410THV-2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCR

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE " SAAD DAHLEB" BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
"DOCTEUR VETERINAIRE"

Thème

ETUDE DE LA REACTION DES VACHES AMELLIOREES A UN TRAITEMENT DE SUPEROVULATION A BASE DES EXTRAITS HYPOPHYSAIRE

Présenté par

Mr. EZZRAIMI HAMZA **Mr. KHELLADI ABDERRAHMANE**

Devant le jury:

-Dr.KAIDI.R	**Professeur**	**USDB**	**Président**
-Dr.FERROUK.M	**MCB**	**USDB**	**Examinateur**
-Dr.GHERBI.I	**MAA**	**USDB**	**Examinateur**
-Dr.ADEL.D	**MAA**	**USDB**	**Promoteur**

Promotion: 2009 /2010

REMERCIEMENTS

Nous remercie **DIEU**, de nous avoir donné la santé et la volonté, pour accomplir ce modeste travail.

Nous adressons nos remerciements à notre promoteur **DJELLAL.A** chargé de cours à la faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques de Blida, pour avoir dirigé mon présent travail et pour ses encouragements.

Nous remercions sincèrement **Pr.KAIDI R** de nous avoir honoré en acceptant de présider le jury.

Nous remercie sincèrement **Dr.FERROUK.M** de nous avoir bien voulu faire partie de ce jury et examiner le document.

Nous remercions sincèrement **Dr.GHEBLI** de nous avoir bien voulu faire partie de ce jury et examiner le document.

Nous remercions **HOUARI MOHAMED** de son soutien et son aide durant toute la période de ce travail.

Nous remercions les étudiants de 5ème année promotion 2010, et que soit associé à ces remerciements, l'ensemble du corps enseignant de faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques de Blida.

Nous remercions tous ceux qui ont participé de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie mon travail à :

Mes très chers parents, que DIEU les accorde la santé et la longue vie.

Ma chère grande mère que dieu l'accorde la longue vie.

Mes chers frères : ABEDANNOUR et FARES.

Mes chères sœurs : IMEN et LOUIZA.

Mes deux nièces : NOURHEN et SARAH.

Ma future femme BILA et toute sa famille.

Mes amis : AMIN et ABEDALLAH.

Toutes les personnes qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études et à toute la promotion 2010.

Et surtout à toi mon binôme ABEDARRAHMEN et toute ta famille.

EZZRAIMI.H

DEDICACES

Je dédie mon travail à :

Mes très chers parents, que DIEU les accorde la santé et la longue vie.

Mes chers frères: SOHIB et ANES.

MA chère sœur ASMA.

Mes grands parents paternels et ma grande mère maternelle.

Mes amies et mes cousins.

Toutes les personnes qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études et à toute la promotion 2010.

Et surtout à toi mon binôme HAMZA et toute ta famille.

KHELLADI.A

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

Tableau0 1 : Efficacité comparée de la PMSG et de la FSH..... 14

PARTIE EXPERIMENTALE :

Tableau 02 : Protocole du traitement de la superovulation.....32

Tableau03 : La durée d'apparition des chaleurs après PG.....34

Tableau 04 : Résultats de l'examen rectal.....35

Tableau 05 : Le résultat global des récoltes.....36

Tableau 06 : Classification des embryons.....37

Tableau 07 : Les récoltes et les embryons obtenus 38

Tableau 09 : Résultats du transfert en frais.....40

LISTE DES FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

Figure 01 : Follicules primordiaux sur une coupe transversale d'ovaire de bovin……………2

Figure 02 : Follicule secondaire sur une coupe transversale d'ovaire de bovin………………3

Figure 03 : Follicule tertiaire sur une coupe transversale d'ovaire de bovin…………………3

Figure 04 : Schéma récapitulatif de l'ovogenèse et de la folliculogenèse chez les mammifères ……………………………………………………………………………………4

Figure 05: Representation schématiquedes vagues de croissence folliculaire au cours du cycle sexuel chez la vache ;;……………………………7

Figure 06 : Schéma de l'ovaire……………………………………………………………………9

Figure 07 : Schéma de traitement de superovulation par FSH………………………………14

Figure 08 : Schéma de traitement de superovulation par PMSG (en phase lutéale d'un cycle naturel)………………………………………………………………………………16

PARTIE EXPERIMENTALE :

Figure 09 : Protocole de traitement de superovulation……………………………………33

Figure 10 : Résultats de détection des chaleurs ……………………………………………35

Figure 11 : structures trouvées lors de l'exploration rectale…………………………………36

Figure 12 : Nombre d'embryon par saison……………………………………………………37

Figure 13 : Les classes des embryons …………………………………………………………38

Figure 14 : Taux de gestation……………………………………………………………………40

LISTE DES PHOTOS

PARTIE EXPERIMENTALE :

Photo 01 : Vue général de l'exploitation……29

Photo 02 : Matériel d'observation et de conditionnement des embryon ……31

Photo 03 : quelques embryons transférables……39

Photo 04 : Embryon non fécondé……39

Photo 05 : Diagnostic de gestation à j56 par échographe……41

Photo 06 : Diagnostic de gestation à j64 par échographe……41

LISTE DES ABREVIATIONS

BVD: bovin virus diarrhée.

Cj: Corps jaune.

e.C.G: equine chorionic gonadotrophin.

FSH: follicule stimulating hormone.

GNRH: gonadotrophine releasing hormone.

hCG: human chorionic gonadotrophine.

I.A: insémination artificielle.

IGFPB: insulin-like growth factor binding protein.

LH: luteinizing hormone.

ND: nom dépose.

PBS: phosphate buffered saline.

$PGF_2\alpha$: prostaglandine $F_2\alpha$.

PH : potentiel d'hydrogène.

PMSG : pregnant mare serum gonadotrophine.

PO: post ovulation.

SC : sous cutané.

I.M.V : Institue de médecine vétérinaire.

Kg : Kilogramme.

Vs : versus

F : follicule.

H : heure.

I .M : Intra musculaire.

I.N.R.A : Institue national de la recherche agronomique.

B.S.A : Bovin sérum albumine.

Liste des annexes

ANNEXE 01 : Le suivi de la croissance de l'embryon.

ANNEXE 02 : Classification proposée.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

Résumés

Introduction

LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Physiologie de l'ovaire

Introduction.....1

I- Ovogenèse et folliculogenèse 2

I-1- Stade embryonnaire.....2

I-2- A la naissance.....2

I-3- A la puberté 4

II- Dynamique de la croissance folliculaire 5

II-1- Vagues folliculaires.....5

II-1-1- Recrutement.....5

II-1-2- Sélection.....6

II-1-3- Dominance 6

II-2- L'ovulation.....8

II-3- L'atrésie 9

II-4- Le corps lutéal ou corps jaune.....9

III-Variations hormonales au cours du cycle œstral 10

III-1- Les hormones hypophysaires.....11

III-1-1- LH.....11

III-1-2- FSH.....11

III-2- L'hormone hypothalamique.....11

III-3- Les hormones ovariennes.....12

III-3-1- Les œstrogènes.....12

III-3-2- La progestérone.....12

III-3-3- Les prostaglandines..... 12

Chapitre II : Production et transfert des embryons

Introduction.....13

I- Choix de la donneuse 13

II- Influence de la stimulation hormonale 14

III- Traitement de superovulation.....14

III-1- Traitement par FSH.....14

III-2- Traitement par PMSG.....16

IV- Conséquence d'un traitement de superovulation 17

V- La collecte des embryons.....17

V-1- Examen des embryons 18

V-2- Identification du stade.....19

V-3- Evaluation de la qualité des embryons.....20

VI- Les facteurs influencent sur la production d'embryons.....20

VI-1- Influence de la donneuse d'embryons 20

VI-1-1- Facteurs génétiques.....20

VI-1-2- Facteurs physiologiques 21

VI-1-3- Facteurs sanitaires.....22

VI-2- Influence du mâle.....23

VI-2-1- Effet direct du taureau.....23

VI-2-2- Effet du protocole d'insémination 23

VI-3- Influence du traitement 24

VI-3-1- Les hormones utilisables 24

VI-3-2- Le protocole 25

VI-3-3- Influence de la répétition des traitements 25

VI-3-4- Influence du jour du cycle auquel débute le traitement 26

VII- La congélation des embryons.....26

- Le principe de la congélation..... 27

LA PARTIE EXPERIMENTALE

I- Introduction 28

II- Objectif 28

III- Matériel 28

III-1- Animaux 28

❖ Le choix des donneuses 28

❖ Le choix des receveuses 29

III-2- Extrait hypophysaire et traitement 29

III-3- Matériel d'insémination collecte, transfert et de congélation des embryons 29

IV- Méthode 30

IV-1- L'observation des chaleurs (naturelles) 30

IV-2- La superovulation 30

IV-4- La récolte des embryons 32

IV-5- Recherche des embryons 32

❖ La mise en paillettes.....33

V- Les résultats 33

V-1- Résultat obtenus lors de l'insémination artificielle 33

V-2 - Les résultats obtenus lors de l'exploration rectale.....34

V-3- Les résultats de récolte.....35

V-4- Resultats de recherches des embryons 38

V-5- Les résultats obtenus après les récoltes 38

V-6- Les résultats du transfert 40

V- Discussion..... 43

Conclusion

Recommandations

RESUME

Chez les mammifères, la fonction de l'ovaire est de produire à chaque ovulation un ou plusieurs ovocytes fécondables et de créer un environnement hormonal propice au démarrage éventuel d'une gestation. C'est ainsi que nous avons mise au point une méthode qui nous permet d'utiliser le potentiel productif de la vache en limitant le gaspillage, par atrésie. En effet, une superovulation, suivie d'une insémination artificielle qui aboutit à la fécondation de ces ovocytes produites et production d'embryon en fin. On les transfère sur des receveuses ou encor les congelés.

Le travaille de notre étude expérimental a été réalisé dans une ferme privés dont le sujet a était porter sur quatre vache laitière de race Holstein, ou on a obtenue une moyenne de 7,2 corps jaune par vache et par collecte après traitement de superovulation a base de extrais hypophysaire porcine sous le nom déposer Stimulfol.

On a réalisé 11 récoltes et on a obtenue 55 embryons, on a réalisé 6 transferts et on a obtenue un taux de gestation de 33,33% confirmé par échographie.

Mots clef : Superovulation, extrait hypophysaire, transfert d'embryon, station privé, taux de gestation.

Abstract

In mammals, the function of the ovary is to produce at each ovulation one or more fertile eggs and creating a hormonal environment conducive to start a possible pregnancy. Thus we have developed a method that allows us to use the productive potential of the cow by limiting waste, by atresia. Indeed, superovulation, followed by artificial insemination leading to the fertilization of eggs produced and the production of embryo end. They were transferred into the recipient or still frozen. The work of our experimental study was conducted in a private firm of which the subject was wearing four Holstein dairy cow, or it has obtained an average of 7.2 lutea per cow per collection after superovulation treatment was based extrais pituitary of swine under the name file Stimulfol. It has conducted 11 crops and 55 embryos were obtained, we conducted six transfers and we obtained a pregnancy rate of 33.33% confirmed by ultrasound.

الملخص

عند الثدييات وظيفة المبيض هي إنتاج خلال كل عملية تبييض بويضة أو أكثر قابلة للتلقيح و توفير وسط هرموني ملائم لبدء عملية الحمل. من أجل هذا لجأنا إلى طريقة تسمح لنا باستعمال القدرة الإنتاجية للبقرة لتفادي تبذير البويضات عن طريق الضمور.

عملية إنتاج أكثر من بيضة على مستوى المبيض متبوعة بعملية التلقيح الاصطناعي من أجل تخصيب البويضات و إنتاج أجنة التي تحول عند بقرات مستقبلة أو تجمد.

تمحور عملنا التجريبي على أبقار من سلالة الهولستين، بحيث جرت المراحل التجريبية على 4 أبقار من بين 150 بقرة تابعة لمزرعة خاصة، تحصلنا من خلال العينة المدروسة على 7,2 أجسام صفراء لكل عينة و لكل بقرة.

كما قمنا بـ:11 عملية جني للأجنة، فتحصلنا على 55 جنين و قمنا أيضا بـ: 6 تحويلات ، فكانت نسبة الحمل 33.33 % .

فهرس المفردات: عملية إنتاج أكثر من بيضة،نقل الأجنة، مزرعة خاصة، تلقيح اصطناعي، نسبة الحمل

Introduction général :

Les biotechnologies de l'embryon c'est l'ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l'embryon. Leur essor est récent et encore à bien des égards modeste. Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80, d'abord dans l'espèce bovine où la reproduction des animaux était, depuis déjà trente ans, largement organisée autour de l'insémination artificielle. Chez cette espèce, l'embryon a d'abord été produit exclusivement *in vivo* après stimulation hormonale des femelles donneuses. Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation. Plus récemment, une deuxième génération de technologies est apparue qui s'appuie sur la production d'embryons en culture, après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant. Les progrès de nos connaissances sur la physiologie de l'embryon de mammifère permettent maintenant l'émergence d'une troisième génération de techniques. Celles-ci tirent parti de l'extraordinaire plasticité des premiers stades de l'embryogénèse et visent à modifier encore plus en avant les caractéristiques de l'embryon : le transfert nucléaire qui aboutit à la production de clones, et la transgénèse qui consiste à introduire un gène étranger dans les cellules de l'embryon en sont les illustrations (COLLEAU, J.J. ; HEYMAN, Y. ; RENARD, J.P 1998).

Le premier essai couronné de succès de prélèvement d'un embryon suivi de son transfert dans une lapine fut réalisé par HEAPE en 1891. C'est en 1951 que naquit le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse (WILLETT et al. 1951). Le premier veau né après transfert d'un embryon congelé puis décongelé naquit en 1973 (WILMUT et ROWSON 1973). Il portait le nom de frosty II. Frosty Iétant né suite à une fécondation réalisée au moyen de sperme congelé.

Dans ce contexte la réalisation d'une étude de réaction de vache améliores à un traitement de superovulation dans notre étude a pour objectif de maitriser les différentes étapes de la production d'embryons dans l'espèce bovine, en utilisant des extraits hypophysaires dans un protocole classique de superovulation ainsi que la technique de transfert en frais.

LA PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

PHYSIOLOGIE

DE L'OVAIRE

Introduction :

La production des gamètes femelles fécondables, ou ovogenèse, est un processus de développement long et discontinu. Chez les mammifères, la méiose qui aboutit à la formation des gamètes haploïdes, ou ovules, débute au stade fœtal, se bloque au stade de prophase de première division méiotique lors de la formation des follicules ovariens, puis reprend à l'ovulation pour se bloquer à nouveau au stade de métaphase de deuxième division méiotique, stade auquel l'ovocyte mature est expulsé dans les voies génitales femelles.

Ce dernier blocage ne sera levé qu'à la fécondation si elle a lieu, et l'ovule est donc une cellule «fugace et rare». L'ovogenèse est d'autant plus complexe qu'elle s'imbrique dans un autre processus de développement, la folliculogenèse avec laquelle elle entretient des liens étroits. Ainsi, le follicule apporte à l'ovocyte qu'il renferme l'environnement nécessaire à sa croissance et à l'acquisition de sa compétence à la fécondation et au développement embryonnaire. A l'inverse, la promotion du développement folliculaire par l'ovocyte a été longtemps ignorée, mais est maintenant bien établie **(MATZUK et al, 2002), (KNIIGHT et GLISTER ,2006).**

L'ensemble des connaissances actuelles confirme que l'ovogenèse est absolument indissociable de la folliculogenèse. Le développement des follicules ovariens, ou folliculogenèse, commence au démarrage de croissance du follicule primordial et se termine à l'ovulation, stade ultime de la folliculogenèse, ne se produit que si les caractéristiques endogènes (développementales, hormonales, métaboliques) de l'individu et son environnement (saison, nutrition, interactions sociales) le permettent. L'influence des facteurs environnementaux sur le développement folliculaire et l'ovulation varie fortement selon les espèces de mammifères considérées, comme l'illustre par exemple l'existence d'animaux à reproduction saisonnée ou non, et d'animaux à ovulation spontanée ou déclenchée par la saillie. Néanmoins, pour tous les mammifères, la maturation folliculaire et l'ovulation sont sous le contrôle direct du système hypothalamo-hypophysaire qui intègre les informations des facteurs endogènes et exogènes, et les retraduit par des modifications de sécrétion des gonadotropines FSH et LH. Le rôle crucial des gonadotropines dans le contrôle de la folliculogenèse et le déclenchement de l'ovulation est désormais bien établi. Cependant, ces processus sont aussi régulés par de très nombreux autres facteurs, dont l'importance varie au cours de la folliculogenèse.

I- Ovogenèse et folliculogenèse :

I-1- Stade embryonnaire :

Dans les gonades embryonnaires, dès 45 jours de gestation chez la vache, l'ovaire est le siège de multiplications intenses des cellules germinales ou cellules primordiales, aboutissant à la création d'un pool important de cellules appelées ovogonies. Pendant la période fœtale, vers 75-80 jours de gestation, les ovogonies entreprennent des divisions méiotiques. Ces dernières sont interrompues au stade de prophase 1 : les cellules issues de ces divisions sont appelées ovocytes primaires **(ADAMS et al, 2008).**

I-2- A la naissance :

A la naissance, chaque ovaire de génisse contient une moyenne de 150.000 follicules primordiaux **(Figure1)**, c'est-à-dire les ovocytes primaires entourés d'un épithélium simple (cellules de pré-granulosa).

Dès la différenciation de cet épithélium en cellules de la granulosa, on parle de follicule primaire. Jusqu'à la puberté, ces follicules continuent de croître, jusqu'à l'acquisition de deux ou plusieurs couches de cellules de la granulosa ainsi qu'une membrane basale (follicules secondaires) **(Figure2),** puis d'une couche de cellules théquales interne et externe (follicules tertiaires) **(Figure3).** Leur croissance s'arrête alors : les follicules s'atrésient.

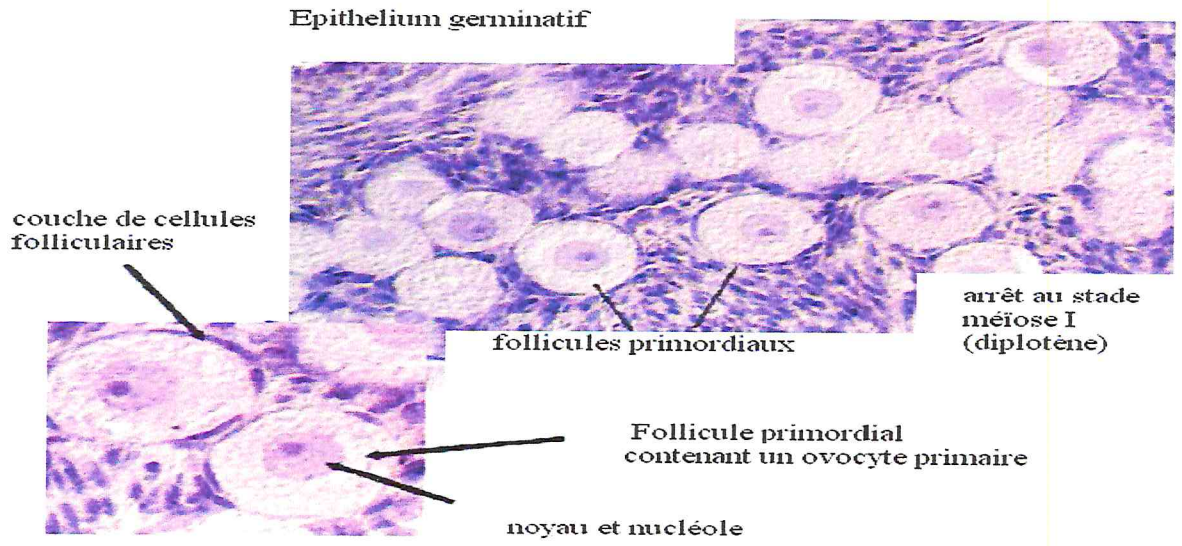


Figure 01 : Follicules primordiaux sur une coupe transversale d'ovaire de bovin (GAYARD ,2008).

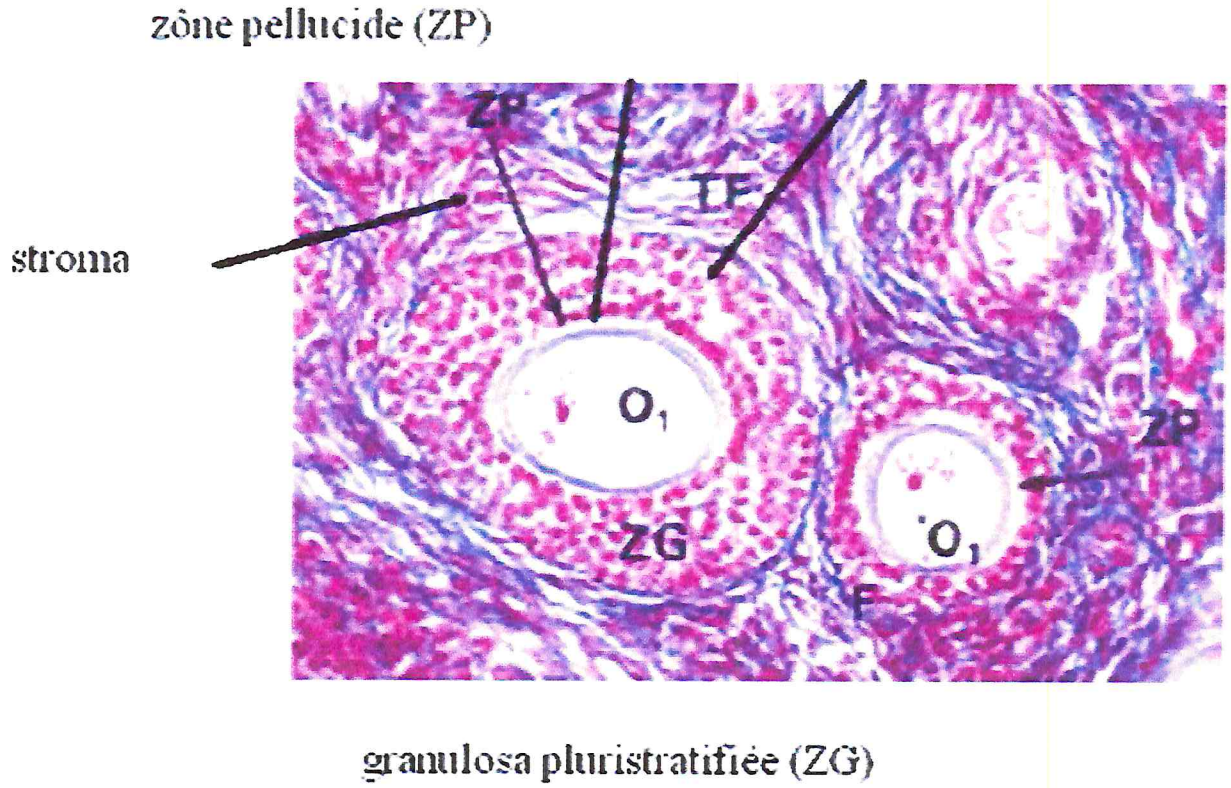


Figure 02: Follicule secondaire sur une coupe transversale d'ovaire de bovin (GAYARD, 2008).

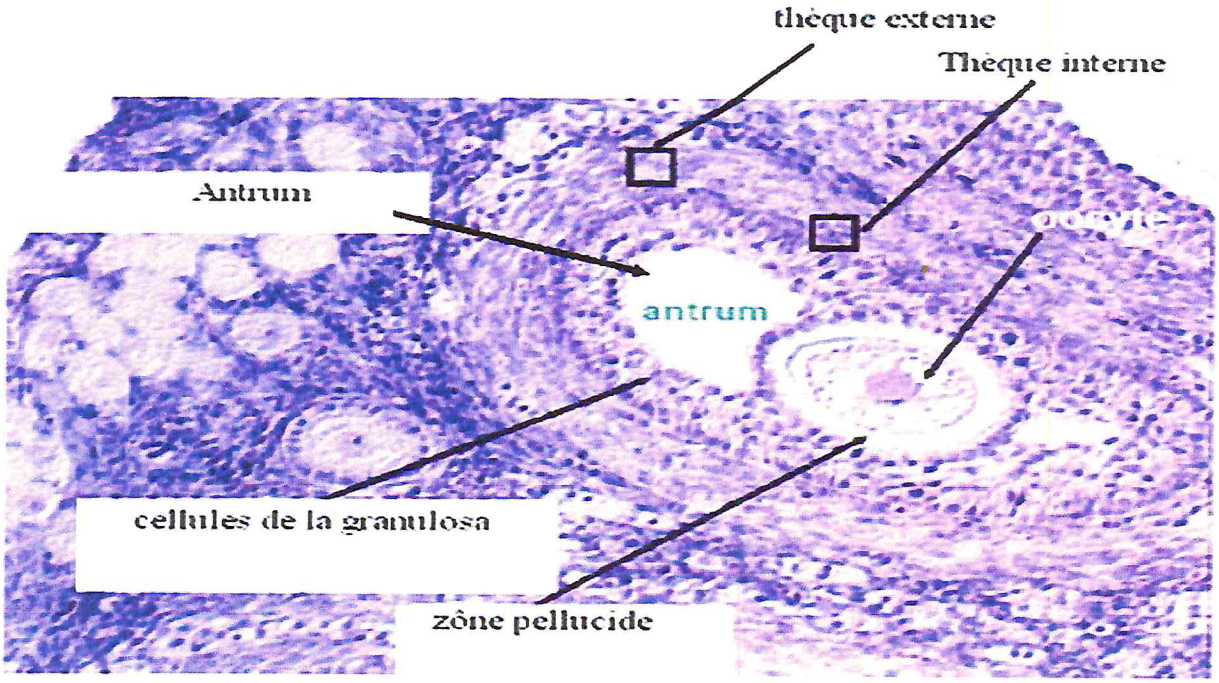


Figure 03: Follicule tertiaire sur une coupe transversale d'ovaire de bovin **(GAYARD, 2008).**

I-3- A la puberté :

La puberté survient chez les génisses entre 7 et 18 mois. La croissance des follicules, sous dépendance des hormones gonadotropes FSH et LH, se poursuit au-delà pour atteindre le stade de follicule pré-ovulatoire ou de « De Graaf ». Avant l'ovulation, les ovocytes primaires (ovocytes I) poursuivent la division méiotique au sein des follicules, et expulsent le premier globule polaire. Ils s'arrêtent en métaphase II du cycle méiotique. Lors de l'ovulation, c'est donc un ovocyte II bloqué en métaphase II (ou ovule) qui est libéré. Ce n'est qu'après la fusion du spermatozoïde avec l'ovule que ce dernier expulse le deuxième globule polaire et achève sa méiose. On qualifie d'embryon l'entité contenant un pronoyau mâle et un pronoyau femelle. La figure 4 présente un schéma récapitulatif de la différentiation des cellules et de la croissance folliculaire de la vie fœtale à la puberté.

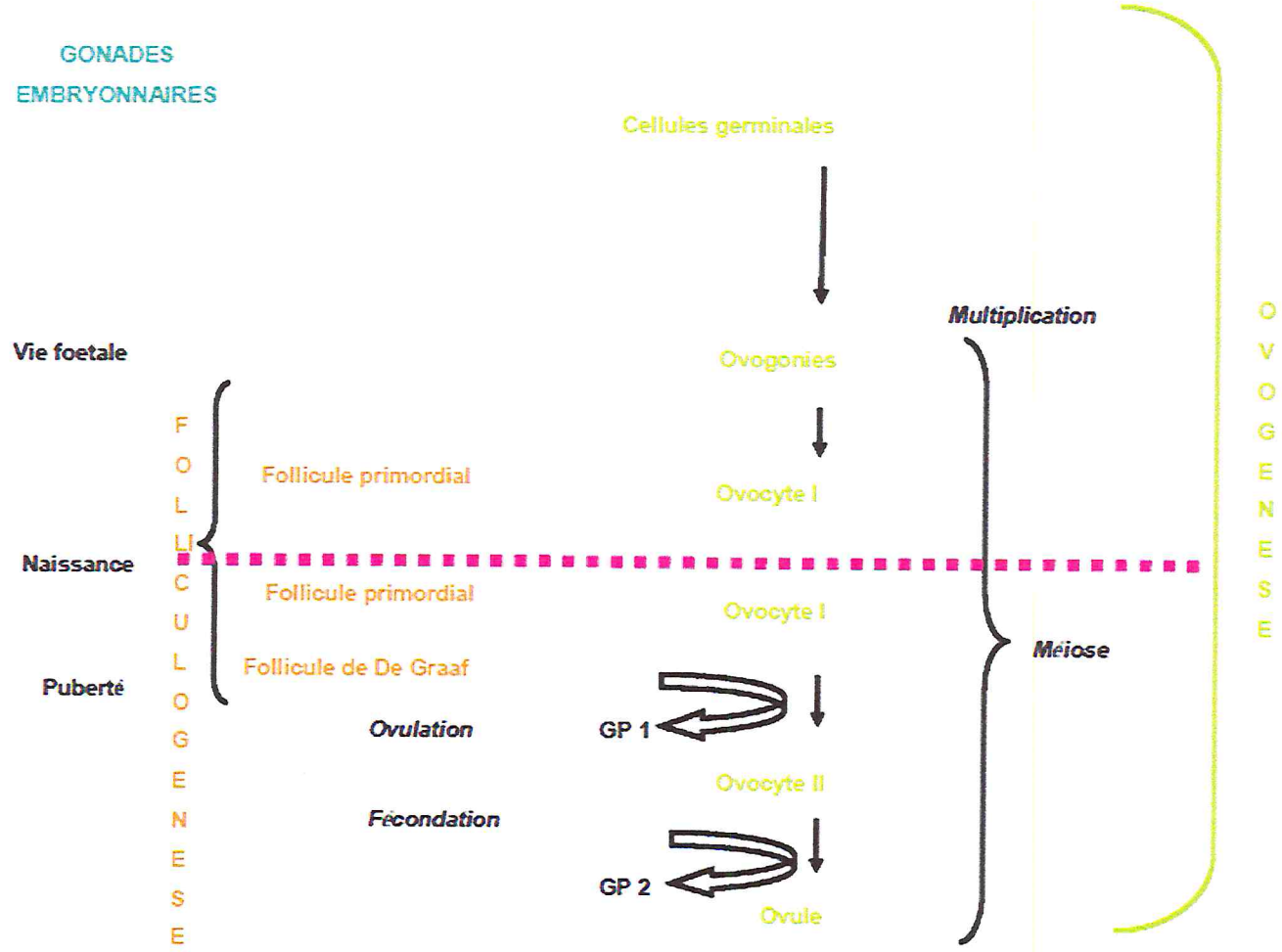


Figure 04: Schéma récapitulatif de l'ovogenèse et de la folliculogenèse chez les Mammifères **(GAYARD, 2008).**

II- Dynamique de la croissance folliculaire :

II-1- Vagues folliculaires :

On parle de vagues folliculaires pour décrire le phénomène cyclique et continu 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 plusieurs follicules, selon les espèces.

Le cycle œstral des vaches se compose de 2 ou 3 vagues folliculaires : les cycles à deux jours durent 2 à 3 jours de moins que les cycles à 3 vagues (19-20 jours contre 22-23jours) **(NOSEIR ,2003)** et **(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 de races allaitantes qui ont une prédominance de cycles à 3 vagues folliculaires (GINTHER et al, 1989). Lors de cycles à 3 vagues, on observe deux vagues anovulatoires avant une dernière vague ovulatoire (MACMILLAN et al, 2003).

Ces vagues folliculaires intéressent des follicules provenant des 2 ovaires évoluant de manière synchronisée, répondant aux variations hormonales systémiques et locales comme une seule entité (ADAMS et al, 2008).

II-1-1- Recrutement :

Le terme de recrutement s'applique à tout follicule qui a dépassé le stade auquel habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiques (FORTUNE, 1994). Il concerne donc chez les ruminants 2 à 5 follicules de taille comprise entre 3 et 6 mm (DRIANCOURT *et al.* 1991).

II-1-2- Sélection :

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, 1989), (LOPEZ et al, 2005).

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, 1997).**

Or, au cours de la croissance des follicules, les cellules de la granulosa secrètent de manière active des œstrogènes et de l'inhibine qui agissent par rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire de LH et surtout de FSH, en régulant l'expression des récepteurs à FSH et LH sur les cellules de la granulosa **(HERATH et al, 2007).** La concentration de FSH baisse progressivement pour atteindre un nadir au moment de la déviation (ADAMS 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).

II-1-3- Dominance :

Le follicule dominant se développe sur l'ovaire droit ou gauche indépendamment du côté de la précédente ovulation. Un seul follicule (dans les espèces mono-ovulantes) 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'œstradiol. Le début de la période de dominance se définit par la présence d'un follicule de diamètre supérieur de 1 à 2 mm au follicule de diamètre immédiatement inférieur, ainsi que par un arrêt de la croissance des follicules subordonnés par rapport au follicule dominant (IRELAND et ROCHE ,1983).

La dominance d'un follicule s'apprécie, in vitro, par la présence d'une concentration en œstrogènes plus élevée dans le fluide folliculaire et une activité aromatasique -activité de l'enzyme aromatase, convertissant la testostérone en œstradiol- des cellules de la granulosa plus importante dans ce follicule par rapport aux autres (FORTUNE et al, 2001).

D'autres caractéristiques distinguent encore le follicule dominant des follicules subordonnés ainsi une vascularisation plus importante (ACOSTA et al, 2007), 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, 2005).

Les raisons pour lesquelles un follicule plus qu'un autre accède au statut de follicule dominant sont pour le moment en cours de recherche. Dans 75% des cas, le plus grand

follicule émergeant devient le follicule dominant : au moment du recrutement, la dominance se manifesterait déjà sous forme d'un avantage de taille (WILTBANK et al, 2000).

Mais cette caractéristique n'est pas fiable pour déterminer quel follicule exercera la dominance sur les autres. La découverte de sensibles changements morphologiques et physiologiques dès le recrutement laisse supposer que la mise en place des mécanismes conduisant à l'ovulation d'un seul follicule dominant est antérieure et non contemporaine à la sélection comme les études initiales le présupposaient. La confirmation de cette hypothèse a été obtenue : dès le deuxième jour après l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire, le follicule dominant exprime des caractéristiques de dominance. De plus, au cours de la première vague folliculaire d'un cycle œstral, le follicule de la cohorte dont la concentration en IGFBP-4 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4) dans le liquide folliculaire est la plus faible au moment du recrutement devient toujours le follicule dominant (MIHM et al, 2000).

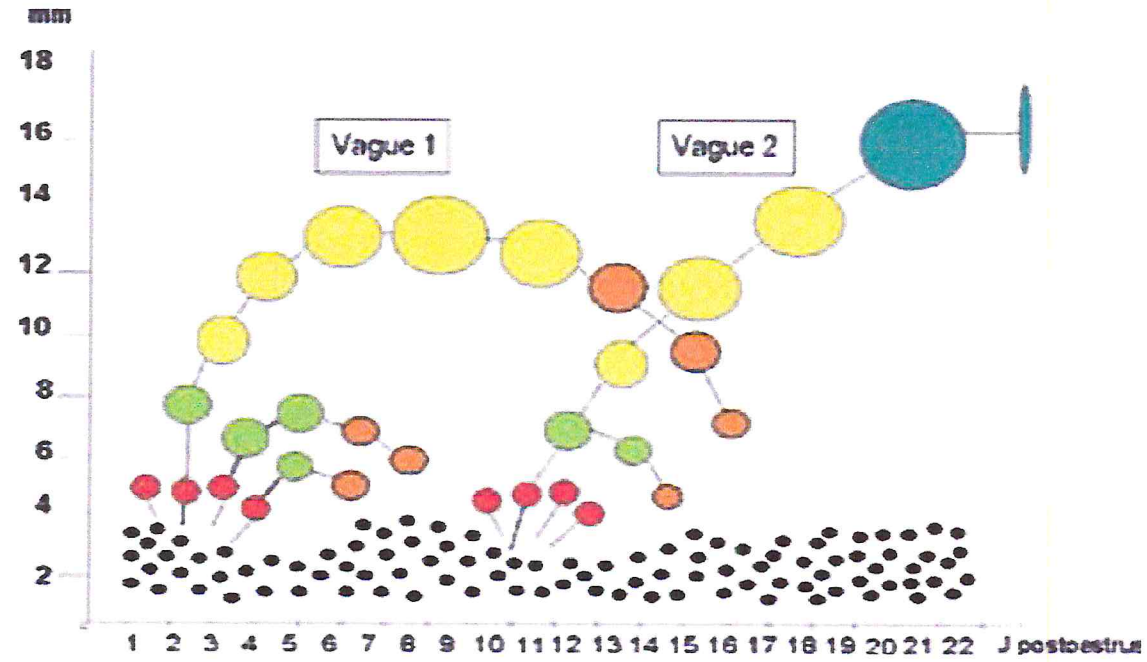


Figure 05: Représentation schématique des vagues de croissance folliculaire au cours du cycle sexuel chez la vache (FORTUNE 1993).

II-2- L'ovulation :

Lorsque le follicule est à son développement maximal, il est protubérant à la surface de l'ovaire. Le système vasculaire sanguin et lymphatique autour du follicule favorise un taux croissant de sécrétion d'un fin fluide folliculaire. Cette sécrétion est influencée par une augmentation de la pression et de la perméabilité dans les capillaires sanguins au cours du proœstrus et de l'œstrus. L'accumulation de liquide fait gonfler les follicules mais la pression

intra folliculaire n'augmente pas. De petites hémorragies ont lieu dans la paroi folliculaire. Cette paroi devient très mince et transparente à la périphérie du site d'ovulation. Ces changements dans la paroi du follicule précédent la rupture qui est due a la libération de collagénases. La LH stimule la production de prostaglandines PGF2α et PGE2. On pense que la PGF2α entraine la libération des collagenases à partir de cellules folliculaires, causant la digestion de la paroi folliculaire et sa distension au niveau du stigma. Le processus de digestion libère également des protéines qui provoquent une réponse inflammatoire avec une infiltration de leucocytes et la libération d'histamine. Tous ces processus dégradent la paroi et l'épithélium germinatif, alors le follicule se rompt au niveau du stigma et l'ovocyte est libère (LAFOREST, 2005).

II-3- L'atrésie :

Puisque seulement un petit pourcentage des ovocytes potentiels est libéré par l'ovaire lors de l'ovulation (généralement un seul chez la vache) plusieurs follicules régressent à un certain moment. Cette régression est appelée atrésie. Quatre-vingt dix-neuf pourcent des follicules subissent une atrésie. Dans l'atrésie des follicules primaires et secondaires chez la vache, la cellule œuf dégénère avant la membrane folliculaire alors que pour les follicules tertiaires, c'est l'inverse qui se produit. Les changements atrésiques dans les follicules tertiaires résulteraient de la formation de deux types morphologiques différents des follicules atrésiques : oblitératif et kystique. Dans l'atrésie oblitérative, les couches de la granulosa et de la thèque pourraient s'atrophier ou seule la couche de granulosa s'atrophie et la thèque se lutéinise, se fibrose ou se hyalinise autour de l'antrum. Dans les cas d'insuffisance hormonale, ce phénomène pourrait expliquer la persistance pathologique de kystes folliculaires ou lutéiniques (LAFOREST, 2005).

II-4- Le corps lutéal ou corps jaune :

Apres l'ovulation, cependant, le stratum est vascularisé par les vaisseaux de la thèque interne. Alors, les cellules de la granulosa s'élargissent, se luteinisent et forment la population des grosses cellules lutéales du corps jaune. Les cellules de la thèque contribuent à la population des petites cellules lutéales du corps jaune. La luteinisation est le processus par lequel les cellules de la granulosa et de la thèque se transforment en cellules lutéales. Ceci inclut l'hypertrophie et l'hyperplasie des deux types de cellules. Un pigment jaune, la lutéine, apparait dans les cellules lutéales chez la vache. Des mitoses post-ovulatoires continuent pendant 40 heures pour les grosses cellules lutéales de la granulosa, et pendant 80

heures pour les petites cellules lutéales de la thèque. L'augmentation de taille du corps jaune, après cette période d'activité mitotique, est principalement due à l'hypertrophie des grandes cellules. Les petites représentent une part mineure du corps jaune et occupent essentiellement les zones trabéculaires périphériques. Cependant, les deux types de cellules sont mélangés dans le corps jaune. Chez la vache, le corps jaune est totalement développé et vascularisé 9 jours après l'ovulation mais il continue à grossir jusqu'au 12ème jour où il atteint environ 25 mm (LAFOREST, 2005).

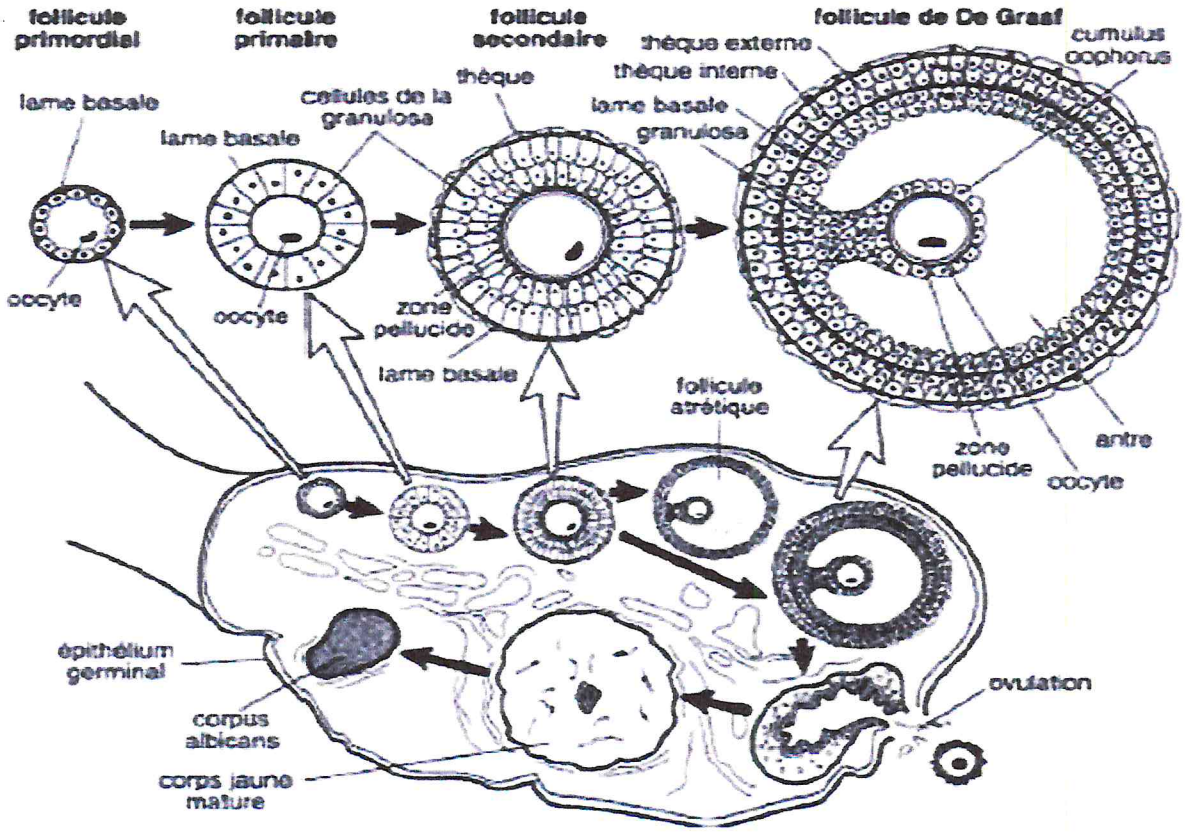


Figure 6: Schéma de l'ovaire (LAFOREST, 2005).

III-Variations hormonales au cours du cycle œstral :

Communément, on distingue deux parties pendant le cycle œstral de la vache : la phase folliculaire, dominée par les œstrogènes et la phase lutéale, dominée par la progestérone, mais avec des variations du taux d'œstrogènes en fonction de la progression des vagues folliculaires.

- **Folliculaire** : de courte durée, 3 jours, qui consiste en une croissance explosive et une

maturation du futur ovule qui va être libéré : elle est caractérisée par la production intense d'œstrogènes. Elle est initiée au moment du recrutement d'un pool de follicules par un pic de sécrétion de FSH et se termine au moment de l'ovulation (considéré comme le jour J0 du cycle) (ADAMS et al, 2008).

- **Lutéale**: dure 14 à 16 jours, dans les 5 à 6 jours suivant l'ovulation, les cellules de la granulosa se différencient en grandes cellules lutéales et celles de la thèque en petite cellules lutéales qui acquièrent la capacité de sécréter de la progestérone. Cette lutéinisation du follicule aboutit à la formation d'un corps jaune. La concentration plasmatique en progestérone augmente ainsi de moins de 1 ng/ml à 3 jours post ovulation (PO), à 3 ng/ml à 6 jours PO (ADAMS et al, 2008). Elle atteint un plateau entre 10 et 14 jours PO (>4 ng/ml). Vers le seizième jour du cycle, la libération de prostaglandine F2α ($PGF_{2\alpha}$) par l'endomètre de la vache non gestante provoque la hyalinisation des vaisseaux du corps jaune. Les cellules hypoxiques ne produisent plus de progestérone et la concentration chute : on parle de lutéolyse.

III-1- Les hormones hypophysaires :

Elles sont sécrétées par les cellules basophiles de l'hypophyse antérieure, ce sont des glycoprotéines de fort poids moléculaire (3 000 daltons).

Ce sont la FSH (follicule stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone).

III-1-1- LH :

La concentration plasmatique de LH est a un niveau bas dit "tonique" de l'ordre de 1 à 2 ng/ml alors qu'au moment de l'œstrus, 24 h approximativement avant l'ovulation, il y a une decharge cyclique intense (de 40 à 50 fois le taux basal) et de courte durée (6 heures) de LH. Les pics de LH sont peu fréquents pendant la phase lutéale. Leurs fréquences et amplitude augmentent fortement pour donner la décharge cyclique pré-ovulatoire pendant la phase folliculaire (DALICHAMPT, 1989).

III-1-2- FSH :

La cinétique de libération de FSH est analogue à celle de LH : niveau tonique puis décharge cyclique (de plus faible amplitude 3 à 5 fois) au moment de l'ovulation. Par ailleurs, les secrétions de FSH et surtout de LH ont la particularité d'être pulsatiles. Pour la FSH, le pic pré-ovulatoire correspond seulement à une augmentation d'amplitud (DALICHAMPT, 1989).

III-2- L'hormone hypothalamique :

L'hypothalamus contrôle la libération de LH et de FSH par l'intermédiaire de la gonadoliberine ou GnRH. L'hypothalamus possède deux régions fonctionnellement différentes : l'hypothalamus médian qui est le centre de la tonicité et l'hypothalamus antérieur, centre de la cyclicité, qui permet la décharge ovulatoire de LH. Il existe donc deux types de sécrétion de la gonadoliberine : une sécrétion tonique responsable de la sécrétion de base de FSH et de LH, et une sécrétion sous forme de pulses très fréquents à l'origine de la décharge cyclique ovulante de gonadotropines. Par ailleurs, l'hypothalamus en connexion avec le thalamus est en étroite relation avec le cortex cérébral et les organes des sens. Des stimuli nerveux tels que la lumière, la température extérieure, le stress et d'autres facteurs de l'environnement influencent l'activité sexuelle (BRUYAS, 1991).

III-3- Les hormones ovariennes :

III-3-1- Les œstrogènes :

Ils interviennent par un retro contrôle positif ou négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les œstrogènes exercent une rétroaction négative sur l'hypothalamus. En effet, suite a une ovariectomie complète, on constate une hypertrophie de certaines cellules de l'hypophyse antérieure secrétant de la LH et de la FSH ; parallèlement à cette hypertrophie il y a une augmentation du taux de GnRH. Ce phénomène existe au début de la croissance folliculaire. Un taux élevé d'œstrogènes permet une rétroaction positive sur l'hypophyse antérieure ou sur l'hypothalamus avant l'ovulation, ce qui induit la décharge ovulante de LH. Ce phénomène a lieu en fin de croissance folliculaire (HUMBLOT et GRIMARD, 1996).

III-3-2- La progestérone :

Secrétée par le corps jaune, elle exerce une rétroaction négative tant sur l'hypothalamus que sur l'hypophyse, ce qui entraine une diminution du taux de LH, interdisant ainsi l'ovulation (HUMBLOT et GRIMARD, 1996).

III-3-3- Les prostaglandines :

Molécules polyinsaturées, ce sont des dérives de l'acide arachidonique. Elles sont sécrétées au niveau de l'appareil génital femelle et retrouvées au niveau de l'ovaire et de la paroi utérine. La $PGF_2\alpha$ est synthétisée par l'utérus a la fin de la phase lutéale et passe par l'artère utérine qui a des rapports étroits avec l'artère ovarienne (HUMBLOT et GRIMARD, 1996).

CHAPITRE II

PRODUCTION ET TRANSFERE DES EMBRYONS

Introduction :

L'augmentation du potentiel reproducteur de la femelle peut passer par des techniques fondées sur la superovulation et le transfert embryonnaire. Avec cette technique, une vache donneuse produit plusieurs embryons qui peuvent être transplantés chez plusieurs receveuses. De plus, les embryons récoltés sont facilement congelables, ce qui autorise une meilleure diffusion ou bien une utilisation plusieurs mois, voire plusieurs années plus tard. Le nombre moyen d'embryons transférables se situe entre 5 et 7 par femelle selon les auteurs. En France en 2000, sur 6716 femelles collectées par 35 équipes, le nombre total d'embryons collectés était de 62538, soit 9,3 embryons totaux par collecte, et le nombre d'embryons transférables collectés était de 36263, soit 5,4 embryons transférables par collecte Les taux de gestation sur transfert d'embryons frais (58%) ou congelés (60%) étant proches de ceux obtenus par insémination artificielle, on peut donc obtenir par cette technique plus d'un veau par vache collectée et par an (de l'ordre de 2 à 3 par collecte). (UNCEIA ,2000).

I- Choix de la donneuse :

Habituellement, l'éleveur choisit une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse. Il convient d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité. De même, il s'avère indispensable d'identifier la présence éventuelle de lésions du tractus génital. L'animal superovulé aura autant que faire se peut accoucher normalement, n'aira pas présenté de complications puerpérales ou du post partum tells qu'une rétention placentaire, une infection utérine, une fièvre vitulaire ou de l'acétonémie. Il aura accouché depuis 60 voire 90 jours au moins et sera en phase de bilan énergétique positif. Il aura manifesté deux ou trois chaleurs à intervalles réguliers. A l'exploitation manuelle, le col et les cornes utérines seront de diamètre normal (<5cm). Un corps jaune sera présent sur l'ovaire. L'examen vaginal au moyen d'un spéculum éliminera la possibilité d'une infection utérine ou d'un urovagin. Certains examens complémentaires (tests de perméabilité tubaire, examen échographique) seront le cas échéant effectués. Les traitements antiparasitaires et vaccinations auront été effectués 30 jours au moins avant le traitement de superovulation (HANZEN 2009).

II- Influence de la stimulation hormonale :

Dans la reproduction assistée, l'objectif de stimulation ovarienne est d'augmenter le nombre de follicules antraux donc augmenter le nombre d'·ovocytes de haute qualité et le taux de blastocytes transférables. Plusieurs protocoles de stimulation multi-folliculaire ont été développés, cependant le taux de récolte d'un nombre maximum d'ovocytes pour fécondation de chacun de ces protocoles demeure controversé. Plusieurs protocoles de stimulation ovarienne ont été rapportés. Ils ont utilisé notamment le PMSG et le HCG. Suite à une stimulation optimale à base de FSH, plus de 75 % des ovocytes immatures deviennent des blastocytes suite à la production *in vitro* en comparant avec le taux de 40 % de blastocytes en production in vitro sans traitement in vivo (BLONDIN et al, 2002).

III- Traitement de superovulation :

III-1- Traitement par FSH :

Lors du traitement avec FSH, les meilleurs résultats sont obtenus, pour une dose totale de 32 à 40 mg chez la vache et de 28 mg chez la génisse, en doses décroissantes, en 2 injections par jour pendant 4 jours (NIBART, 1991).

Une injection unique de FSH semble aussi pouvoir être pratiquée. Ainsi, en superovulant des vaches par une unique injection sous-cutanée de FSH (Folltropin®, Vetrepharm). Entre J8 et J10 du cycle œstral (BOG et al, 1994) .Ou bien sur cycle induit par œstrogènes et progestagènes ou après ponction du follicule dominant (BERGFELT et al, 1997).

Concernant la dose , ESTRADA et al (1998) ont évalué la réponse d'élevages adaptés aux conditions tropicales, suite à des traitements de superovulation constitués de 2 doses différentes de Folltropin®, 24 et 36 mg par vache. Ils ont enregistré des différences significatives entre les élevages pour le nombre d'embryons transférables, mais la dose de FSH (24 contre 36 mg) n'influençait pas de façon significative la réponse. Au contraire, YAAKUB et al (1998) ont observé une augmentation linéaire de la réponse (nombre de corps jaunes et d'embryons/ovocytes non fécondés) avec l'augmentation des doses de FSH-p (400, 600 ou 800 UI). Cependant, le nombre d'embryons transférables n'était pas différent entre 600 et 800 UI.

Tableau 01 : Effet du rapport FSH/LH sur la production d'embryons (LUCAS-HAHN et NIEMANN, 1991).

Résultats Par Donneuse	**FSH purifiée +40% LH (0,423 UI)**	**FSH purifiée + 20% LH (0,069 UI)**	**FSH commerce (80% LH ou 8,5 UI)**	**p**
Nombre moyen de corps jaunes	12,6 ± 1,1	10,1 ± 0,9	9,0 ± 0,9	<0,05
Nombre moyen d'ovocytes fécondés	5,1 ± 1,3	2,6 ± 0,6	2,7 ± 0,5	<0,05
Nombre moyen d'embryons transférables	3,4 ± 0,6	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,5	>0,05

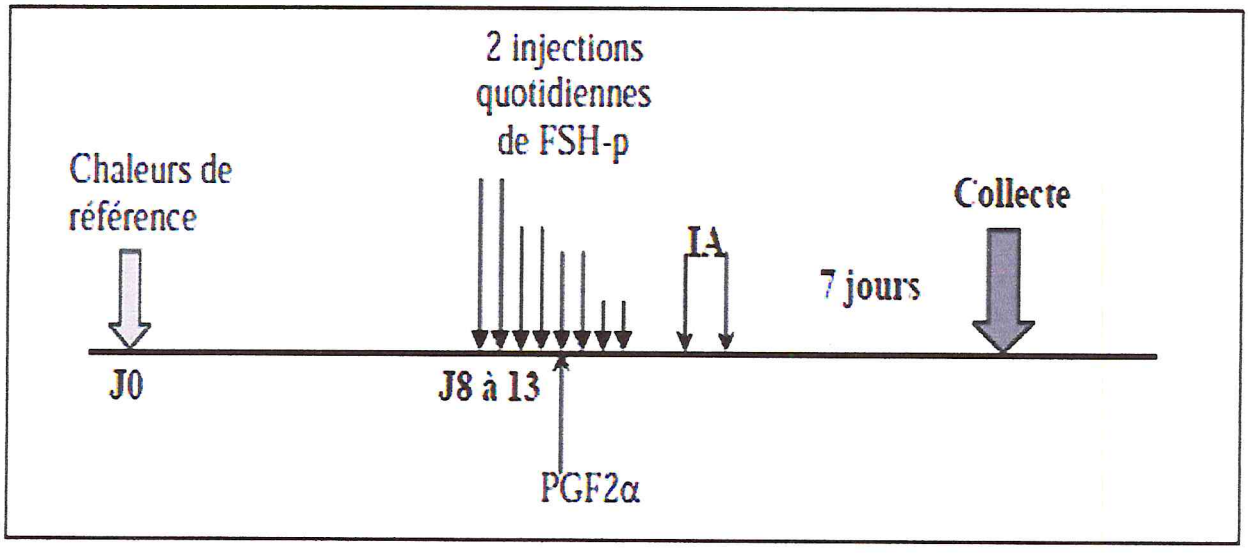


Figure 07: Schéma de traitement de superovulation par FSH (NIBART, 1991).

III-2- Traitement par PMSG :

Afin de limiter les effets négatifs de la longue demi-vie de la PMSG, l'utilisation d'anticorps anti-PMSG après le pic de LH a été proposée. En effet, sans anticorps anti-PMSG, une seconde vague de croissance folliculaire démarre après l'ovulation, ce qui entraîne des concentrations en oestradiol dans le sang élevées au moment du développement embryonnaire, ce qui est néfaste pour l'embryon.(DIELEMAN et BEVERS, 1987). Les résultats en termes de nombre d'ovulations et du nombre d'embryons transférables seraient alors améliorés par l'injection d'anticorps anti-PMSG juste après le pic pré-ovulatoire de LH. Globalement, lors d'utilisation de PMSG, l'emploi d'anti-PMSG 48 à 60 h après l'injection de prostaglandines permettrait d'améliorer la réponse.

(DIELMAN et al, 1989) ; (HAHN, 1992).

L'administration d'anticorps anti-PMSG provoquerait indirectement l'atrésie des follicules non ovulés de diamètre supérieur à 10 mm avec une chute concomitante d'œstradiol. Par contre, l'injection trop précoce de l'anticorps inhibe complètement la superovulation. Le nombre de corps jaunes présents le jour de la collecte ne semble pas influencer par l'injection d'anticorps 6 ou 18 heures après le pic de LH. Cependant, la qualité des embryons lors d'utilisation d'anticorps anti-PMSG 18 heures après le pic de LH serait supérieure à celle des embryons collectés après utilisation de PMSG seule. La meilleure période pour l'injection d'anticorps anti-PMSG semble être 18 heures après le pic de LH.

(BEVERS et al, 1993).

L'utilisation d'anticorps anti-PMSG permettrait également de réduire l'incidence des kystes et de follicules pré-ovulatoires n'ayant pas ovulés le jour de l'ovulation. **(DIELEMAN et al, 1989) ; (ALFURAIJI et al, 1990) ; (BEVERS et al, 1993).**

D'autres auteurs n'ont pas trouvé d'effet de l'emploi d'anticorps anti-PMSG au moment de l'insémination. **ZEITOUN et al (1988)** n'ont constaté qu'une augmentation du nombre de corps jaunes le jour de la collecte. Enfin, (**ALFFURAIJI et al ,1990)** ; **(ZEITOUN et al, 1991)** et **(BEVERS et al ,1993)** n'ont pas trouvé d'effet de l'administration d'anti-PMSG que ce soit sur le nombre d'embryons totaux ou transférables.

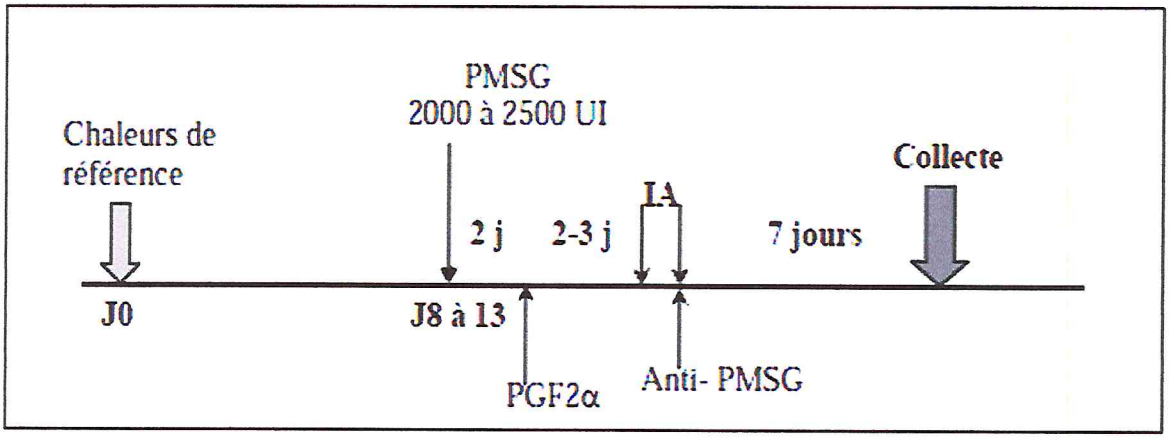


Figure 08: Schéma de traitement de superovulation par PMSG (en phase lutéale d'un cycle naturel). **(NIBART, 1991).**

IV- Conséquence d'un traitement de superovulation :

La réponse variable (0 à 40 ovulations) et peu prédictible des animaux à un traitement de superovulation constitue encore à l'heure actuelle un des facteurs limitant de la méthode. Une récolte sur 3 ne produit aucun embryon transférable et 70% des embryons transférés proviennent de 30% des récoltes réalisées. Semblables résultats ont été observés chez la vache laitière. Selon certains auteurs, 70% de la variation des réponses observées peuvent être imputées à des facteurs intrinsèques liés au statut ovarien de l'animal ou à la nature et au rythme d'injection des substances utilisées. Les causes peuvent en être trouvées d'une part dans les effets du traitement de superovulation sur la croissance folliculaire ou d'autre part, dans la manque de synchronisme entre le début du traitement de superovulation et le statut ovarien susceptible d'interfère avec un recrutement folliculaire optimal. **(THIBIER et NIBART ,1995).**

V- La collecte des embryons :

Après fécondation, les embryons sont collectés dans l'utérus, après leur sortie de l'oviducte (J4-J5). Pour des raisons sanitaires et de fragilité, la réglementation internationale impose de collecter les embryons encore inclus dans leur zone pellucide donc avant l'éclosion qui a lieu à J9). La collecte est donc réalisée entre J6 et J8 après IA et presque toujours à J7. **(NIBART, 1991).**

La collecte des embryons est réalisée par voie cervicale au 7ème jour du cycle suivant les chaleurs de polyovulation. Une technique chirurgicale est possible mais n'est pas utilisée en France chez les bovins. **(NIBART, 1991).**

Le matériel utilisé est le suivant :

- un dilatateur de col.
- une sonde de récolte (sonde à 3 voies, I.M.V.., L'Aigle, France) avec chemise sanitaire.
- deux récipients en verre contenant le milieu de collecte avant et après la récolte.
- une enceinte thermostatée à 20-25°C contenant les deux récipients.

Tout le matériel non jetable est d'abord lavé avec un détergent non toxique, rincé dans de l'eau distillée, séché et enveloppé pour la stérilisation.

Le milieu de collecte et de conservation des embryons est un milieu tamponné au phosphate de sodium (milieu PBS (Phosphate Buffered Saline) ; pH = 7,2 ; pression osmotique = 290 milli-Osmoles ; I.M.V., L'Aigle, France).

La donneuse d'embryons est systématiquement placée dans une cage de contention surélevée dans sa partie antérieure et reçoit une injection épidurale basse d'un anesthésique local (6 à 10 ml de xeloucaine ; Vétoquinol, Lure, France). Le rectum est vidé de son contenu et la région vulvaire est soigneusement lavée, désinfectée et essuyée.

La collecte consiste en un rinçage des cornes utérines avec le milieu de collecte. Une fois le col passé, l'extrémité de la sonde est placée dans la corne correspondant à l'ovaire qui a le mieux répondu au traitement (détermination par palpation transrectale avant la collecte), à la jonction entre le premier et le deuxième tiers de la corne. Le ballonnet situé à l'extrémité de la sonde rigide est alors gonflé : il permet de fixer la sonde dans la corne et évite le reflux du liquide de collecte. La sonde souple est progressivement dépliée jusqu'au fond de la corne et le rinçage commence. Après avoir injecté, en plusieurs fois, 350 à 400 ml de PBS préalablement placé dans l'enceinte thermostatée, la sonde souple est progressivement retirée, le ballonnet est dégonflé et la même opération est réalisée dans l'autre corne.

(NIBART, 1991).

V-1- Examen des embryons :

La recherche et l'examen des embryons dans le liquide de récolte doivent être effectués dans de bonnes conditions sanitaires, avec du matériel stérilisé et à température constante (20-25°C). Après décantation du liquide de récolte ou bien après filtration, le décantât (ou filtrat) est examiné à la loupe binoculaire.

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons sont exclusivement morphologiques. A J6, l'embryon est au stade morula compactée, à J7 au stade blastocyste.

La sortie de la zone pellucide se fait à J9. Les ovulations n'étant pas toutes synchrones, plusieurs stades embryonnaires peuvent être observés au cours d'une même récolte.

L'observation de l'intégrité de la zone pellucide, la taille et l'homogénéité de la masse cellulaire incluse dans celle-ci, la formation du blastocœle, du bouton embryonnaire et du trophoblaste permet de juger de la viabilité de l'embryon. Tous ces critères figurent dans la blastographie publiée par l'**INRA-UNCEIA (1990).**

V-2- Identification du stade :

La morphologie générale des embryons bovins est la suivante : diamètre compris entre 150 et 190 µm dont une zone pellucide de 12 à 15 µm. Ce diamètre reste constant du stade zygote au stade du blastocyste épanoui. On donne l'âge de l'embryons en fonction du nombre de cellules qui le composent jusqu'au stade 16 cellules. Ensuite, le comptage des cellules devient plus difficile et d'autres critères morphologiques sont nécessaires. On distingue les stades suivants selon **(SAHA et al, 1983).** (L'âge est donné en prenant pour repère l'oestrus comme jour zéro) :

- Le stade morula (5 jours) où les blastomères sont difficilement identifiables. La masse des cellules occupe tout l'espace périvitellin.
- Le stade morula compacte (6 jours) où des blastomères ont fusionné, formant une masse compacte. L'embryon n'occupe plus que 60 à 70% de l'espace périvitellin.
- Le stade jeune blastocyste (7 jours) où une cavité commence à se former. Il est possible de voir une différence entre les cellules de la masse cellulaire interne et les cellules trophoblastiques (à l'extérieur).
- Le stade blastocyste (7 jours) avec une nette différence entre les cellules du trophoblaste et les cellules de la masse cellulaire interne, plus sombres. L'embryon occupe la presque totalité de l'espace périvitellin.
- Le stade blastocyste épanoui (8 jours) où le diamètre total de l'embryon augmente beaucoup (de 20 à 50 %) avec un amincissement de la zone pellucide jusqu'à un tiers de son épaisseur initiale. Les embryons récoltés à ce stade sont en général aplatis à cause d'une disparition du blastocoele.
- Le stade blastocyste éclos (9 jours) : l'embryon quitte ou a quitté sa zone pellucide. Il peut être plus difficile à reconnaître lors d'une collecte.

Une récolte à un jour donné ne contient pas toujours que des embryons du même stade, il existe une certaine variabilité : six jours après les chaleurs, ce sont surtout des embryons au stade morula qui sont récoltés, mais il peut arriver que des blastocystes soient également récoltés à ce stade. **(SAHA et al, 1983).**

V-3- Evaluation de la qualité des embryons :

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'IETS donne une définition précise de quatre qualités différentes. **(ROBERTSON et NELSON, 1994).**

Les embryons sont observés au grossissement 200 pour évaluer leur qualité. On distingue quatre classes de qualité embryonnaire :

- **Excellent (qualité 1) :** Embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique avec des cellules de couleur et texture comparable, blastomères polygonaux au stade morula
- **Bon (qualité 1) :** Embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace périvitéllin.
- **Moyen (qualité 2) :** Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours où présentant des défauts précis tels que des cellules échappées dans l'espace périvitellin, des blastomères de taille variable, quelques cellules dégénérées, et quelques vésicules et un aspect plus claire ou plus sombre que normal.
- **Médiocre (qualité 3):** Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes et des vésicules grosses et nombreuses, mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparait normal.
- **Mort ou dégénéré (qualité 4)** : Arrêt de développement à un stade précoce avec des cellules dégénérées. **(INRA-UNCEIA, 1990).**

VI- Les facteurs influencent sur la production d'embryons :

VI-1- Influence de la donneuse d'embryons :

VI-1-1- Facteurs génétiques :

- La race :

Dans une étude rétrospective portant sur 1596 collectes. Le nombre total d'embryons collectés varie significativement entre 6,0 et 16,2 selon la race, le nombre d'embryons

transférables de 2,8 à 6,6, le pourcentage d'embryons transférables de 35% à 68% et le taux de gestation par collecte de 37% à 75%. **(DONALDSON, 1984).**

VI-1-2- Facteurs physiologiques :

- L'âge et la parité :

Les différentes études relatives à l'effet de l'âge de la donneuse sur la production d'embryons mettent en évidence deux tendances d'intérêt majeur. Tout d'abord, la production d'embryons est supérieure chez les vaches par rapport aux génisses. **(HASLER et al, 1981) ;(DETTERER et al, 1997) ; (MENARD et MARTINEZ, 1997).**
Les vaches produiraient en moyenne 1 à 2,5 embryons transférables de plus que les génisses. Cependant, après avoir atteint un pic pendant la 2ème lactation, le nombre d'embryons transférables par collecte diminue de façon significative ($p<0,05$) lorsque la parité augmente. On observe donc une baisse du nombre d'embryons transférables par collecte à partir de la 3ème lactation. **(GOVIGNON et al, 2000).**
Dans cette étude, le nombre moyen d'embryons transférables par collecte pour les génisses, les vaches en première lactation, en deuxième lactation et à 3 lactations ou plus était respectivement égal à 4,77. 5,33. 5,62 et 4,00. Le nombre moyen d'embryons transférables par collecte diminue à partir de l'âge de 7 ans (soit à partir de la 5ème lactation). **(HASLER et al, 1981).**
Concernant l'effet de l'âge des génisses à la première collecte, le pourcentage d'embryons viables est inférieur pour les génisses de moins de 16 mois à celui obtenu chez les génisses de plus de 16 mois (respectivement 39 % versus 78 %, $p<0,001$) ; le pourcentage de femelles collectées après traitement est également inférieur pour les génisses de moins de 16 mois (respectivement 51 % versus 84 %, $p<0,01$) ; les auteurs concluent que plutôt que l'âge lui-même, il semblerait que ce soit l'âge à la puberté en relation avec l'alimentation et le nombre de cycles sexuels avant la superovulation qui soient importants **(NIBART, 1992).**

- La lactation et le niveau de production laitière :

Les conclusions des différentes études concernant l'effet de la lactation sur la production d'embryons sont contradictoires. Pour **DARROW et al (1982),** le nombre d'embryons transférables est significativement supérieur chez les vaches en lactation par rapport aux vaches taries (4,0 versus 2,8 ; $p<0,01$) ; ils observent aussi une diminution progressive du nombre d'embryons transférables avec l'avancement de la lactation. A l'opposé. Pour **DE RUIGH et al (1995),** les vaches en lactation produisent moins

d'embryons viables que les vaches taries ($p<0,01$). Concernant le niveau de production laitière, alors que pour **HASLER et al (1983)** la production journalière et le stade de lactation n'influencent pas la réponse aux traitements de superovulation. **MANCIAUX et al (2000)** ont montré que le niveau de production laitière influence de façon significative le nombre d'embryons transférables, le nombre d'embryons de qualité 1 et le nombre d'ovocytes non fécondés.

- L'intervalle vêlage – collecte :

Pour **HASLER et al (1983),** le taux de fécondation est significativement plus élevé 151 à 300 jours après vêlage (71 %) par rapport aux vaches à moins de 150 jours (65 %) ou à plus de 300 jours (66 %). Plus récemment. **PEREZ et al (2001)** ont montré que des vaches allaitantes traitées avec de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) durant les 20 premiers jours post-partum produisaient en moyenne 19,4 follicules contre seulement 1,1 follicules dans le groupe témoin et donc que les premiers jours du post-partum n'étaient pas incompatibles avec une stimulation ovarienne.

VI-1-3- Facteurs sanitaires :

- Infertilité et production d'embryons :

Dans une étude portant sur 984 collectes en race Prim'Holstein, ont comparé les résultats de collectes de vaches «en bonne santé » (n = 666) par rapport à des vaches «infertiles » (vaches présentant un kyste ovarien, des adhérences de l'appareil reproducteur, une infection utérine ou des vaches infertiles à chaleurs normales (n = 318). Les donneuses «en bonne santé » ont produit plus d'embryons viables que celles classées comme infertiles (6,4 versus 2,4 ; $p<0,05$), leur taux de fécondation était également plus élevé (66 % versus 42 % ; $p<0,05$) ; 51 % des donneuses infertiles n'ont produit aucun embryon contre seulement 14 % des donneuses en bonne santé ($p<0,05$). Enfin, au cours des 2 premières années de cette étude, 18,8 % des donneuses dites infertiles n'ont montré aucun signe d'oestrus après traitement et n'ont donc pas été inséminées, contre seulement 5,5 % des donneuses classées en bonne santé (**HASLER et al, 1983).**

- Influence d'une infection par le virus BVD :

L'inoculation par voie intranasale, d'une souche non cytopathogène du virus BVD, 9 jours avant l'insémination, à des génisses superovulées de race Prim'Holstein, affecte la maturation folliculaire et le processus de l'ovulation, ce qui a pour conséquence une *diminution* significative du nombre et de la qualité des embryons produits **(KAFI et al, 1997).**

VI-2- Influence du mâle :

VI-2-1- Effet direct du taureau :

Plusieurs études ont mis en évidence un effet significatif du taureau utilisé sur la qualité des embryons : **PONSART et al (2001), GOVIGNON et al (2000), HUPKA et al (2000), MANCIAUX et al (1997) et DE RUIGH et al (1995).**

Pour **GOVIGNON et al (2000),** le nombre moyen d'embryons de qualité 1 par collecte varie entre 1,1 et 3,7 ($p<0,05$) en fonction du taureau utilisé. Pour **HUPKA et al (2000),** le taureau utilisé influence significativement la qualité des embryons ($p<0,01$) mais la fertilité du taureau en ferme ne serait pas corrélée à sa fertilité dans les programmes de transfert embryonnaire. A l'opposé, **AURICH et HAHN (1993)** font un parallèle entre le taux de non retour en chaleur après insémination pour un taureau donné et le nombre d'embryons transférables obtenus par traitement de superovulation pour ce même taureau.

VI-2-2- Effet du protocole d'insémination :

Plusieurs protocoles d'insémination ont été comparés pour optimiser la production d'embryons. Ils différent selon :

Le nombre d'inséminations : 1 insémination versus 2 inséminations **(LACAZE et al, 1991 ; SLIMANE et al, 1995 ; HUPKA et al, 2000),**

Le moment des inséminations par rapport au début des chaleurs et par rapport au pic de Luteinizing Hormone (LH) **(SLIMANE et al, 1995),**

Le nombre de taureaux utilisés : 2 inséminations avec le même taureau versus 2 inséminations avec 2 taureaux différents **(HUPKA et al, 2000),**

Le type de semence : fraîche versus congelée **(GOULDING et al, 1994). SLIMANE et al (1995)** ont ainsi montré que Le nombre total d'embryons et le nombre d'embryons viables sont significativement supérieurs dans un protocole avec 2 inséminations par rapport à celui ne prévoyant qu'une seule insémination, Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la première insémination est pratiquée plus de 6 heures après le pic de LH. Les autres études n'ont pas mis en évidence d'effet significatif du protocole d'insémination sur la production d'embryons.

VI-3- Influence du traitement :

VI-3-1- Les hormones utilisables :

A l'heure actuelle, deux hormones gonadotropes sont utilisables pour les traitements de superovulation : l'une d'origine chorionique, la PMSG également appelée eCG, l'autre d'origine hypophysaire, la FSH.

➢ **Association PMSG/anti-PMSG :**

La très longue demi-vie de la PMSG (environ 120 heures) explique sa facilité d'emploi (une seule injection suffit) ; mais elle entraîne aussi des effets défavorables : la croissance folliculaire persiste après le pic de LH entraînant une sécrétion élevée d'œstradiol qui modifie l'environnement utérin et par-là même le développement embryonnaire précoce. L'utilisation d'anticorps anti-PMSG a donc été proposée afin de limiter les effets défavorables de la PMSG **(BOLAND et al, 1991).**

➢ **Influence du rapport FSH/LH des préparations commerciales :**

De nombreux auteurs rapportent que les variations du rapport FSH/LH des différentes préparations de gonadotropines sont une cause importante de la grande variabilité de la réponse ovarienne suite à une stimulation. Les préparations de FSH contenant une grande quantité de LH conduisent à une réponse ovarienne faible (sans doute du fait d'un dérèglement dans la maturation ovocytaire et dans l'équilibre endocrinien) ; cependant, il existe un certain seuil de LH en dessous duquel il ne faut pas descendre sous peine de ne pas obtenir d'ovulation : les préparations de FSH hautement purifiées induisent significativement moins d'ovulations que les préparations complémentées en LH. **LUCAS-HAHN et NIEMANN (1991),** ont alors évalué la réponse à une stimulation chez des vaches laitières avec de la FSH purifiée plus ou moins complémentée en LH et l'ont comparée à celle obtenue avec une préparation commerciale fortement contaminée par la LH. Les résultats montrent que la solution à 40 % de LH produit plus de corps jaunes et d'ovocytes fécondés, mais aussi plus d'embryons dégénérés, que la solution à 20 % de LH et la solution commerciale.

VI-3-2- Le protocole :

➢ **Rythme d'injection :**

Du fait de la courte demi-vie de la FSH, les protocoles classiques de superovulation nécessitent de nombreuses injections. Actuellement, il semblerait que les meilleurs résultats soient obtenus lorsque la FSH est injectée 2 fois par jour pendant 4 jours avec des doses décroissantes. Cependant, de nombreuses études ont pour but de tester l'efficacité de protocoles plus simples limitant le nombre d'injections et par la même le stress occasionné lors de la manipulation des animaux, ainsi que le travail des éleveurs.

➢ **Site d'injection :**

La réponse ovulatoire et le pourcentage de vaches présentant un œstrus ont été significativement plus élevés ($p<0,05$) chez les vaches Holstein ayant reçu une dose de 400 mg de FSH porcine (Folltropine ND) diluée dans 20 ml de solution saline en une seule injection par voie SC derrière l'épaule ($n = 17$) par rapport à celles ayant reçu la même dose par voie SC dans la région du cou ($n = 17$). Cependant, cette étude ne tient pas compte de l'état d'engraissement des vaches, en effet, nous avons vu précédemment que lorsque les vaches sont maigres, une injection de 400 mg de FSH porcine (Folltropine ND) par voie SC dans le cou est moins efficace que la même dose injectée par voie SC en arrière de l'épaule **(HOCKLEY et al, 1992)**.

➢ **Cycle naturel ou maîtrisé :**

L'intérêt de la combinaison d'un implant ou d'une spirale vaginale de progestagènes à un traitement de superovulation (par de la FSH ou de la PMSG) est la possibilité d'initier le traitement à n'importe quel moment du cycle ovarien et donc de s'affranchir d'une surveillance des chaleurs **(ALMEIDA, 1987)**. Cependant, bien que cette combinaison présente un aspect pratique, elle ne permet pas toujours d'obtenir une production maximale d'embryons **(ALBERIO et al, 1994)**.

VI-3-3- Influence de la répétition des traitements :

En général, la répétition des traitements se traduit par une diminution de la production d'embryons. L'augmentation du rang de collecte a pour effet une baisse significative ($p<0,05$) du nombre d'embryons transférables **(DE RUIGH et al, 1995 ; GOVIGNON et al, 2000 ; PONSART et al, 2001)**. **HUPKA et al (2000)** constatent une augmentation

significative du nombre d'ovocytes non fécondés (p=0,0035) et du nombre d'embryons dégénérés (p=0,004). Par contre, pour **GOVIGNON et al (2000)**, la répétition des collectes n'a pas d'effet sur le nombre d'embryons dégénérés et l'augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés n'est significative (p<0,05) qu'à partir de la 4ème collecte. L'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer la diminution de la réponse ovarienne associée à la répétition des traitements est celle d'une auto-immunisation contre les hormones de stimulation ovarienne, PMSG et FSH (**DONALDSON et PERRY, 1983 ; NIBART, 1991).** A l'heure actuelle, il n'y a pas de données disponibles concernant l'existence d'anticorps anti-FSH. Par contre, l'existence d'anticorps anti-PMSG, chez les bovins, a récemment été confirmée par **DRION et al (2001).**

VI-3-4- Influence du jour du cycle auquel débute le traitement :

Le jour du cycle œstral auquel débute le traitement de superovulation est responsable de grandes variations dans les résultats de collecte d'embryons. **LINDSELL et al (1986)** ont obtenu de meilleurs résultats pour le nombre d'embryons collectés et une tendance pour le nombre d'embryons transférables en commençant le traitement à j9 (n = 10) par rapport à j3 (n = 11), j6 (n = 11) et j12 (n = 10). De façon similaire, **GOULDING et al (1990)** observent une réponse ovarienne significativement plus faible quand le traitement est commencé le deuxième jour du cycle par rapport au dixième jour du cycle. Cependant, **DONALDSON (1984b) et HASLER et al (1983)** qui ont étudié de façon plus précise la seconde moitié du cycle (j8 à j13) n'ont pas réussi à mettre en évidence des différences significatives de production entre ces différents jours. Ces résultats sont donc contradictoires ; cette approche ne permet pas de déterminer avec précision le moment idéal pour débuter le traitement. Ce n'est pas le jour du début du traitement pendant le cycle qui influence les résultats mais la population folliculaire et notamment la présence ou l'absence de gros follicules au moment de l'initiation du traitement de superovulation **(SAUMANDE, 1995).**

VII- La congélation des embryons :

Aujourd'hui grâce aux énormes progrès réalisés la cryoconservation des embryons fait partir des biotechnologies de pointe. Les avantages économiques, sanitaires et génétiques apporte par cette technique sont très important pour les éleveurs et les sélectionneurs.

Les premiers conservations par le froids datant des années 70 **(WHITTINGHAM et al, 1972** chez la souris ; **WILMUT et ROWSON, 1973** chez la vache). Un refroidissement lente (0,2°

C/min) en présence de DMSO (Diméthylsulfoxide), comme cryoprotecteurs utilise, avant stockage des embryons dans l'azote liquide (- 196°C). Dans les années 80 se développe une nouvelle technique de cryoconcervation, la vitrification, qui consiste à plongé tres vite les embryons dans l'azote liquide **(RALL et FAHY, 1985, SCHEFFEN et al, 1986).** A présent, une multitude de protocoles sont réalisés, allant de la congélation lente, à la vitrification traditionnelle ou ultra rapide, avec différents cryoprotecteurs organique pénétrant dans les cellules ou non. Tout ces cryoprotecteurs ont un 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. 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 principe de la congélation :

La congélation se fait au cours d'une descente en température jusqu'à un point où il y a transformation de l'eau libre en cristaux de glace. Pour les cellules embryonnaires, cette réaction exothermique se fait à une température dite de surfusion, inférieure à celle du point de congélation de l'eau pure. Les cristaux se forment de façon extracellulaire dans un premier temps (FAHY, 1995). La membrane cellulaire empêcherait la croissance des cristaux extracellulaires dans la cellule (MAZUR, 1970). La pression de vapeur étant plus élevée à l'intérieur (eau en surfusion toujours liquide par rapport au milieu extracellulaire), les cellules 23 s'équilibrent en se déshydratant progressivement. Mais si la diminution de température est trop rapide, cette équilibration des pressions se fait par formation de cristaux de glace intracellulaires (MAZUR, 1970). Ces cristaux cellulaires engendrent des dommages mécaniques
au niveau de la membrane plasmique (SEIDEL, 1996).

LA PARTIE

EXPERIMENTALE

I- Introduction :

Chez la vache, la réponse au traitement de superovulation est très variable. Il est en effet possible d'obtenir de 0 à 50 embryons **(KAFI et Mc.GOWAN, 1997)**. En 1999, les équipes de transplantation agrées ont réalisé en France 7336 collectes afin de récolter 9,3 embryons par collecte dont 5,5 sont transférables **(PONSART, 2000)**. Mais pour ces deux paramètres, la variabilité est comprise entre 50 et 60 % **(NIBART et HUMBLOT, 1997)**. De plus, les résultats ne sont que peu évolués depuis 10 ans **(PONSART, 2000)**.

II- Objectif :

L'objectif de notre travail est de maitriser les différentes étapes de la production d'embryons dans l'espèce bovine, en utilisant des extraits hypophysaires dans un protocole classique de superovulation ainsi que la technique de transfert en frais.

III- Matériel :

III-1- Animaux :

- **Le choix des donneuses :**

L'étude a été effectuée dans la ferme de Mr. EZZRAIMI MOHAMED qui se situe dans la cité SIDI YAHIA, CHIFFA, wilaya de BLIDA, elle regroupe 100 vaches laitières en lactation, 50 en tarissement, 60 génisses et 20 vêles. Le travail s'est déroulé durant la période allant d'octobre 2008 à janvier 2010

Le cheptel expérimental est composé de 04 vaches laitières de race Holstein, une pie rouge et 3 pies noirs, leurs notes corporelles varient entre 3 et 3,5. Elles sont âgées de 5 ans, deux sont en $2^{ème}$ lactation et les deux autres sont vides après la $2^{éme}$ lactation (femelles sèches).

Les vaches ont été choisies sur la base de critères sanitaires (intégrité de l'appareille génital, absence de pathologies) et zootechniques (âge, numéro de lactation, note d'état corporelle, intervalle post partum)

Au cours de notre étude, les vaches en lactation sont nourries de fourrage vert composé de trèfle en hiver et de sorgho en été, de concentré (produit au niveau de l'exploitation) à raison de 10 kg /jour/animal et du foin. Les vaches en fin de lactation sont nourries de la paille et du son de blé, l'eau et le fourrage sont a volonté. Toutes les vaches sont en stabulation entravée en hiver et en stabulation libre le reste de l'année.

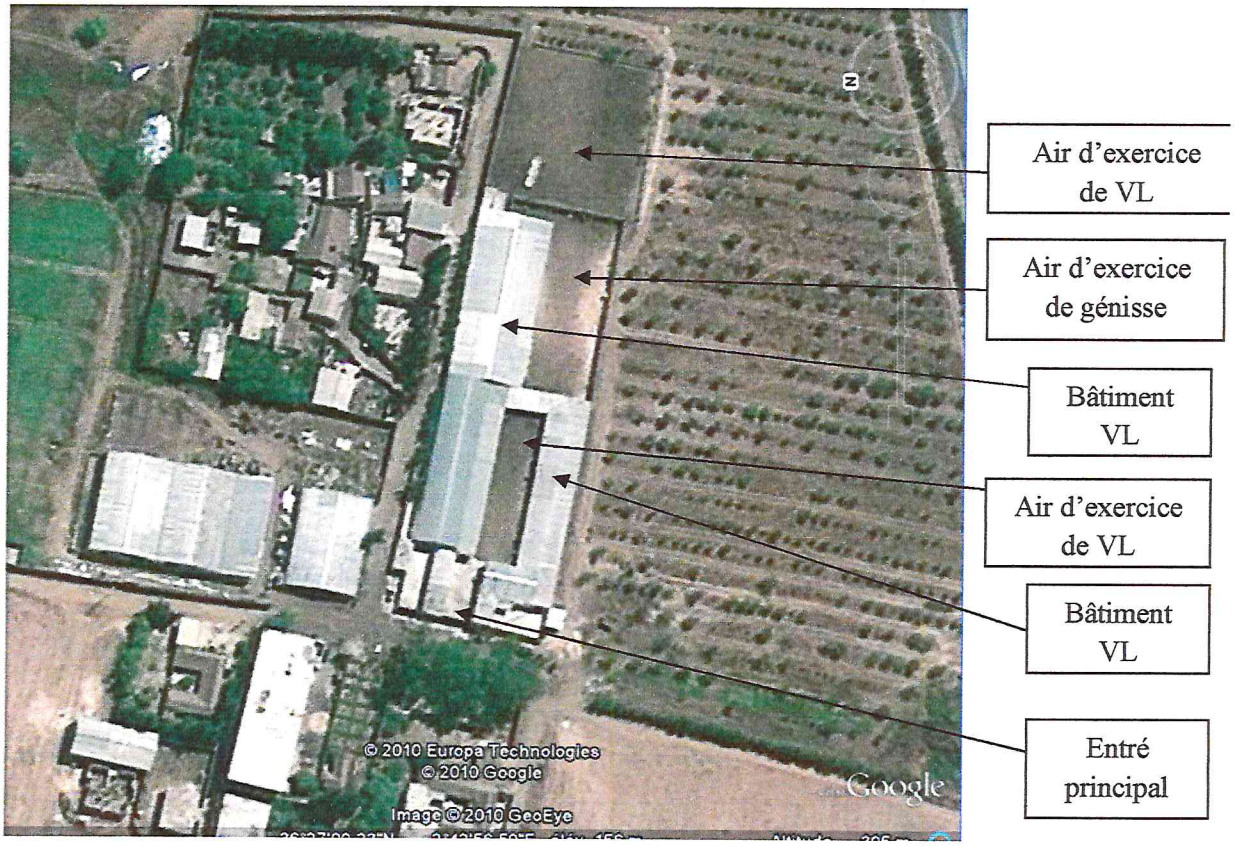


Photo 1 : Vue général de l'exploitation.

❖ **Le choix des receveuses :**

Les receveuses sont représentés par 3 génisses âgées de 15mois et 3 vaches laitières en 3ème lactation de race Holstein dont les chaleurs correspondent à celle de superovulation des donneuses et sont indemnes de tous problèmes gynécologiques.

III-2- Extrait hypophysaire et traitement :

La solution utilisée est le Stimulfol (ND) produite par l'équipe du **Pr. BECKERS** de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de LIEGE (BELGIQUE).

Cette solution comporte deux gonadotrophines purifiées à partir de l'hypophyse porcine, la FSH et la LH avec un rapport FSH/LH 40% qui est le plus adéquat pour le traitement de superovulation **(TOUATI, K. 1993).**

La prostaglandine utilisée est commercialise sous le nom de Prostavet ND, elle est présentée en flacon de 2 ml.

Des antibiotiques ont été utilisés après chaque récolte localement ou par voie générale

III-3- Matériel d'insémination collecte, transfert et de congélation des embryons (photo 2):

- Matériel d'insémination artificielle (pistolet d'insémination, BT 2, gaines et chemises sanitaires).
- Une sonde souple (type Foley) à double voies avec mandrin métallique.
- Chemises sanitaires pour protégé la sonde.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) sous forme de solution.
- Milieu de conservation des embryons, PBS enrichie avec $4^0/_{00}$ de BSA, d'antibiotiques et antifongiques.
- Un milieu de congélation à l'éthylène glycol.
- Seringues de 50 ml.
- 02 bouteilles stériles d'un litre.
- Un dilatateur cervical.
- Un désinfectant.
- Alcool chirurgicale.
- Anesthésique locale, Xylocaïne à 2%.
- Boites de pétries carrés et rondes quadrillées, pour la recherche des embryons.
- Microscope inversé pour la mise en évidence des embryons.
- Une paillette montée sur une seringue à insuline qui permet la manipulation des embryons.
- Un bio congélateur programmable.
- Pinces hémostatiques.
- Ciseaux.
- Bistouri.
- Porte bistouri.
- Seringues de 10 ml.
- Alcool polyvinyle.
- Paillètes 0,25 ml.
- L'azote liquide pour la congélation des embryons.
- Echographe.

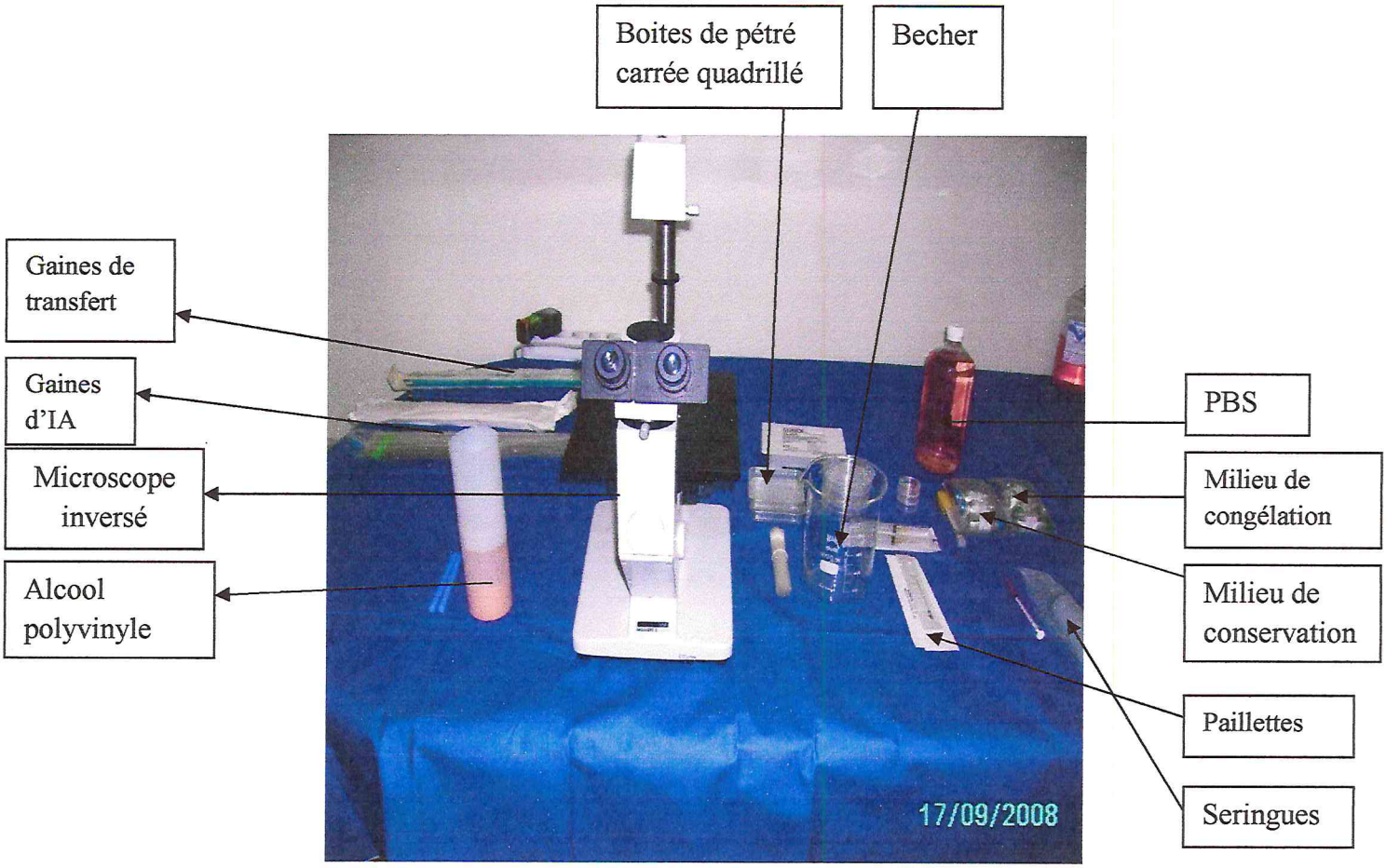


Photo 2 : Matériel d'observation et de conditionnement des embryons

IV- Méthode :

IV-1- L'observation des chaleurs (naturelles) :

Un suivi des chaleurs des donneuses a été réalisé pour déterminer leur état de cyclicité. L'observation des chaleurs était effectuée trois fois par jour pendant 30 minutes sur trois chaleurs successives:

IV-2- La superovulation :

Les vaches ont été récoltées durant toute l'année, nous avons fixé un intervalle de temps minimum entre deux opérations de récoltes de deux mois. Cet intervalle s'est allongé dans certains cas pour des raisons de pathologies diverses, principalement des kystes ovarien et des métrites. C'est pour cela que certaines vaches n'ont été récoltées que deux fois.

Le traitement des superovulations est réalisé avec de la FSH et de la LH porcine (Stimufol) dosé à 40 unités Armour (une unité Armour correspond à 10 microgramme de FSH pure) avec un pourcentage de 40% de LH, cette association FSH/LH est diluée dans 10ml de NaCl isotonique, administré en huit injections intramusculaires biquotidiennes en doses décroissantes et à 12h d'intervalle. A la 5eme injection de FSH, on associe une injection de prostaglandine « Prostavet » par voie intramusculaire.

Le traitement commence au dixième jour après apparition des chaleurs de références, et dure quatre jours, au cinquième jour du traitement, l'animal reçoit une double insémination artificielle, La collecte des embryons est réalisée au 7eme jour après insémination artificielle (voir tableau 2 et figure 9).

Tableau 02 : Protocole du traitement de la superovulation.

Jours	Traitements
J_0 : chaleur de référence	Aucun traitement (observation des chaleurs)
J_{10} : 1er jour du traitement	Injection FSH/LH 40% : 2ml (matin et soir à 12h d'intervalle)
J_{11} : 2eme jour du traitement	Injection FSH / LH 40% : 1,5ml (matin et soir à 12h d'intervalle)
J_{12} : 3eme jour du traitement	1- Injection FSH/LH 40% : 1ml (matin et soir à 12h d'intervalle) 2- Injection de PG : 2ml matin seulement (Prostavet)
J_{13} : 4eme jour du traitement	Injection FSH/LH 40% : 0,5ml (matin et soir à 12h d'intervalle)
J_{14} : 5eme jour du traitement	Insémination artificielle 12h après la dernière injection de FSH (matin et soir à 12h d'intervalle)
J_{21} : 7eme jour après insémination	1- Récolte des embryons 2- Injection de PG : 2ml 3- Administration d'antibiotiques par voie locale

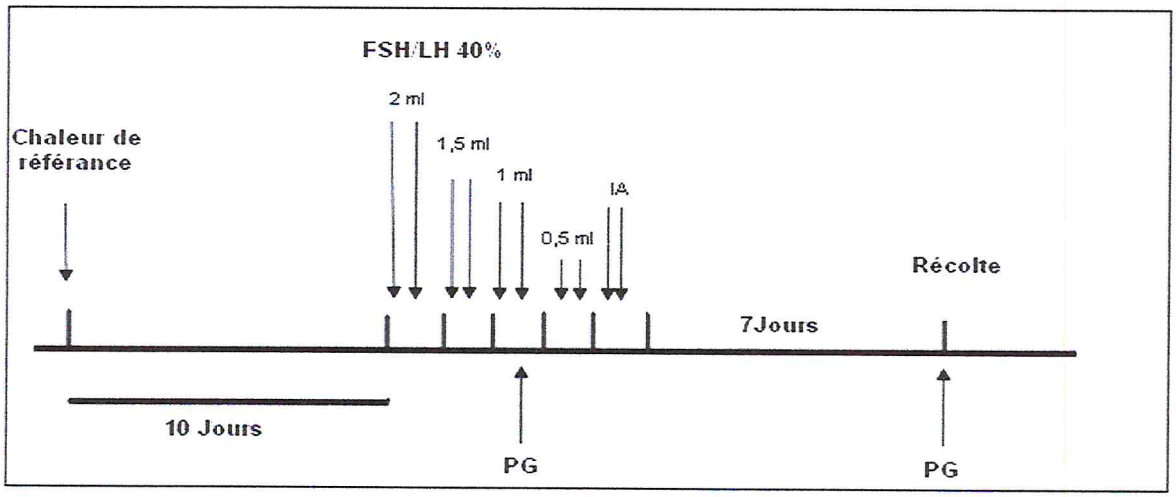


Figure 09: Protocole de traitement de superovulation.

IV-4- La récolte des embryons :

La récolte des embryons se fait 07 jours après insémination artificielle. La première étape consiste à effectuer une exploration rectale pour compter le nombre de corps jaune au niveau des deux ovaires, ces derniers sont ensuite examinés par échographie pour confirmer l'examen rectal. Après rasage du poil dans la région sacro coccygienne on réalise une épidurale basse en administrant 5 ml de Xylocaïne 2%, on désinfecte ensuite la région vulvaire. On introduit la sonde protégée par une chemise sanitaire par voie vaginale, une fois arrivé à l'entrée du col en tire la chemise sanitaire puis on continue vers la corne droite ou gauche, à 5cm environ de la bifurcation on gonfle le ballonnet pour fixer la sonde. On vérifie que la sonde est bien fixée et que le ballonnet est bien gonflé avant d'injecter le PBS avec des volumes croissant (deux fois 20ml, deux fois 30ml, deux fois 40ml une fois 50ml, une fois 20 ml+30ml d'aire). Tout le liquide est récupéré dans une bouteille stérile de 1l. Une fois la récolte de la corne droite terminée on dégonfle le ballonnet et on tire la sonde vers le corps utérin pour passer à l'autre corne et on procède de la même manière. A la fin de la récolte on administre la $PGF_2\alpha$ et de l'antibiotique en intra utérine.

IV-5- Recherche des embryons :

La recherche des embryons se fait à partir du culot formé dans les flacons contenant le PBS que l'on déverse dans des boites de pétri quadrillées. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope inversé en commençant par le plus faible grossissement. Chaque embryons trouvé est photographié, classé et récupéré dans une boite contenant le milieu de conservation.

❖ **La mise en paillettes :**

A l'aide d'une paillette montée sur une seringue à insuline les embryons sont aspirés dans des paillettes de 0.25 ml entre deux bulles d'aires pour le transfert en frais. Les embryons destinés à la congélation sont mis dans le milieu de congélation puis aspirés à leur tour dans des paillettes de la même manière que les premiers. Chaque paillette est observée sous le microscope pour s'assurer de la présence de l'embryon.

V- Les résultats :

V-1- Apparition des chaleurs de superovulation par rapport à l'injection de PG

Dans chaque opération et lors de l'insémination artificielle on a remarqué que certaines vaches ont présenté des chaleurs après 60 h et d'autres après 48 h de l'injection de la prostaglandine.

Tableau 03 : La durée d'apparition des chaleurs après PG en heures.

Numéro de vache	Chaleur post PG		
	Opération 1	Opération 2	Opération 3
1	48	48	60
2	60	48	-
3	60	60	-
4	48	60	60
Moyenne	54	54	60

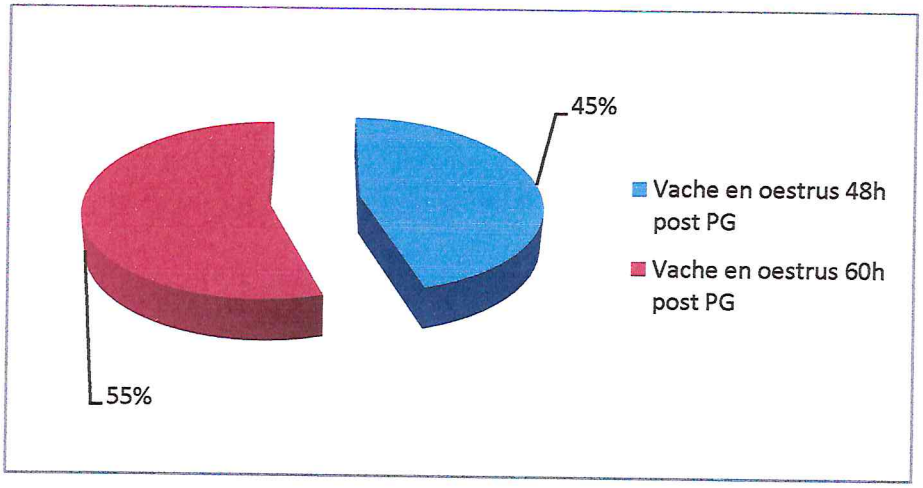


Figure 10 : Résultats de détection des chaleurs.

V-2 - Les résultats obtenus de l'exploration rectale :

L'évaluation de la réponse ovarienne au traitement de la superovulation par fouillis rectal avant l'opération de récolte a montré la présence de corps jaunes, de follicules ainsi que certaines kystes ovariens, un total de 10 récoltes ont été réalisées. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant (tableau 4) :

Tableau 04: résultats de l'examen rectal.

Numéro de Vache	opération (1)			opération (2)			opération (3)			Totale de corps jaune	Moyenne de Cj par vache
	Corps jaune	F	Kyste	Corps jaune	F	Kyste	Corps jaune	F	Kyste		
1	1	1	0	11	2	0	10	1	1	22	7.33
2	8	1	0	15	0	0	_	_	_	23	11.5
3	0	0	3	6	0	0	4	0	0	10	5
4	8	0	0	2	3	2	5	0	0	15	5
Moyenne/récolte											7.2

F : Follicule.

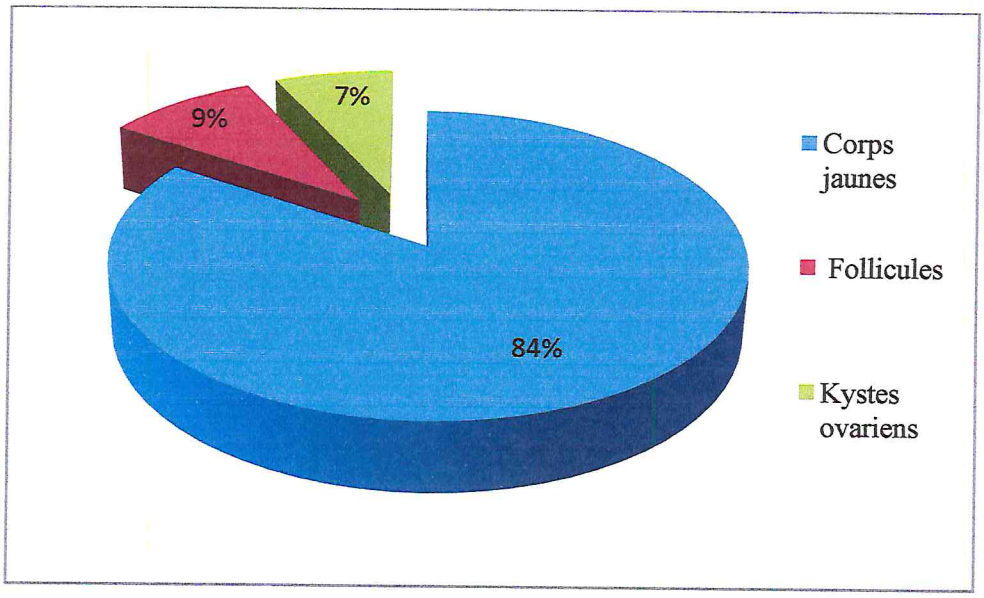


Figure 11 : structures trouvées lors de l'exploration rectale.

V-3- Appréciation du résultat global des récoltes :

Tableau 5 : Le resultat global des récoltes.

Les recoltes	Nombre de recolte	Nombre de recolte nulle	Nombre de recolte < 4 embryons	Nombre de recolte > 10 embryons
Opération1	4	1	2	0
Opération2	4	1	0	2
Opération3	3	1	1	0
Total	11	3	3	2

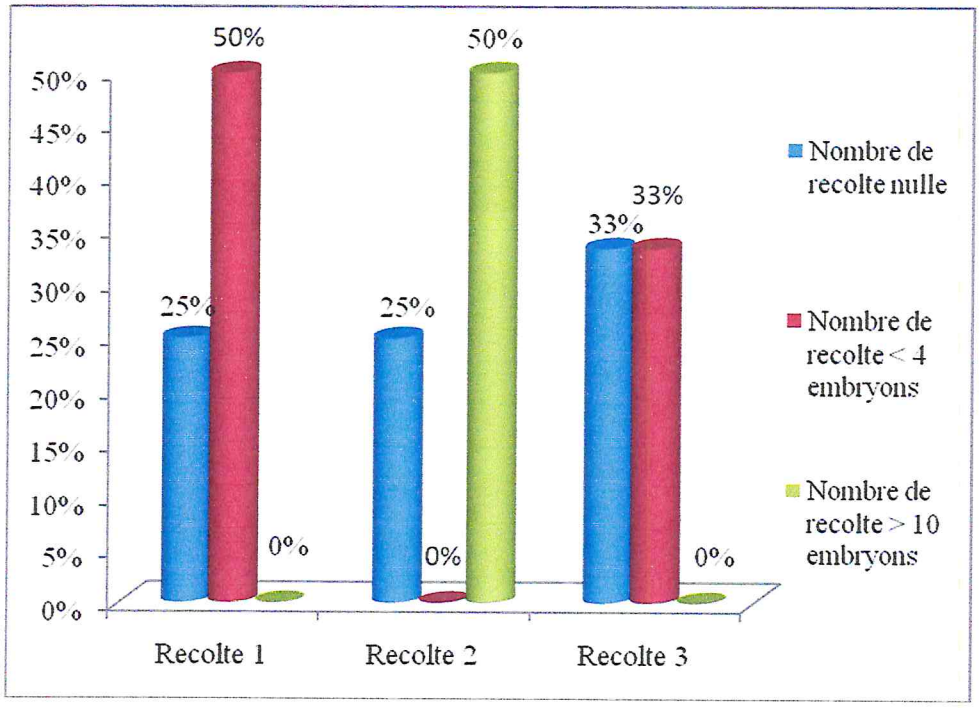


Figure 12 : Le nombre d'embryons par récolte.

Remarque :

Le pourcentage est le taux des récoltes qui ont donné un nombre d'embryons intermédiaire.

V-4- Resultats la classificationdes embryons :

La recherche des embryons sous un microscope inversé est suivie de leur classification nous a montres que nous avons obtenu un taux de fécondites de 75% .

Tableau 06 : Classification des embryons.

Classe des embryons	Nombre	Pourcentage
Classe 1	04	7%
Classe 2	12	22%
Classe 3	10	18%
Dégénéré	21	38%
Non fécondé	08	15%
Total	55	100%

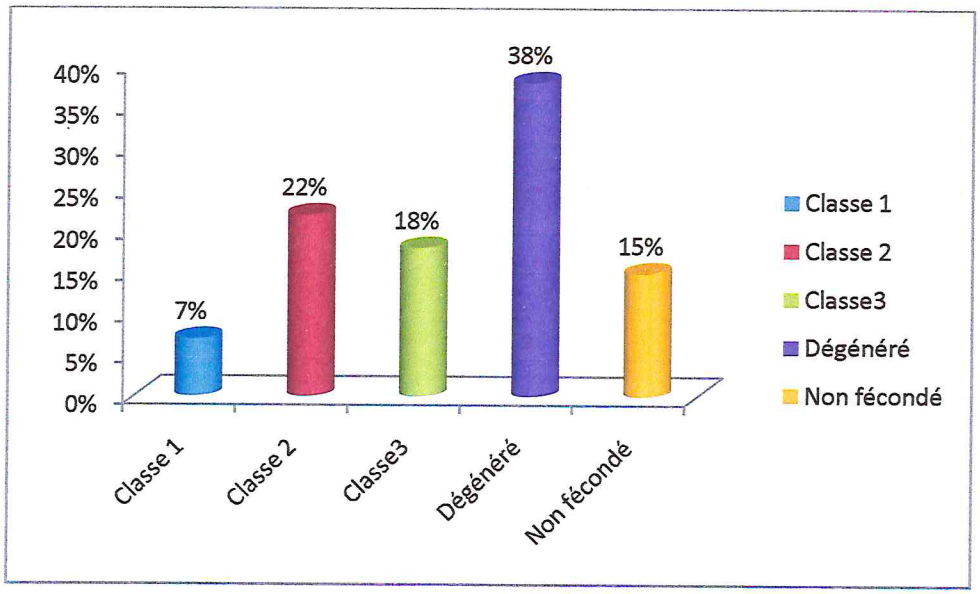


Figure 13 : Les classes des embryons.

V-5- Appréciation de la qualité des embryons:

On a pris en considération les embryons de classe 1 et 2 comme embryons transférables, les classe 3, les dégénérés et les non fécondés comme embryons non transférables.

Tableau 07 : Les récoltes et les embryons obtenus.

Numero de vache	Nombre de récolte	Nombre d'embryons	
		Transférable	Non transférables
Vache 1	3	2	17
Vache 2	2	8	13
Vache 3	3	3	4
Vache 4	3	3	5
Total	11	16	39

Sure les 11 récoltes on a obtenu 55 embryons dont 16 sont transférables et 39 sont non transférables.

B **lastocyste**

Photo 2: quelques embryons transférables.

Photo 3 : Embryon non fécondé.

V-6- Les résultats du transfert :

Les embryons transférés sont: 2 embryons de classe 1 et 4 embryons de classe 2. Le diagnostic de gestation à été effectué par échographe au 56eme jour après le transfert. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Résultats du transfert en frais.

Vaches receveuses	Classe d'embryon transféré	Diagnostic de gestation par échographe a j56
Receveuse 1	Classe 1	Positif
Receveuse 2	Classe 1	Négatif
Receveuse 3	Classe 2	Positif
Receveuse 4	Classe 2	Négatif
Receveuse 5	Classe 2	Négatif
Receveuse 6	Classe 2	Négatif

Sur 6 transferts on a eu 2 gestations donc la moyenne est de 33,33%.

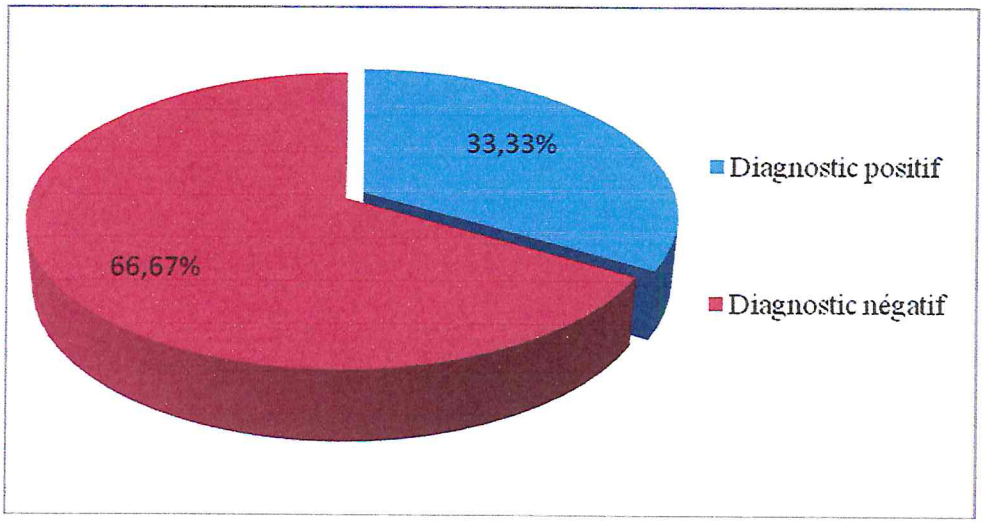


Figure 14 : Taux de gestation

Photo 04 : Diagnostic de gestation à j56 par échographe.

Photo 05 : Diagnostic de gestation à j64 par échographe.

V- Discussion :

Concernant les resultats de l'apreciation des chaleurs de superovulation des vaches nous avons noté que 45,46% de vaches entrent en chaleur 48h post PG et 54,54% de vaches à 60h post PG. A la suite d'une superovulation par la FSH, l'intervalle moyen PGF2α – oestrus varie de 41heures (YADAV et al, 1986 ; DIOP et al, 1987) à 51heures (FOOTE et al, 1989). En comparant des génisses superovulées par la FSH par rapport a des temoins (ROBERGE et al, 1995) notérent également que cet intervalle apparait en moyenne 48,3±0,3h vs 66,7±9,6 h respectivemment. L'alongement de cet interval peut expliquer une partie des mauvaise réaction et des embryons de mauvaise qualité dans notre cheptel.

A l'exploration rectale nous avons noté une moyenne de 7.2 CJ par vache etpar récolte ce qui est considéré comme peu satisfaisant au regard des résultats de CHUPIN (1988) qui est de 14,7 CJ, CHUPIN et PROCUREUR (1983) qui obtiennent un nombre de CJ de 15,9±15,0 (P 0,05) et LUCAS-HAHN et NIEMANN (1991) avec un nombre moyen de corps jaunes 12,6 ± 1,1.

Les résultats de nos récoltes ont donnés un taux d'embryons transférable de 29.09%, ce pourcentage est conforté par la litérature où il est rapporté qu'une récolte sur 3 ne produit aucun embryon transférable et 70% des embryons transférés proviennent de 30% des récoltes réalisées (THIBIER et NIBART ,1995). Ce faible taux peut être expliqué par l'état de l'ovaire au début du traitement de superovulation en effet 70% de la variation des réponses observées peuvent être imputées à des facteurs intrinsèques liés au statut ovarien de l'animal (THIBIER et NIBART ,1995). Il est à noter que dans notre étude nous n'avons considéré comme embryons transférables que ceux de classe 1 et 2.

Après transfert nous avons obtenu 2 gestations pour 6 embryons transférés, ce qui représente un taux de 33.33% ; il est loin de la norme de 55,8% recherchée dans certains pays européens (UNCEIA, 2003), cela est dû à une mauvaise préparation des receveuses, en effet les vaches destinées au transfert étaient celles dont la venue en chaleur correspondait avec l'entrée en chaleur des donneuses en fin de superovulation. Il est à noter aussi qu'une variation de la note d'état des receveuses a pu influencer le résultat du transfert.

CONCLUSION

Une bonne production laitière, une bonne cyclicité, une bonne alimentation, une bonne détection de chaleurs avec une bonne conduite d'élevage contribuent dans l'amélioration de la biotechnologie liée aux productions des embryons. A ce moment la, une bonne récolte avec des embryons d'excellents qualités est soumise au plusieurs facteurs influençant la réponse au traitement de super-ovulation des vaches dont les résultats soit des embryons de mauvaise qualités soit des récoltes nulles.

Notre travaille est basses non seulement sur les résultats du transfert mais il nous a montré que leur réussite est liées a :

- Une bonne sélection de la donneuses en visant la production laitière, une bonne cyclicités indemne de toute pathologie gynécologique et une note corporelle comprise entre 2,5 et 3,5.
- Une bonne détection de chaleurs (naturelle) pour l'application du traitement dans le moment idéale.
- Une alimentation adéquat et équilibres.
- Un respect des intervalles du temps dans les injections du traitement.
- Un très bonne actes de l'insémination artificielle évitant toutes blessures qui conduite a des infections peut évoluent en gravites.
- Une qualification a passé le col utérin avec la sonde de récolte le jour de récolte évitant les blessures et lors de l'opération du transfert.
- Une rapidité de récoltes prenant tous nos précautions.
- Une très grande patience dans la recherche des embryons sous le microscope inversé.
- Une très bonne observation des constituants de l'embryon pour les classifier.
- Un bon déroulement de congélation, débutant de la mise en paillètes passant par la cristallisation et en fin la mise dans l'azote liquide.
- Un bon suivi aux receveuses accompagne avec des examens échographiques pour le diagnostic précoce de gestation.

Et malgré que les résultats de notre travaille sont loin aux résultats actuelles des secteurs spécialiser dans ce domaine et que le manque de l'expérience et du matériels on a arrivées a faires des récoltes et avoirs des embryons d'excellents qualités, de transférer quelques unes et congelées les autres.

RECOMMANDATIONS

Au cours de notre pratique, nous avons constaté qu'on peut obtenir des résultats meilleures que les résultats obtenues lors de notre travaille avec la disponibilité des produits appropriés. Dans ce conteste nous avons arrivé à sortir quelque recommandation, débutant par la première, il est recommandé de faire tout d'abord une sélection parfaite au donneuses et de la répéter ces traitements plusieurs fois, en essayant chaque fois d'éliminer les facteurs limitant y la réponse aux traitements y la production des embryons, tel que l'alimentation, le stresse, intervalle vêlage début de traitement et les facteurs liées a l'environnement. Il est recommandé de faires ces opération sous un suivie bien déterminer avec suivie des chaleurs et le respect des intervalles des heures d'injections des hormones et de ne négliger aucun paramètre observé. Sa de part.

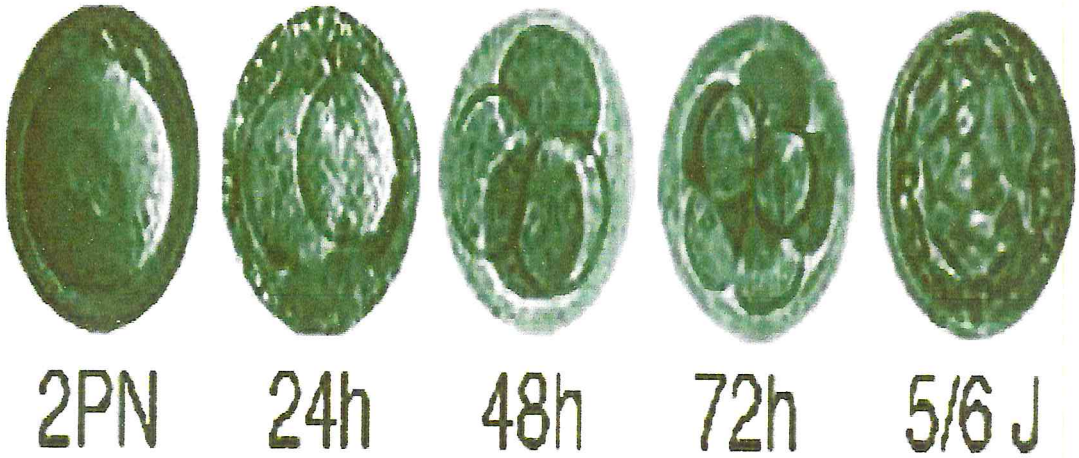
D'autre part, pour rendre le travaille plus facile, il faut avoir un équipement adéquat, notamment les loupes appropriées pour l'identification des embryons, il est tout à fait possible qu'on soit passé à coté de plusieurs embryons faute de matériel adapté.

Il faudrait penser aussi a la formation du personnel intervenants dans les différents étapes, ce qui permettre leur application sur terrain et nous donnera une meilleurs maitrise de la technique, pour envisager d'en faire ensuite une pratique d'élevage et la pratique sur des élevages privé.

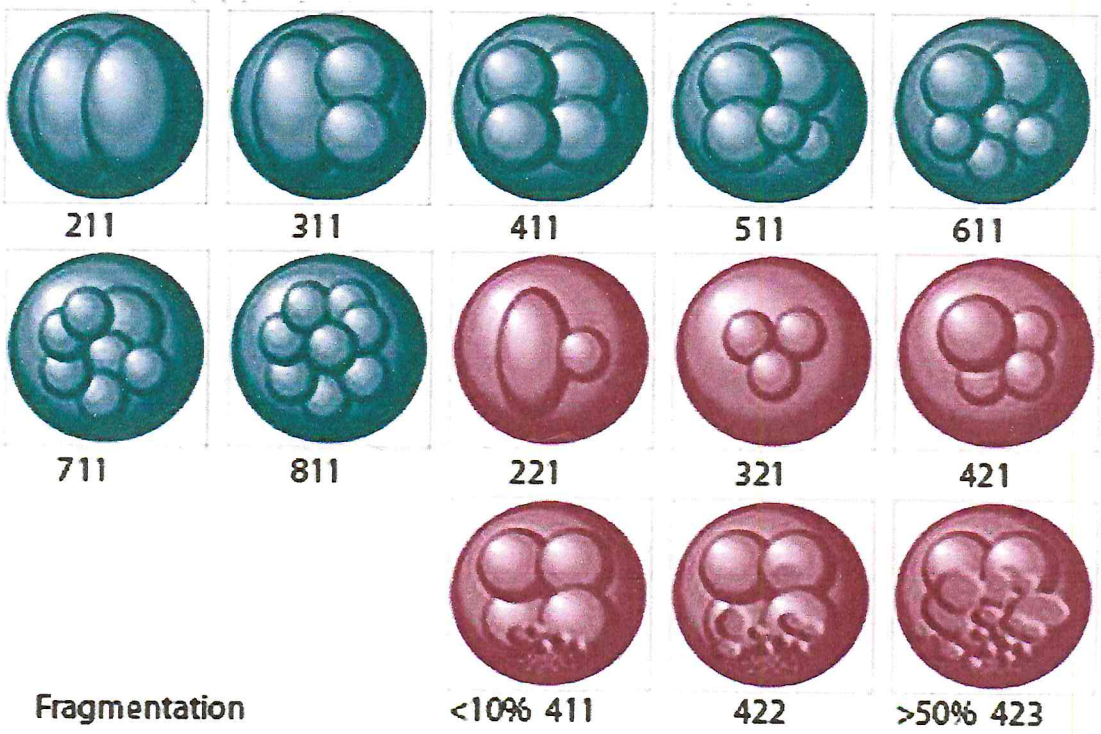
Enfin, puisque le bute essentiel du transfert d'embryons est la sélection, il serait très intéressant d'envisager de faire des stages de formation et des conventions avec les éleveurs et le CNIAAG pour préserver la race de toutes espèces des animaux de rente et diminuer ou arrêter les échanges étrangères (importation des embryons congelés) et faire participer dans l'amélioration de l'économie national par le lancement dans ce domaine.

ANNEXES

ANNEXE 01 : Le suivi de la croissance de l'embryon.



Annexe 02 : Classification proposée.



Classification à 3 chiffres (BLEFC0)

1er chiffre : Nombre de blastomères, généralement de 4 à J2 et 8 à J3.

2ème chiffre : forme des blastomères : 1 : typique (normale) 2 : atypique.

3ème chiffre : Taux de fragmentation : de 1 : inf. à10% à 3 sup. à 50%.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACOSTA.T.J et al, 2007:

Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle.J REPROD. Dev, 53(1): 39-44

ADAMS.G.P et al, 2008:

Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle.
Theriogenology, 69(1): 72-80.

ALBERIO R., CABODEVILA J., IOVANNITTI B., TOQUATI S, 1994:

Superovulation performed on cyclic cows during progesterone treatment. – In: Proceedings 10th AETE meeting, Lyon, 9-10 septembre 1994: 142.

ALFURAIJI M.M., BROADBENT P.J., HUTCHINSON J.S.M., DOLMAN D.F., ATKINSON T, 1990:

Superovulation using different doses of PMSG and monoclonal anti--PMSG in cattle. Theriogenolgy. 33,186.

ALMEIDA A.P, 1987:

Superovulation in cattle: a combined treatment using Synchromate B with either PMSG or FSH. – Theriogenology, 27: 329-335.

ARAV. A, 1998:

Method for cryopreservation of biological samples, US Patent, 5, 715, 686.

AURICH CHR., HAHN J, 1993:

Male effects on in vivo and in vitro production of bovine embryos. – In: Proceedings 9th AETE meeting, Lyon, 10-11 September 1993: 117-124.

BEVERS M.M., DIELEMAN S.J., GIELEN J.T., WURTH Y.A., JANSZEN B.P.M., VAN DE BROEK J., WILLEMSE A.H, 1993:

Yield of embryos in PMSG-superovulated cows treated with anti-PMSG six or 18 hours after the peak of luteinising hormone. Veterinary Record. 132, 186-189.

BARIL. G., COGNIE. Y., POUGNARRA. J.L., LEBOEUF B., TRALDI. A.L., GUIGNOT. F., BECKERS.J.F., MERMILLOD. P, 2001:
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, 2001:
Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. Theriogenology, 56, 299-305.

BERGFELT D.R., BO G.A., MAPLETOFT R.J., ADAMS G.P, 1997:
Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. Ani. Reprod. Sci. 49, 1-12.

BOG.A. ADAMS G.P., PIERSON R.A., MAPLETOFT R.J, 1996:
Effect of progestagen plus oestradiol-17-beta treatment on superovulatory response in beef cattle. Theriogenology. 45, 897-910.

BOG.A. HOCKLEY D., NASSER L.F., MAPLETOFT R.J, 1994:
Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. Theriogenology. 42,963-975.

BOLAND M.P., GOULDING D., ROCHE J.F, 1991:
Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. – Theriogenology, 35: 5-17.

BRUYAS, 1991 :
Cycle oestral et detection des chaleurs. Depeche vet., supplement 19, 9-14.

CHUPIN D.
Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embrtonnaire. Colloque Soc Fr Etude de la fertilité. Masson Ed Paris 1989 ;26 :213-232.

DALICHAMPT C. (1989) :

Les differentes methodes de diagnostic de la gestation chez la vache : apport du dosage de la progesterone dans le lait par la methode des bandelettes (PV test) These de doctorat veterinaire, Nantes, 160 p.

DARROW M.D., LINDNER G.M., GOEMANN G.G. (1982):

Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows. – Theriogenology, 17: 84.

DE RUIGH L., PEARSON R.E., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW J.A.M, 1995:

Are "permanent donor cows" permanent donor cows? – In: Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, 8-9 September 1995: 158.

DE RUIGH L., PEARSON R.E., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW J.A.M, 1995:

Are "permanent donor cows" permanent donor cows? – In: Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995: 158.

DETTERER J., SCHMIDT T., HARLIZIUS B, 1997:

Factors influencing the variability in superovulation results in German Holstein cattle. – Theriogenology, 47: 169.

DIELEMAN S.J., BEVERS M.M, 1987:

Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG treated cows. J. Repro. Fertile. 81, 533-542.

DIELEMAN S.J., BEVERS M.M., WURTH Y.A., GIELEN J.T., WILLEMSE A.H, 1989: Improved embryo yeld and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. Theriogenology. 31, 473-487.

DONALDSON L.E., PERRY B, 1983:
Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. – Theriogenology, 20: 163-168.

DONALDSON L.E, 1984:
Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. – Theriogenology, 21: 1013-1018.

DRIANCOURT. M.A., FRY.R.C; CLARKE. I.J. and CAHIL. L.P, 1987:
Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. J Reprod Fertil, 79: 635-641.

Driancourt M.A.
Thatc her W.W., Ter qui M., Andrieu D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 1991, **8**, 209- 221.

ESTRADA J.L., PACHON L.A., OLIVERA M., PIDRAHITA J., WESTHUSIN M, 1998: Superovulatory response of colombian creole cattle to two doses of
FSH.Theriogenology. 49,377.

FOOTE R.H., ELLINGTON J.E, 1988:
Is a superovulated oocyte normal? Theriogenology. 29, 111-123.

FORTUNE J.
Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Anim. Reprod. Sci.*,1993, **33**, 111-125.

FORTUNE J.E.
Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*,1994, **50**, 225-232.

FORTUNE .J. E et al, 2001:
Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle.Biol Reprod, 65(3): 648-54.

GAYARD.V , 2008 :

Présentation power-point en ligne. La fonction ovarienne, [en-ligne] : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Unité Associée INRA de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales., [http://physiologie.envt.fr/spip/spip.php?article47] (consultée le 12 juin 2009).

GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P, 1991:

Superovulation in heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. Theriogenology. 36, 949-958.

GINTHER.O.J., KNOPF.L and KASTELIC.J.P, 1989 :

Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. Biol Reprod, 41(2): 247-54.

GINTHER.O.J et al, 2001:

Follicle selection in monovular species. Biol Reprod, 65(3): 638-47.

GOULDING D., WILLIAMS D.H., DUFFY P., BOLAND.M.P., ROCHE J.F, 1990:

Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the oestrous cycle. – Theriogenology, 34: 767-778.

GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P, 1994:

Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen. J.Reprod.Fert. 100: 505-510.

GOVIGNON.A., ROHOU.A., PONSARD.C., DELCROIX.P., HUMBLOT.P, 2000:

Sources of variation of embryo production after superovulation in Prim Holstein dairy cows. – In: Proceedings 16th AETE meeting, Santander, 08-09 September 2000: 158.

HAHN.J, 1992:

Attempts to explain and reduce variability of superovulation. Theriogenology. 38, 269-275.

HASLER.J.F., BROOKE.G.P., Mc.CAULEY.A.D, 1981:

The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. – Theriogenology, 15: 109.

HASLER J.F., McCAULEY A.D., SCERMERHORN E.C., FOOTE R.H, 1983: Superovulatory responses of Holstein cows. – Theriogenology, 19: 83-99.

HASLER J. F, 2001:

Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle - Theriogenology - 56 (9), 1401-15.

HERATH, S., et al., 2007,

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

HOCKLEY D.K., BO G.A., PALASZ A.T., DEL CAMPO M.R., MAPLETOFT R.J, 1992: Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin-V in the cow: effect of dose and site of injection. – Theriogenology, 37: 224.

HUMBLOT P., GRIMARD B. (1996) :

Endocrinologie du post-partum et facteurs influencant le retablissement de l'activite ovarienne chez la vache Point Vet., 28, numero special, 73-81.

HUPKA S., MEINECKE-TILLMANN S., DETTERER J., MEINECKE.B, 2000:

Variables influencing embryo collection results in superovulated Germen Holstein cattle. – In: Proceedings 16th AETE meeting, Santander, 08-09 September 2000: 166.

IRELAND.J.J and J. F. ROCHE, 1983a:

Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. J. Anim. Sci., 57: 157–167

IRELAND.J.J and J. F. ROCHE, 1983b:
Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins.Endocrinology, 112: 150–156.

IRELAND.J.J ; ROCHE.J.F, 1987:
Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Roche,, J.R., O'Callaghan, D. (Ed). Follicular growth and ovulation rate in farm animals, Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, p.1-18.

IRELAND.J.J et al, 2000 :
Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. J Dairy Sci, 83(7): 1648-58.

ISACHENKO.V., SACHENKO.V., FOLCH. J., ISACHENKO.E., NAWROTH.F., KRIVOKHRCHENKO.A., VAJTA.G., DATTENA. M., ALABART.J.L, 2003:
Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using identical protocol. Theriogenology, 60, 445-452.

KAFI M., McGOWAN M.R, 1997:
Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. Ani-Reprod. Sci. 48, 137-157.

KAFI M., McGOUWAN.M.R., KIRKLAND.P.D., JILLELLA.D, 1997 :
The effect of bovine pestivirus infection on the superovulatory response of friesan heifers. – Theriogenology, 48:985-996.

KELLY P., DUFFY P., ROCHE J.F., BOLAND.M.P, 1997:
Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. Ani. Reprod. Sci. 46, 1-14.

LACAZE S., COUPET H., BLATTES M., GARREAU S., HENNEQUIN.M, 1991 :
Influence du nombre d'inséminations artificielles sur le pourcentage d'embryons utilisables après traitement de superovulation. – In : Proceedings 7th AETE meeting, Cambridge, 14-15 septembre 1994 : 156.

LAFOREST M, 2005 :
Le controle de la maturation nucleaire des ovocytes porcins.Implication de la phosphodiesterase de type 3 et de l'AMPK (5'adenosinemonophosphate-activated protein kinase) Memoire de maitrise,
universite de Laval, 158p.

LANE. M.,BAVISTER.B.D., LYONS. E.A., FOREST. K.T, 1999:
Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. Nature Biotech. 17, 1234-1236.

LINDSELL.C.E., MURPHY.B.D., MAPLETOFT.R.J, 1986:
Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. – Theriogenology, 26: 209-219.

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

LUCAS-HAHN.A., NIEMANN.H, 1991:
Aspects of bovine embryo production in vivo and in vitro. - In: Proceedings 7th AETE meeting, Cambridge, 14-15 September 1991: 63-75.

MACMILLAN.K.L, 2003:
Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. Animal Reproduction Science, 78: 327-344.

MANCIAUX L., NIBART M., HUMBLOT.P, 1997:

Effect of AI sire on embryo production in the Montbeliard breed– In: Proceedings 13th AETE meeting, Lyon, 12-13 September 1997: 174.

MANCIAUX L., PONSARD C., GRISOUARD D., HUMBLOT.P, 2000 :

Sources of variation in embryo production following superovulation in the Montbeliard breed. – Theriogenology, 53: 502.

MENARD.D.P., MARTINEZ.D, 1997 :

We can identify our better donor cows by collecting them as heifers. – In: Proceedings 13th AETE meeting, Lyon, 12-13 September 1997: 178.

MIHM.M.A.E. GOOD.TEM., IRALAND.J.L.H ., KNIGHT.PG., ROCHE.J.F., IRELAND.J.J, 2000 :

Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. Biol Reprod, 63: 811-819.

MIHM M, IRELAND JLH, IRELAND JJ, KNIGHT PG, ROCHE JF., 1997,

Decline in serum folliclestimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. Biol Reprod, **57**: 1328-1337.

NIBART.M, 1991:

Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage. Rec. Med. Vet. 167, 261-290.

NIBART.M, 1992 :

Compte-rendu du 12ème congrès ICAR, La Haye, 23-27 août 1992. – El. &Ins., 255 : 19-23.

NOSEIR.W, 2003:

Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 wave, Reproductive Biology and Endocrinology, 1: 50

PEREZ.O., BOEDIONO.A., FERGUSON.E., AIRHART.C., RICHARD.R., GODKE.R, 2001:

Oocyte and embryo production from FSH-treated postpartum beef cows shortly after calving. – Theriogenology, 55: 516.

PIERSON.R. A and O.J.GINTHER, 1988:

Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. Theriogenology, 29: 21–37.

PONSART.C., GOVIGNON.A., ROHOU.A., MANCIAUX.L., DELCROIX.P., GRISOUARD.D., HUMBLOT.P, 2001:

Effects of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the Prim'Holstein and Montbeliarde breeds. Theriogenology, 55: 369.

RAJAKOSKI.E, 1960:

The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, end left-right variations. Acta Endocrinol Suppl (Copenh), 34(Suppl 52): 1-68.

ROBERGE S; RIEGER D; RAWLINGS

NC.Periovullatory LH, FSH and stzroid hormone profiles in superovulation and unstimulated Holstein heifers. Theriogenology 1995; 44:59-79.

ROBERTSON I., NELSON R.E., IN THIBIER.M., EVANS.B., WRATHALL. A et al, 1994:

Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd ed. Stringfellow D.A. and Seidel S.M., Auburn, USA. 103-107.

ROCHE.J-F and J.J.IRELAND, 1998:

A review of regulation of follicle growth in cattle, J Anim science, 76: 16-29.

ROY.F., MAUREL.M.C., COMBES.B., VAIMAN.D., CRIBIU.E.P., LANTIER.I et al, 1999:

The negative effect of repeated equine chorionic gonadtropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. – Biol.Reprod., 60: 805-813.

SAHA.S ., RAJAMAHENDRAN.R ., BOEDIONO.A ., CECE S. S. T, 1983:

Viability of bovine blastocysts obtained after 7,8 or 9 days of culture following vitrification and one-step rehydratation - Theriogenology - 20 (4), 407-417.

SAUMANDE.J, 1991 :

La folliculogenese chez les ruminants.Rec. Med. Vet., 167, 205 – 218.

SAUMANDE.J, 1995 :

La production d'embryons chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? – INRA Prod.Anim., 8 (4) : 275-283.

SLIMANE.W., NIBART.M., THUARD.J.M., KEITA.J.B., HUMBLOT.P, 1995:

Effect of controling the moment of AI with a field LH kit on the number and quality of embryos collected from superovulated cows. – In: Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995: 240.

TOWNSON.D.H et al, 2002:

Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. J Anim Sci, 80(4): 1053-8.

VATJA.G., BLOOTH.P.J., HOLM.P., GREVE.T., CALLESEN.H, 1997a :

Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with Open Pulled Straw (OPS) method. Cryo-Letters, 18, 191-195.

VAJTA.G, HOLM.P, KUWYAMA.M, BOOTH.P.J, JACOBSEN.H, GREVE.T, CALLESEN.H (1998):

Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.Mol. Reprod. Dev., 51, 53-58.

WILTBANK, M.C., et al. (2000):

Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. J Dairy Sci, 83(12): 2998-3007.

YAAKUB H., DUFFY P., O'CALLAGHAN D., BOLAND M.P. (1998):

Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to gonadotropin treatment on superovulatory response,and on embryo yeld and quality in beef heifers. Ani. Reprod. Sci. 52, 191-204.

YADAV MC, WALTON JS, LESLIE KE.

Plasma concentration of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cours using follicle stimuling hormone or pregment mare serum gonadotropine.
Theriogenology 1986; 26(4) :523-540.

ZEITOUN M.M., YASSEN A.M., HASSAN A.A., FATHELBAB A.Z.,ECHTERNKAMP S.E., WISE T.H., MAURER R.R. (1991):

Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. Theriogenology. 35, 653-667.

ZEITOUN M.M., YASSEN A.M., HASSAN A.A., FATHELBAB A.Z., WISE T.H.,MAURER R.R. (1988):

Superovulation using PMSG and anti-PMSG in beef cows.Theriogenology. 29, 339.