensibilisation du follicule à la LH, du fait d'un apport trop précoce de cette hormone (Liu et Sirois 1998).

Certains follicules atteignent la taille préovulatoire, mais n'ovulent ni spontanément, ni en réponse à l'administration de LH exogène. Ils régressent progressivement et disparaissent en général au cycle suivant (Briant; 2007).

4. Obstruction bilatérale du salpinx : Une salpingite due à une inflammation des trompes de Fallope qui aboutit à une obstruction bilatérale du salpinx d'où un blocage du passage des ovocytes et la continuité de son acheminement ; peut être l'origine du résultat négative lors première récolte. La descente des ovocytes après l'ovulation des follicules n'aura pas lieu.

Conclusion :

La courte demi vie de la FSH necessite des traitements biquotidiens, qui sont stréssants et source d'erreurs . Des protocoles recents du traitement ont permis la superovulation avec une seule injection ou deux injections de la pFSH 48heures d'intervalle. Ce travail a permis de démontré que malgré la diminution du nombre d'injections ; la réponse ovarienne reste satisfaisante avec un nombre de corps jaune de 17.

Dans notre expérimentation plusieurs facteurs ont influencé négativement sur la réponse des vaches au traitement de superovulation, comme l'alimentation et l'environnement et la fréquence élevé des kystes ovariens.

Recommandations

-Bien choisir les donneuses (bonne santé, bonne performance laitière ou viandeuses, âge optimale).

-Répéter les traitements de superovulation plusieurs fois, en essayant à chaque fois d'éliminer les facteurs limitant tel que : l'alimentation et les facteurs d'environnement.

-Refaire l'expérience sur des cheptels importants en qualité et en quantité.

-Informer les éleveurs sur les diverses biotechnologies de l'embryon nécessitant la superovulation afin de partager l'expérience et de crier des lieux de pratique.

Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H., 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol. Reprod. Dev., 61, 57-66.

Abd E.l., Razek I.M., Charpigny G., Kodja S., Marquent le Guienne B., Mermillod P., Guyader-Joly C., Humblot P., 2000. Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology, 53, 346.

Adams, G.P., Kot, K., Smith, C.A., Ginther, O.J. 1993. Selection of a dominant follicle andsuppression of follicular growth in heifers. Anim. Reprod. Sci. 30 : 259-271.

Adams, G.P. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation, Theriogenology 41 : 19-24.

Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. 2008. Progress in understanding ovarianfollicular dynamics in cattle. Theriogenology 69: 72-80.

Adel D (2004), *étude comparative de deux extraits hypophysaires dans la production d'embryons chez les bovins,* (Thèse magister). Université SâadDahleb. Blida (Algérie). 104p

Akagi, S., Kaneko H., Nakanishi Y., Takedomi T., Watanabe G., Taya K., 1997, Ovarianresponse and FSH profile in cows following injection of various doses of inhibin antiserum. J Vet Med Sci, **59**: 1129-1135

Alkemade S.J., Murphy B.D., Mapletoft R.J., Superovulation in the cow: Effects of biological activity of gonadotropins, Proc 12th Ann. Conv. AETA, Portland, Maine, 1993.

Amara M.R., 2003,etude des réponses du traitement de superovulation chez la vache en vue du transfert embryonnaire, (Thèse magister). Université Sâad Dahleb. Blida (Algérie). 163p.

Anonyme. 1972. Committee on bovine reproductive nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. 62, 216-237.

Armstrong, D.T, 1993. Recent advances in superovulation of cattle. 1993. Theriogenology 39 : 7-24.

Armstrong, D.G., Gong, J.G., Gardner, J.O., Baxter, G., Hogg, C.O., Webb, R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short term changes in dietary intake. J. Reprod. Fertil. 123 : 371–378.

Austin Ej, Mihm M, Evans Aco, Knight Pg, Ireland Jlh, Ireland Jj, Roche Jf – 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of the follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle - Biol Reprod, 2001 ; 64 : 839-848

Baril G ., Cognie Y., Pougnard J.L., Leboeuf B., Traldi A.L., Guignot F., Beckers J.F., Mermillod P., 2001a. Amélioration des méthodes de cryoconservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. Renc. Rech. Rum., 8, 365-368.

Baril G., Traldi A.L., Cognie Y., Leboeuf B., Beckers J.F., Mermillod P., 2001b. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. Theriogenology, 56, 299-305.

Baruselli, P. S., de SaFilho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M. et al. 2006. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. Theriogenology 65 : 77-88.

Bergfelt, D.R., Lightfoot, K.C., Adams, G.P., 1994. Ovarian synchronization followingultrasound-guided transvaginal follicle ablation n in heifers. Theriogenology 42 : 895-907.

Bernard, C., Valet, J.P., Beland, R., Lambert, R.D., 1984. Prediction de l'ovulation chez le bovin par dosage rapide de la LH plasmatique et observation de l'ovulation par laparoscopie. Can. J. Comp. Med. 48, 97-101.

Bergfelt D.R., Ginther O.J. 1992: Relationships between circulating concentrations of FSH and follicular waves during early pregnancy in mares. *Equine Vet. Sci*., 1992, **12**, 274-279.

Berthelot F., Martinat-Botté F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M., 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. Cryobiology, 41, 116-124.

Bertrand M., Chatre J.L. 1976. Physiopathologie lutéale chez la vache Rev. Méd. Vét., **127**, 541-574 .

Betteridge, K.J., Sugden, E.A., Eaglesome, M.D., Randall, G.C.B., Mitchell. D., 1982. Plasma progesterone levels in superovulated cattle in relation to hatched embryo sizes, ovulation rates and premature regression of corpora lutea. Anim. Reprod. Sci. 4, 207-212.

Bianchi M., Chicoteau P. Cloe C., Bassinga A.1986: "Premiers essais de transfert d'embryons sur bovins de race Baoulé au Burkina-Faso" Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1986, 39* (1): 139 144.

Blair, V. D., and F. B. Flanders. 2003. Embryo Transfer in Cattle . Georgia Agricultural Education Curriculum Office Georgia Department of Education

Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R.A., Mapletofl, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. Anim. Reprod. Sci. 39 : 193-204.

Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R. et al. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology 57 (1) : 53-72.

Bondurant, R.H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. J. Anim. Sci. 77 (2) : 101-110.

Bourgoin G., Quinton H., Rohou A. *et al.* 2004. Reprod., Fert. and Dev.,16, 207.

Booth, W.D., Newcomb, R., Strange, H., Rowson, L.E.A., 1975. Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. Vet. Rec. 97, 366-369.

Briant C., 2004. Stimulation ovarienne chez la ponette Welsh en vue de la production d'embryons. Limites physiologiques et techniques. Thèse de Doctorat, Université de Tours, sciences de la vie, 281p.

Briante C,. Guikkaumed D ., Toutain P- L ., Blanc M R ., 2007: superovulation chez la jument avec les hormones gonadotropes : le point sur la situation et nouvelles données. INRA Prod. Anim .20(4), 275-294.

BRAND, A., Trounson, A.O., Aarts, M.H., Drost, M., Zaayer, D.. 1978. Superovulation and non-surgical embryorecovery in the lactating dairy cow. Anim. Prod. 26, 55-60.

Bruyas J.F. (1991). Cycle oestral et détection des chaleurs Dépêche vét.,supplément **19**, 9-14

Bungartz, L., Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. J. Reprod. Fertil. 101 : 583-591.

Byskov Ag. 1979. Regulation of meïosis in mammals. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 1979, 19,1251- 1261

Cahill L.P. 1981. Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. J.Reprod.Fert.,1981,30 Suppl., 135-142.

Callaghan, B.D., King, G.J. 1980. Determination of the fertilization rate of A.I. sires. Theriogenology 14 : 403-410.

Callesen H., Greve T., Hyttel P., 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. Theriogenology, 25, 71-86.

Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P. 1988. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. Theriogenology 30 (3) : 477-488.

Chicoteau, P (1989). Adaptation physiologique de la fonction sexuelle des bovins Baoulé en milieu tropical soudanien. Thèse de doctorat,université de pariscréteil.

Chupin D., (1988), *Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire*. Colloque Société Française d'Etude de la fertilité. Masson édition Paris 26, 213-232.

Crosier A.E., Farin P.W., Dykstra M.J., Alexander J.E., Farin C.E., 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. Biol. Reprod., 64, 1375-1385.

Coulthard, H 1991. On farm embryo transfers in cattle. in practice 13. 16-22. In Gordon 1. 1996. Reproduction in cattle and buffaloes. Vol. 1, Cab International, UK.

Curtis J.L., (1991), Cattle Embryo Transfer Procedure: An Instructional Manual For The Rancher, Dairyman, Artificial Insemination Technician, Animal Scientist And Veterinarians. Academic Press, INC: San Diego, California, 128p

De Loos, F.A.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Kruip, Th.A.M. 1991a. Morphology ofpreovulatory bovine follicules as related to oocyte maturation. Theriogenology 35 : 527-536.

Derivaux J, Ectors F -1986. Reproduction chez les animaux domestiques - 3ème édition revue. Louvain-La-Neuve : Cabay, 1986, 1141 p.

Dieleman S.J., Bevers M.M., Vos P.L.A.M., de Loos F.A.M., 1993. PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment, Theriogenology 39 (1993) 25–42.

Diskin M.G., Sreenan J.M. (2000). Expression and detection of oestrus in cattle Reprod. Nutr. Dev., **40**, 481-491.

Dominique S 1993. La reproduction des animaux d'élevage .Tome I. Collection science et techniques agricoles 49130 SAINTE gemmes Sur Loire, page 91 et 93.

Dominko, T., Firsti, N.L. 1997. Relation ship between the maturational state of oocytes atthe time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. Theriogenology47 : 1041-1050.

Driancourt Ma, Gougeon A, Royere Det Coll. La Fonction Ovarienne 1991. Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C, Levasseur MC. Eds Ellipses INRA,1991, 273-298.

Drion P V, Bchers J F, Ectors F J , Hanzen C, Hontain J, Ylonergan P ; (1996). Régulation de la croissance folliculaire et luteale : 1. Folliculogenese et atresie , le point vétérinaire, 28 : 37- 47.

Drion P.V, Beckers J.F, Derkenne F, Hanzen Ch. Le développement folliculaire chez la vache. 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du postpartum Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire 2000, 144, 385-404.

East L.M., Van Saun R.J., Vanderwall D..K. 1992: Equine embryo transfer. Embryo recovery and transfer techniques. *Equine Practice*, 1999, **21**, 8-12.

Edwards, L.M., Rahe, C.H., Griffin, J.L., Wolfe, D.F., Marple, D.N., Cummins, K.A. et al. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. Theriogenology 28 : 291-299.

Elsden *RP, Nelson LD, Seidel G E Jr.* 1978.superovulatory cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology; 9: 17-26.

Ennuyer M - Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction - Point Vet, 2000 ; 31 (209) : 377-383.

Erickson B.H.1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. J.Reprod.Fert.,1966a, 10, 97-105.

Erickson B.H.1966. Developmental and senescence of the postnatal bovine ovary. J.Anim.Sci.,1966b, 25, 800-805.

Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P., 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation : effect of method of blastocyst production. Mol. Reprod. Dev., 58, 186-195.

Fair 2003, Follicular oocyte growth and acquisition of developemental competence. Anim . Reprod . Sci ., 78:203-216.

Ferguson E.M., Leese H.J., 1999. Triglycerides content of bovine oocytes and oocytes and early embryos. J. Reprod. Fertil., 116, 373-378.

Ferrouk Mustapha, Gharbi Ismail, Adel Djalla , Lafri Mohamed, Touati Kamel, KaidiRachid and Djamel Guetarni 2008. Production and transfer of embryos in Algerian"Cheurfa" bovine breedAfrican Journal of Agricultural Research Vol. 3 (4), pp. 320-323, April, 2008

Feugang J.M., de Roover R., Moens A., Leonard S., Dessy F., Donnay I., 2004. Addition of ß-mercapoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology, 61, 71-90.

Fieni F., Ali Al Ahmad M. Z. . Lamara A., Bouzar B.A. , Baril G., Bouvier F., Chatagnon G. . Leboeuf B, Pepin M., Guibert J.M. , Russo P., Manfredi E., Martin J. , Chebloune Y.2008. Le transfert embryonnaire chez la chèvre : un outil de gestion du risque de transmission du virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV) Renc. Rech. Ruminants, 2008, 15.

Foote R.H. & Onuma H. (1970). — Superovulation, ovum collection, culture and transfer: a review. *J. Dairy Sci.,* **53,** 1681-1692.

Foote, R.H., Ellington, J.E. 1988. Is a superovulated oocyte normal?. Theriogenology 29 (1) : 111 – 123.

Garcia, A., Salaheddine, M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginalfollicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. Theriogenology 50 : 575-585.

Gilad, E., Meidan, R., Berman, A., Graber, Y., Wolfemson, D.1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. J. Reprod. Fertil. 99 : 315-321.

Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P.1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. Biol. Reprod.,1989c, 41, 247-254.

Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. J. Reprod. Fertil. 87 : 223-230.

Ginther O.J.,Pierson R.A., 1989. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. J. Equine Vet. Sci., 9, 4-12.

Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A., Kot, K. 2001. Follicle selection in cattle : role of luteinizing hormone. Biol. Reprod. 64 : 197-205.

Grasso. F., Guilbalt, L.A., Roy, G.L., Lussier, J.G. 1989. Ultrasonographic determinationof ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at thebeginning of the oestrous cycle. Theriogenology 31 : 1209-1220.

Gong, J.G., Armstrong, D.G., Baxter, G., Hogg, C.O., Garnsworthy, P.C., Webb, R. 2002. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. Theriogenology 57 : 1591–602.

Gonzalez A., Wang H., Carruthers T.D., MurphyB.D., Mapletoft R.J.,1994. Increased ovulation ratesin PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody, Theriogenology33 (1994) 519–529.

Gordon , 1996. Reproduction in cattle and buffaloes. Vol. 1, Cab International. UK.

Graham, J.D., Clarke, C.L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocr. Rev. 18 : 502–519.

Gl. Groza I Gi. Groza, M. Cenariu, A. Bartos, L. Bogdan, Simona Ciupe, I. Morar, R. Pop.2009. application of several cropreservation methods and morphological evaluation of bovine embryos after thawing. lucrări stiinłifice medicină veterinară vol. xlii (2), 2009, timisoara.

Guignot, F. (2003). Le point sur la cryoconservation des embryons. *dans Biotechnologies de la Reproduction : quoi de neuf, Association pour l'Etude de la Reproduction Animale, Maison-Alfort, France*. 77-88.

Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G., Rouillier, P., Matton, P. 1991. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. J. Reprod. Fertil. 91 : 81-89.

Guillomot M. 2001. L'implantation du blastocyste. In La Reproduction chez les mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MCLevasseur. Paris, France: Inra-Editions-Ellipses pp.457-478.

Hansel, W., Convey E.M. 1983. Physiology of the estrous cycle. J. Anim. Sci. 57 : 404-424.

Hanzen Ch. , Lourtie O. , Drion P.V.2000. Le développement folliculaire chez la vache.Aspects morphologiques et cinétiques Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, 144, 223-235.

Hanzen C ; 2000 , Propédeutique et pathologie de la reproduction male et femelle . 2éme doctorat en médecine vétérinnaire.

Hansen, P.J., Soto, P., Natzke, R.P. 2004. Mastitis and fertility in cattle—possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. Am. J. Reprod. Immunol. 51:294–301.

Hanzen C., 2010. La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine.

W.C.D. Hare., 1984. Progrès techniques en matière de transfert d'embryons et implications pathologiques Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1984, 3 (2), 291-310.

Hasler JF ., McCauley A. D., Chermenthorm EDC.. Foote R.H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. Theriogenology 19: 83- 99.

Hasler, J.F., 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. J. DairySci. 75, 2857-2879.

Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.O., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology, 43, 141-152.

Hasler J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology, 56, 1401-1415.

Hasler J.F., Bilby C.R., Collier R.J., Denham S.C., Lucy M.C., 2003. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. Theriogenology, 59 (9), 1919-1928.

Herath, S., et al., 2007, Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. Reproduction, **134**(5): 683-93.

Herrler, A., Elsaesser, F., Niemann, H. 1990. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. Theriogenology 33; 2 : 415-422.

Heyman Y., 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 105- 111.

Hochi S., Fujimoto T., Oguri N., 1995. Large equine blastocystes are damaged by vitrification procedures. Reprod. Fertil. Dev., 7, 113-117.

Hoshi H., 2003. *In vitro* bovine embryos and their application in embryo transfer. Theriogenology, 59, 675-685.

Hughes F.M., Gorospe W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. Endocrinology, 1991;129, 2415-2422.

Huhtinen, M., Rainio, V., Alato, J., Bredbacka, P., Maki-Tanila, A. 1992. Increased ovarianresponses in the absence of a dominant follicle superovulated cows. Theriogenology 37 : 457-463.

Hull, K.L. and S. Harvey, 2001, Growth hormone: roles in female reproduction.J Endocrinol, **68**(1): 1-23. *its occurrence and clinical relevance in dairy cattle.* Theriogenology, **63**(1): 118-25.

Humblot P., Rodrigues J.L., Nibart M., Silvestrini Tiezzi F.L., Jeanguyot N., Thibier M., 1994. Effet du mode de synchronisation des cycles sexuels sur la réponse hypophysaire et la fonction ovarienne après superovulation chez la vache. Elev. Ins., 261, 7-18.

Hunter, M. G., R. S. Robinson, G. E. Mann and R. Webb, 2004, Endocrine and paracrinecontrol of follicular development and ovulation rate in farm species. Anim Reprod Sci, **82-83**: 461-77.

Huyart C 2004. Relation entre les qualité des gametes femelles et la fertilité chez la vache laitière . thèse de Doctorat Vétérinaire (Nantes).N620046 152. 150 pages.
***IDRES T** (2011) Superovulation en vue du transfert embryonnaire chez la race locaL Brune de l'Atlas- : Comparaison entre deux doses de FSH, 32mg et 40mg

Ireland J.J., Roche J.F.1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormone, steroids in follicular fluid and gonadotrophin receptors. Endocrinology, 1982, 111:2077.

Kafi, M., McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. Anim. Reprod. Sci. 48 : 137-157

Karsch, F.J., Battaglia, D.F., Breen, K.M., Debus, N., Harris, T.G. 2002. Mechanism for ovarian cycle disruption by immune inflammatory stress. Stress 5 : 101-112.

Kask K., Odensvik K., Kindahl H.1997 : Prostaglandin F2α release associated with an embryo transfer procedure in the mare. *Equine Vet. J.*, 1997, **29**, 286-289.
Keenedy LG Baland MP and Gordon 1. 198 . The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. Theriogenologiy 19. 823- 832.

Keller, D.S., Teepker, G. 1990. The effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. J. Dairy Sci. 73: 549-554.

Kelly P, Duffy P, Roche J F, Boland M P. 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growthe, ovulatory response and endocrine patterns. Anim Reprod Sci ; 46: 1- 14.

Kim, I.H., Son, D.S., Yeon, S.H., Choi, S.W., Park, S.B., Ryu, I.S., et al. 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. Theriogenology 55 : 937– 945.
Kulick, L.J., Bergfelt, D.R., Kot, K., Ginther, O.J. 2001. Follicle sélection in cattle : deviation and codominance within sequential waves. Biol. Reprod. 65 : 839- 846

Lafri M., Ponsart C., Durand M., Jeanguyot N. , Humblot P. *2008.* Résultats de traitements de superovulation chez les bovins. Renc. Rech. Ruminants, 2008, 15

Laizeau J.S. (2009). Facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache laitière de race Montbeliarde. Thèse de Doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil (France).

Lacaze S., Coupeth., Blattes M., Perrin V., Hennequinm., 1992. Influences of artificial insemination number and bull on the percentage of transferable embryos in superovulated dairy cows. C.R. 8 e Colloque AETE Lyon, 174.

Lagneaux D., Tainturier D., Palmer E.1988: Luteolysis and bacterial contamination associated with unsuccessful cervical embryo tranfer in the mare. *Theriogenology*,1988,**29**, 28.

Lammond, D.R., Gaddy, R.G., 1972. Plasma progesterone in cows with multiple ovulations, J. Reprod. Fertil. 29, 307-311.

Lamothe, P., Guay, P., Tremblay, A. Blood glucose and endometrial glucose secretion in 2 groups of cows one which is affected by infertility sine materia]. Can. Vet. J. 13 (2): 29-32.

Lane M.W., Ahern T.J., Lewis I.M., Gardner D.K., Peura T.T., 1998. Cryopreservation and direct transfer of *in vitro* produced bovine embryos : a comparison between vitrification and slow-freezing. Theriogenology, 49, 170.

Laurincik, J., Grafenau, O., Hyttel, P., Greve, T. 1993a. Character of preovulatory follicles and oocytes after different superovulatory treatments in heifers. Theriogenology 39 : 545-551.

Legrand E., Krawiecki M., Tainturier D., Cornière P., Delajarraud H., Bruyas J.F., 2000. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Havemeyer Foundation Monogr. Ser., 3, 62-65.

Legrand, Stéphane, Frédéric, Rodolphe 2003.Transfert embryonnaire en race charolaise en clientele : etude des facteurs de reussite lies a la receveuse et a l'embryon these pour le doctorat veterinaire. Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort 2003.

Leibo S.P., Loskutoff M., 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. Theriogenology, 39, 81-94.

S. P. Lerner, W. V. Thayne, R. D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E. K. Inskeep, R. A. Dailey, P. E. Lewis and R. L. Butcher*J 1986.* Age, Dose of FSH and Other Factors Affecting Superovulation in Holstein Cows *ANIM SCI* 1986, 63:176-183

Leroy, J.L., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I.G., Bols, P.E. 2008. Reduced fertility in high yielding dairy cows : are the oocyte and embryo in danger? Part I: The importance energy balance and alterd corpus luteum function to the reproduction of oocyte and embryo quality in high yielding dairy cows. Reprod. Domest. Anim. 48; 5 : 612-622.

Liu J., Sirois J., 1998. Follicle size-dependant induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. Biol. Reprod., 58, 1527-1532.

Looney C R Boutte B W , Archbald LF Godke R A .1981 comparaison of one daily and twise daily FSH injections for superovulatory beef cattle. Theriogenologie; 15: - 22.

Lopez, H., R. Sartori, and M.C. Wiltbank, 2005a, Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. Biol Reprod, **72**(4): 788-95.

Lopez, H., *et al.*, 2005b, Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. J Dairy Sci, **88**(8): 2783-93.

W. F. Lubbadech A, C. N. Graves D L Sphar. 1980. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows . journal of animal science, vol. 50, No. 1.
Lussier J., Matton P., Dufour J.J.1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J.Reprod.Fert.,1987, 81, 301-307.

Lussier, J.G., Matton, P., Guilbault, L.A., Grasso, F., Mapletoft, R.J., Carruthers, T.D. 1994. Ovarian follicular development and endocrine response in follicular fluid treated and hemi ovariectomized heifers. J. Reprod. Fertil. 102 : 95-105.

Lussier, J.G., Matton, P., Guilbault, L.A., Grasso, F., Mapletoft, R.J., Carruthers, T.D. 1995. Ovarian follicular development and endocrine response in follicular fluid treated andhemi ovariectomized heifers. J. Reprod. Fertil. 102 : 95-105.

Lyimo Z.C., Nielen M., Ouweltjes W., Kruip T.A.M., Van Eerdenburg F.J.C.M. (2000) Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle Theriogenology, **53**, 1783-1795.

Macmillan K L. Thatcher. W. W. 2003. Effect of agonist of gonadotropin – realizing hormone on ovarian follicles in cattle. Biol. Reprod . 45:883-889.

J. Mallard, J.-C. Mocquot : Insimination artificielle et production laitière bovine: percussions d'une biotechnologie sur une filière de production INRA Prod. Anim.,1998, 11 (1), 33-39.

R.J. Mapletoft 1985. Embryo transfer in the cow: general procedures* **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1985, 4 (4), 843-858.

Mapletoft, R.J., Bennett-Steward, K., Adams, G.P. 2002. Recent advances in the superovulation of cattle. Reprod . Nutr. Dev. 42:601-611.

Mapletoft, R.J. 2006. Bovine embryo transfert. In: IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org) R0104.1106.
Mariana J.C., Monniaux D., Driancourt M.A., Mauleon . Folliculogenesis. In : Cupps P.T. (Eds.) : Reproduction in domestic animals. Academic Press, San Diego, 119-171.

Martens G, Nohner H P , Leiding C, Schneider F , Becker F, Nuernberg G Kanitz W. 2005. Optimizing frequency of FSH application for superovulatory traitement in cattle . Reprod Fertile Dev; 17: 313- 314 (abstract)

Martinez A.G., Brogliatti G.M., Valcarcel A., de las Heras M.A., 2002a. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos : a field trial. Theriogenology, 58, 963-972.

Martinez A.G., Valcarcel A., de las Heras M.A., de Matos D.G., Furnus C., Brogliatti G., 2002b. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. Anim. Reprod. Sci., 73, 11-21.

Mc Cue P.M., Squires E.L., 2002. Persistent anovulatory follicles in the mares. Theriogenology , 58, 541-543.

Meidan R, Altstein M, Girsh E.1992. Biosynthesis and release of oxytocin by granulosa cells derived from preovulatory bovine follicles. Effects of forskolin and insulin-like growth factor-1. Biol. Reprod., 1992, 46, 715-720.

Menissier .F, 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 95-104.

Mialot Jp, Constant F, Chastant-Maillard S, Ponter Aa, Grimard B - La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications - Journées Européennes de la Société Francaise de Buiatrie, Paris, Novembre 2001 : 163-168.

Mihm M, Austin E J - The final stages of domian follicles selection in cattle - Dom Anim Endocrinol, 2002 ; 23 : 155-166.

Mikel-Jenson A., Greve T., Madej A., Edqvist L.-E., 1982. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2□treated cow, Theriogenology 18 (1982) 33–34

Misra, A.K. 1993. Superovulation and embryo transferin buffalo: Progress, problems and future prospects in India. Buffalo Journal 1:13-24.

Misra, A.K., Mutha Rao, M., Kasiraj, R., Rangareddy, N.S., Pant, H.C. 1999b. Bull specific effect on fertilization rate and viable embryo recovery in the superovulated buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology 52 (4): 701-707.

Morris D.G., M.T. Kane, M.G. Diskin, J.M. Sreenan, 2002, Control Of Ovulation Rate InBeef Cattle, [en ligne], [http://www.teagasc.ie/research/reports/beef/4012/eopr4012.asp].

Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen Jm, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D - Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic mammals - Domest Anim Endocrinol, 2002 ; 23 (1-2) : 139-154

Monniaux D., Chupin D., Saumande J.,1983. Superovulatory responses of cattle, Theriogenology 19 (1983) 55–82.

Moor R.M., Kruip Th.A.M., Green D., 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation?, Theriogenology 21 (1984) 103–116.

Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Oka C., Kasai M., Takahashi K., 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops : clinical outcome of 223 cycles. Hum. Reprod., 18, 384-391.

Murphy B.D., Mapletoft R.J., Manns J., Humphrey W.D. 1984, Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response, Theriogenology 21 (1984) 117–125.

Murphy, B.D., Martinuk, S.D. 1991. Equine chorionic gonadotropin. Endocrine Reviews 12. 27-44 .

Nasser, L., Adams, G.P., Bo, G.A., Mapletoft, R.J. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. Theriogenology 40 : 713-724*
Niemann H., 1991. Cryopreservation of ovaand embryos from livestock : current status and research needs. Theriogenology,35, 109-124.

Nibart M., 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 113- 119.

Nibart N., Slimane N., Herrera R., Jeanguyot N., Mechekour F., Humblot P., Thibier M., 1988. Variations des concentrations plasmatiques des hormones gonadotropes (FSH, LH) et stéroïdes (oestradiol 17 bêta, progestérone) après différents traitements de superovulation chez la vache. Elev. Ins., 226, 11-30.

Nibart M,1991. le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées : bissection et sexage. Rec. Med. Vet. 167 – 261-290.

Nibart M „ p , 1997. Humblot, 1997. In A Combarnous Y, Volland Nail P Editors . Les gonadotropines . INRA Editions Ed, ; Paris. 377- 394.

Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W.2000. Mechanismcontrolling the function and life span of the corpus luteum.Physiology Rev.8 :129.
Nosier M. W B 2003. Ovarian follicular activity and hormone aprofiled uring estrusccyclein cows the developement of 2 versus 3waves . Reprod . Biol. Endocr 1:50.

Okuda, K., Miyamoto, Y., Skarzynski, D.J. 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F2α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. Dom. Anim. Endoc. 23 : 255 264.

Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., de Kruif, A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: afield study. Theriogenology 53 : 841–857.

Picard- Hagen N., Gayrad V., Berthelot X. 2008. La physiologie ovarienne chez la vache ; nouveauté et applications. Journnées nationales des GTV , Nantes, 1469 , 12- 19.

Philippe-Olivier, Michel, Marie Mozer 2001, la transplantation embryonnaire chez des juments en anoestrus : etude experimentale ecole nationale veterinaire d.alfort annee 2001 these pour le doctorat veterinaire.

Phillippo M. & Rowson L.E.A. (1975). — Prostaglandin and superovulation in the bovine. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **15,** 233-240.

Poyser, N.L.1995. The control of prostaglandin by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. Prostaglandin Leukotrienes Essent. Fatty acids 53: 147-195.

Pritpal, S.M., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., Jaswant Singh. 2007. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. . J. Reprod. Fertil. 134 : 233–239.

Ponsart, B. Marquant-Leguienne, *P. Humblot.* 2004. *UNCEIA Département R&D, 94703, Maisons Alfort* Les biotechnologies de l'embryon bovin, évolution et perspectives. Renc. Rech. Ruminants, 2004, **11**

Ponsart C .B. Marquant-Leguienne, P. Humblot. 2004. Evolution and future trends for the use of embryo based biotechnologies in cattle. Renc. Rech. Ruminants, 2004, 11.

Pugh P.A., Tervit H.R., Niemann H., 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. Anim. Reprod. Sci., 58, 9-22.

Putney, D.J., Drost, M., Thatcher, W.W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between day 1 to 7 post insemination. Theriogenology 30 : 195-209.

Rajakoski, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left – right variation. Acta endocrinol. Suppl. 34 ;52: 1- 68.

Rall W.F., Fahy G.M., 1985. Ice-free cryopreservationof mouse embryos at - 196 degrees Cby vitrification. Nature, 313, 573-575.

Renard J.-P., Heyman Y., Dumesnil du Buisson F., 1977. Theriogenology, 7, 189-194.
Reuben J , Mapletoft And Gabriel A Bo . 2011. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle (abstract) . Reproduction . Fertility And Development. 24 (1) 278- 283

Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Espey, L.L. 2002. Ovulation : new dimensions and new regulators of the inflammatory like response. Ann. Rev. Physiol. 64 : 69-92.

Rieutort., 1995. Abrege. Physiologie Animale 2: Les grandes fonctions.
Rivera, G.M. and J.E. Fortune, 2001, Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. Biol Reprod., **65**(1): 112-8.

Rizos D., Ward F., Boland M.P., Lonergan P., 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology, 56, 1-16.

Rizos D., Lonergan P., Ward F., Duffy P., Boland M.P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo* : implication for blastocyst yield and blastocyst quality. Mol. Reprod. Dev., 61, 234-248

Rivera, G.M., *et al.*, 2001, A Potential Role for Insulin-Like 4 Proteolysis in the Establishment of Ovarian Follicular Dominance in Cattle. biology of Growth Factor Binding Protein-reproduction, **65**: 102-111.

Roche J.F., Mihm M., Diskin M.G. 1997. Physiology and practice of inducing and control of estrus cycle in cattle, bovine practitioner, 31, 4- 10.

Sreenan J.M. & Gosling J.P. 1977. — The effect of cycle stage and plasma progesterone level on the induction of multiple ovulations in heifers. *J. Reprod. Fert.*, **50**,367-369.

R.B .Stagmiller ,M.DMacneil,R.A.Bellows, R.E. Short and D.A.Phelps: the effect of estrus synchronization scheme, injection protocol and large ovarian follicle on response to superovulation in beef heifers. Theriogenology 43: 823-834, 1995.

Sugano M , Shinogi T, 1999. Superovulation induction in japanese black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Anim Reprod Sci. 55: 175- 181.

Taownson D H, Tsang Pcw Bulter W R Frajbilat M, Griel L C, Johnson J C, Milvae R A, Niksic G M, Pate J L (2002). Relashionship of fertilityty to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows ,J. Amin.Sci. 80:1053-1058.

Thibier M., Craplet C., Parez M. (1973). Les progestagènes naturels chez la vache Rec. Méd. Vét., 149, 1181-1203.

Thibier M. 1990. In Merieux Editions, 6èmeréunion AETE, Lyon, 67-81

M .Thibier , M Nibart 1992. Transfert embryonnaire chez les bovins avec référence particulière à l'interaction embryons-agents pathogènes. Article original Ann Zootech (1992) 41, 341-346.

Traldi A.S., 2000. Vitrification of goat *in vivo* and *in vitro* produced embryos. 7th International Conference on Goats, Tours, Poitiers, France,1031.

Uchiyama Y, Hosoe M, Sato T, Takahashi T . 2009: Biological and immunological characteristics of porcine follicle-stimulating hormone chemically modified with a polyethylene glycol derivative. Niigata Prefectural Livestock Research Center, Sanjo City, Niigata 955-0143, Japan.

Ushinohama K, Kamimura S, Hamana K; 1998. Ultra sonographic observation of individual follicular developent in japanese black cows superovulated with FSH . j reprod dev; 44: 237- 242.

Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H., 1997. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-starw direct rehydratation. J. Reprod. Fertil., 111, 65-70.

Vaughan, L.1990. The effects of copper status and FSH on follicle development and fertility in heifers. Ph.D. Thesis. National University of Ireland. Cited in : Roche, J.F., Boland, M.P.1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. Theriogenology 35 : 81-90.

Wandji S.A., Fortier M.A., Siurard M. A. 1992. Differential response to gonadotropins and prostaglendins E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. Biol.Reprod.,1992, 46,1034- 1041.

Westergaard L, Callesen H, Hyttel P. 1985. Meiosis inducing substances (MIS) in bovine prevulatory follicles. Zuchthygiene, 1985, 20, 217-221.

Wilmut I., Rowson L.E.A., 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., 1973, 92, 686-690.

Wooding FB, Wathes DC. 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. Journal of Reproduction and Fertility 59,425-430.

Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Badinga, L., Savio, J.D., Median, R., Lew, B.J. et al. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. Biol.Reprod. 52 : 1106-1113.

Yamamoto M , Ooe M, Kawaguchi M , Suzuki M T, 1995. Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone for superovulation in cows. J Reprod Dev; 41: 93-96.

Yamamoto m, Suzuki t , Ooe M, Takagi M, Kawaguchi M . 1992. Efficacy of single vs multipleninjection superovulatory regimens of FSH using polyvinylpyrrolidone. Theriogenology; 37: 325 (abstract).

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In : Knobil E, Neill JD 1994. (Eds). The physiology of reproduction. Second edition. Raven Press Ltd , New York, 1994, 189-317.

Youssaoa.K.I., Ahissou A., Toure Z., Leroy P.L., 2000. Productivité de la race Borgou à la Ferme d'élevage de l'Okpara au Bénin. Revue Elev. Méd. vét. Paystrop., 53 : 67-74.

Zeitoun, M.M., Rodriguez, H.F., Randel, R.D. 1999. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. Theriogenology 45 : 1577-1581.