

# UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1

Institut des sciences vétérinaires

## THESE DE DOCTORAT

Spécialité : sciences vétérinaires

VARIATION DES RESULTATS DES TRAITEMENTS DE SUPEROVULATION  
EN FONCTION DE LA FREQUENCE D'INJECTION DES EXTRAITS  
HYPOPHYSIAIRE ET DU STATUT ENERGETIQUE CHEZ LA VACHE

Par

**ADEL Djallal**

Devant le jury composé de :

M. LAFRI	Professeur	Université de Blida1	Président
D. KHELEF	Professeur	ENSV Alger	Examineur
B. KHIATI	MCA	Université de Tiaret	Examineur
R. KAIDI	Professeur	Université de Blida1	Promoteur
K. TOUATI	PhD, Diplomate ECBHM	Université de Liège	Co promoteur

Blida, février 2019

## RESUME:

La production d'embryons chez le bovin peut être une alternative à la baisse de la fertilité imputée à la sélection. Cependant la variabilité de la réaction des vaches aux traitements de superovulation est un facteur limitant. En Algérie très peu d'essais de la production d'embryons ont été réalisés malgré le gain en qualité que pourrait apporter cette technique. Notre travail s'articule autour de trois parties. Dans un premier temps nous avons réalisé un inventaire des récoltes réalisées durant la période de l'étude chez des vaches de race améliorée appartenant à des stations et des élevages privés suite à un traitement de superovulation classique (8 injections de FSH à 12 heures d'intervalle). Un total de trente-trois récoltes ont été réalisées, une moyenne de 11,06 CJ/récolte a été obtenu, ce qui est considéré comme une réaction ovarienne moyenne. Les récoltes ont données une moyenne de 6,3 embryons/récolte, ce résultat est en deçà de ceux rapportés par la littérature. Plusieurs facteurs peuvent être incriminés, principalement l'alimentation qui a une influence certaine sur la production d'embryons, ce fait est signalé par plusieurs auteurs.

Dans un deuxième temps nous avons essayé de vérifier l'efficacité d'un traitement de superovulation comportant 3 injections de FSH à 24 heures d'intervalle et le comparer aux résultats d'un protocole classique (8 injections à 12 heures d'intervalle). Vingt-trois récoltes ont été réalisées chez 8 vaches âgées de 3 à 6 ans et réparties en deux groupes de quatre chacun. Le premier groupe a reçu 8 injections à 12 heures d'intervalle et le deuxième en a reçu 3 à 24 heures d'intervalle, les vaches des deux groupes ont reçu une injection de prostaglandine au 3<sup>ème</sup> jour du traitement de superovulation et une double insémination artificielle au 5<sup>ème</sup> jour, la récolte a été réalisée au 12<sup>ème</sup> jour (7 jours après insémination). Le nombre moyen de corps jaunes obtenu est de 9.1 par vache pour le groupe 1 et 10.4 dans le groupe 2, ce qui dénote une faible réaction ovarienne. Un nombre global de 140 embryons ont été collectés avec une moyenne de 6.08 par vache, ce résultat peut être imputable aux erreurs de conduite d'élevage et de rationnement. Parmi les embryons récoltés 46% et 56% étaient transférable respectivement pour le groupe 1 et 2. Un léger gain de qualité a été enregistré dans le groupe 2 avec une moyenne d'embryons transférable de 3,8 contre 2,2 pour le groupe 1.

Dans une troisième partie nous avons tenté d'identifier l'influence du bilan énergétique sur la réaction ovarienne des vaches soumises à un traitement de superovulation. L'exploration du bilan énergétique est matérialisée par le dosage de quelques paramètres biochimiques (AGNE, BHB, glycémie) et un suivi de la note d'état corporelle avant et pendant le traitement. Les résultats montrent une note d'état stable à 2.8 pendant les 5 visites effectuées. Les résultats du BHB présentent une moyenne maximale de 1.23 mmol/l avec une concentration de 2.2mmol/l chez la vache 2 pendant la 1ère observation, et une diminution dans les autres observations. La glycémie a montré une variation de 0.5 à 0.76 g/l avec une concentration maximale de 1.01 g/l chez la vache 2 durant la 3ème observation. Pour les AGNE la concentration ont montré une augmentation des concentrations dans le 3ème et 4ème prélèvement pour les vaches 3, 4 et 5 avec une valeur maximale de 1.36 mmol/l au 3ème prélèvement .ces résultats montre globalement une mobilisation des réserves corporelles chez toutes les vaches a différentes étapes de l'expérimentation. Le bilan énergétique négatif matérialisé par la mobilisation des réserves corporelles a eu un impact sur la réaction ovarienne suite au traitement de superovulation chez les 5 donneuses avec une moyenne de 10 CJ/récolte, aucune récolte n'a donnée d'embryons viables, plusieurs auteurs font état d'une influence importante du bilan énergétique négatif sur la fertilité des vaches d'une manière générale et sur le résultats des récoltes d'embryons.

Mots clés : bovin, superovulation, extraits hypophysaires, bilan énergétique.

## ملخص:

قد يكون إنتاج الأجنة في الماشية بديلاً عن انخفاض الخصوبة الذي يعزى إلى التكاثر. ومع ذلك، فإن تباين استجابة الأبقار للعلاج *superovulation* هو عامل الحد. في الجزائر، تم إجراء عدد قليل جداً من تجارب إنتاج الأجنة على الرغم من زيادة الجودة التي يمكن أن تحققها هذه التقنية. ينقسم عملنا إلى ثلاثة أجزاء. أولاً، أجرينا قائمة حصاد من المحاصيل التي تحققت خلال فترة الدراسة في الأبقار من السلالات المحسنة التي تنتمي إلى المحطات والمزارع الخاصة بعد علاج الإباضة الكلاسيكية (8 حقن FSH في مدة 12 ساعة). تم إجراء مجموعه ثلاثة وثلاثون حصاداً، وتم الحصول على ما معدله 11.06 CJ ( الجسم الأصفر)، وهو ما يمثل نتيجة متوسطة. أنتجت المحاصيل في المتوسط 6.3 أجنة، وهو أقل من تلك التي ذكرت في المقالات العلمية. يمكن ذكر عدة عوامل، أهمها التغذية التي لها تأثير معين على إنتاج الأجنة، وقد أبلغ العديد من الباحثين عن هذه الحقيقة.

في خطوة ثانية، حاولنا التحقق من فعالية علاج الإباضة الفائقة مع 3 حقن من FSH على فترات 24 ساعة ومقارنتها مع نتائج البروتوكول الكلاسيكي (8 حقن في فواصل زمنية 12 ساعة). تم إجراء 23 محصولاً في 8 بقرات تتراوح أعمارهم بين 3 و 6 سنوات، وتم تقسيمها إلى مجموعتين كل منهما أربعة. تلقت المجموعة الأولى 8 حقن في فواصل زمنية مدتها 12 ساعة، وتلقت المجموعة الثانية 3 حقن إلى 24 ساعة عن بعضها، وتلقت الأبقار من المجموعتين حقن البروستاغلاندين في اليوم الثالث من علاج الإباضة وتلقيح اصطناعي مزدوج في اليوم الخامس، تم تنفيذ الحصاد في اليوم الثاني عشر (7 أيام بعد التلقيح). كان متوسط عدد الأجسام الصفراء التي تم الحصول عليها 9.1 لكل بقرة للمجموعة 1 و 10.4 في المجموعة 2، مما يشير إلى تفاعل مبيض ضعيف. تم الحصول على مجموع 140 من الأجنة بمعدل 6.08 لكل بقرة، وقد تكون هذه النتيجة بسبب أخطاء في تسيير تربية الماشية. من الأجنة التي تم حصادها 46% و 56% كانت قابلة للتحويل على التوالي للمجموعة 1 و 2. تم تسجيل زيادة طفيفة في الجودة في المجموعة 2 بمتوسط جنين قابل للنقل 3.8، مقارنة مع 2.2 للمجموعة 1.

في الجزء الثالث، حاولنا تحديد تأثير توازن الطاقة على رد فعل المبيض من الأبقار التي تخضع لعلاج الإباضة الفائقة. يتم تحقيق متابعة توازن الطاقة من خلال فحص بعض المعايير الكيميائية الحيوية (AGNE، BHB، نسبة السكر في الدم) ومتابعة ملاحظة حالة الجسم قبل وأثناء العلاج. تظهر النتائج درجة حالة ثابتة من 2.8 خلال 5 زيارات. تظهر نتائج BHB كحد أقصى متوسطه 1.23 مليمول / لتر مع تركيز 2.2 مليمول / لتر في البقرة 2 أثناء الملاحظة الأولى، وانخفاض في الملاحظات الأخرى. أظهرت نسبة السكر في الدم تبايناً من 0.5 إلى 0.76 جم / لتر مع تركيز أقصى يبلغ 1.01 جم / لتر في البقرة 2 أثناء الملاحظة الثالثة. بالنسبة لـ AGNE، أظهر التركيز زيادة في التركيزات في العينات الثالثة والرابعة للأبقار 3 و 4 و 5 مع قيمة قصوى 1.36 مليمول / لتر في العينة الثالثة، وهذه النتائج توضح تعبئة احتياطي الجسم في جميع الأبقار في مراحل مختلفة من التجربة. كان لتوازن الطاقة السلبي المتجسد في تعبئة احتياطي الجسم تأثير على رد فعل المبيض بعد معالجة الإباضة في 5 متبرعين بمعدل 10 CJ / حصاد، لا توجد حصيلة قابلة للتطبيق، أجنة عديدة الإبلاغ عن تأثير كبير في توازن الطاقة السلبية على خصوبة البقر بشكل عام وعلى نتائج حصاد الأجنة.

الكلمات المفتاحية: الماشية، الإباضة، مقتطفات الغدة النخامية، توازن الطاقة

## SUMMARY:

Embryo production in cattle may be an alternative to the decline in fertility attributed to breeding. However, the variability of the response of cows to superovulation treatments is a limiting factor. In Algeria very few embryo production trials have been carried out despite the quality gain that this technique could bring. Our work is divided into three parts. Firstly, we carried out an inventory of the collects realized during the study period in cows of improved breed belonging to stations and private farms following a classic superovulation treatment (8 injections of FSH at 12 hours interval). A total of thirty-three collects were made, an average of 11.06 CJ/collect was obtained, which is considered a mean ovarian reaction. Crops yielded an average of 6.3 embryos/ collect, which is lower than those reported in the literature. Several factors can be incriminated; mainly food which has a certain influence on the production of embryos, this fact is reported by several authors.

In a second step we tried to verify the effectiveness of a superovulation treatment with 3 injections of FSH at 24 hours intervals and compare it with the results of a traditional protocol (8 injections at 12 hour intervals). Twenty-three collects were conducted in 8 cows aged 3 to 6 years and divided into two groups of four each. The first group was given 8 injections at 12-hour interval and the second received 3 to 24 hours apart, cows in both groups received an injection of prostaglandin on the 3rd day superovulation treatment and a double artificial insemination at the 5th day, the collect was carried out on the 12th day (7 days after insemination). The average number of corpora lutea obtained was 9.1 per cow for group 1 and 10.4 in group 2, which indicates a weak ovarian reaction. A total of 140 embryos were collected with an average of 6.08 per cow, this result may be due to errors in breeding and rationing. Among the embryos collected 46% and 56% were transferable respectively for group 1 and 2. A low gain in quality was recorded in group 2 with a transferable embryo average of 3.8 compared to 2.2 for group 1.

In a third part, we tried to identify the influence of energy balance on the ovarian reaction of cows subjected to a superovulation treatment. The exploration of the energetic balance is materialized by the assay of some biochemical parameters (AGNE, BHB, glycemia) and a follow-up of the note of body condition

before and during the treatment. The results show a stable BCS with 2.8 during the 5 visits made. The BHB results show a mean maximum of 1.23 mmol/l with a concentration of 2.2 mmol/l in the cow 2 during the first observation, and a decrease in the other observations. Glycemia showed a variation of 0.5 to 0.76 g/l with a maximum concentration of 1.01 g / l in cow 2 during the 3<sup>rd</sup> observation. NEFA concentration showed increased concentrations in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> sample for the cows 3, 4 and 5 with a maximum value of 1.36 mmol/l in the 3<sup>rd</sup> sample. These results overall show a mobilization of body reserves at all cows at different stages of the experiment. The negative energy balance materialized by mobilization of body reserves has had an impact on ovarian response following treatment of superovulation in 5 donors with an average of 10 CJ/collect, no collect yielded viable embryos, several authors report a significant influence of the negative energy balance on cow fertility in general and on the results of embryo collects.

Key words: cattle, superovulation, pituitary extracts, energy balance.

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail j'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur LAFRI Mohamed pour nous avoir fait l'honneur de présider cet honorable jury.

A Monsieur le professeur KHELEF Djamel pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail, pour ces encouragements, et sa bienveillance.

A Monsieur le Docteur KHIATI Baghdad pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail, pour sa gentillesse et sa bienveillance.

A Monsieur le professeur KAIDI Rachid, pour m'avoir encadré dans ce travail, pour son aide précieuse, son soutien morale et scientifique.

A Monsieur le Docteur TOUATI Kamal, pour avoir accepté la Co-direction de ce travail, pour son soutien logistique, et m'avoir permis de réaliser mes stages dans le cadre de ma thèse à l'université de Liège.

A Monsieur BOUCHEMAL Allaoua Directeur général du Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (CNIAAG), pour son soutien et ses encouragements.

Au personnel scientifique, technique et administratif du CNIAAG, notamment Mr BOUDJAKDJI A., AIT AMEUR M, Mme BENOURETH H., Mr BERDAOUI M., les vétérinaire et le personnel de la station et les vachers de la ferme du CNIAAG

Au défunt Monsieur MAGHNI directeur général du CNIAAG, pour son aide logistique. Puisse Dieu lui accorder sa miséricorde.

Au personnel de la Station Expérimentale de l'Université de Blida, notamment les ouvriers et les vachers pour leur aide précieuse et désintéressée.

Au propriétaire de l'élevage de la Chiffa, Mr EZZERAIMI pour nous avoir accueillis au sein de son élevage, au Docteur EZZERAIMI H. pour son aide et son soutien, pour tout le personnel de la ferme EZZERAIMI.

A Monsieur le Directeur de l'institut des sciences vétérinaires, les collègues enseignants, le personnel administratif et technique ainsi que mes étudiants et mes anciens étudiants pour leurs encouragements.

A Monsieur le Professeur BECKERS J.F. pour nous avoir fourni une partie des hormones, ainsi que pour ses orientations précieuses.

Au Professeur DJAZOULI Z. et Docteur SAIDANI K. pour leur aide précieuse dans la réalisation de l'étude statistique

A Monsieur Benzarga Mohamed pour son soutien inconditionnel.

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à ce travail.



## DEDICACE

Je dédie ce travail

A feu ma mère, son souvenir demeurera inaltérable dans ma mémoire

A mon père qui m'a inculqué l'amour du savoir, qu'il trouve ici le fruit de son éducation et ces sacrifices.

A mon épouse Amina pour son soutien, ses encouragements et sa bienveillance, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

A mes enfants, Mahdi, Leila et Zahra qui ont été pour moi le réconfort qui m'a permis de mener ce travail à terme.

A ma sœur Wissam et mes frères Nazim et Issam, pour leur soutien et leur bienveillance.

A mon oncle Toufik pour son soutien moral.

A mon oncle Kamal pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail.

A ma belle-mère pour sa bienveillance.

A mes belles sœurs pour leur gentillesse et leur bienveillance ainsi que mes beaux-frères.

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	16
-----------------------	----

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### CHAPITRE 1 : PHYSIOLOGIE DU FONCTIONNEMENT OVARIEN

1.1. Introduction	19
1.2. Folliculogenèse	19
1.2.1. Phase de multiplication	19
1.2.2. Phase de croissance	20
1.2.2.1. Le follicule primordial	21
1.2.2.2. Le follicule primaire	21
1.2.2.3. Le follicule secondaire	22
1.2.2.4. Le follicule tertiaire	22
1.2.2.5. Le follicule mur ou follicule de De Graaf	22
1.2.3. La phase de maturation	23
1.3. L'atrésie folliculaire	24
1.4. Dynamique de la croissance folliculaire	25
1.4.1. Recrutement	25
1.4.2. Sélection	25
1.4.3. Dominance	26

#### CHAPITRE 2 : SUPEROVULATION ET PRODUCTION D'EMBRYONS

2.1. Introduction	28
2.2. Critères de choix des donneuses	28
2.3. Hormones utilisées	29
2.3.1. Equine chorionique gonadotrophine (eCG)	29
2.3.2. Les extraits hypophysaires (FSH)	29
2.3.4. Gonadotrophine Releasing Hormone (La GnRH)	30
2.3.5. La Human Menopausal Gonadotrophin (hMG)	30
2.4. Schéma des traitements inducteurs	30
2.4.1. Traitement à l'eCG	30

2.4.2.	Traitement à base d'extraits hypophysaires	31
2.5.	Facteurs de variation de la réponse au traitement de superovulation	31
2.5.1.	Facteurs intrinsèques	31
2.5.1.1.	La race	31
2.5.1.2.	L'âge	32
2.5.1.3.	Le niveau de production laitière	32
2.5.1.4.	Le statut ovarien	33
2.5.2.	Facteurs extrinsèques	33
2.5.2.1.	La saison	33
2.5.2.2.	Conduite de l'alimentation	34
2.5.2.3.	Traitement de superovulation	35
2.5.2.4.	Stress et état sanitaire	37

### **CHAPITRE 3 : PRODUCTION D'EMBRYONS ET STATUT ENERGETIQUE**

3.1.	Introduction	39
3.2.	Balance énergétique	39
3.3.	Marqueurs du Statut énergétique	41
3.3.1.	La note d'état corporelle (BCS)	41
3.3.2.	Mesure de l'épaisseur de la graisse	43
3.3.3.	Les acides gras non estérifiés (AGNE)	43
3.3.4.	Les corps cétoniques	45
3.3.5.	Glycémie	46
3.3.6.	Insuline	47
3.3.7.	Cholestérol	47
3.3.8.	Les marqueurs hépatiques	48
3.4.	Balance énergétique et production d'embryons	49

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE 4 : INVENTAIRE DES RESULTATS DES RECOLTES D'EMBRYONS EN ALGERIE DURANT LA PERIODE D'ETUDE CHEZ LES VACHES AMELIOREES**

4.1.	Introduction	51
4.2.	Matériel et méthode	51

4.2.1.	Lieu et période de l'expérimentation	51
4.2.2.	Animaux	52
4.2.3.	Matériel de récolte	52
4.2.4.	Hormones et médicaments	53
4.2.5.	Traitement de superovulation	53
4.2.6.	Récolte	54
4.2.7.	Analyse statistique	55
4.3.	Résultats	55
4.4.	Discussion	57
4.5.	Conclusion	58

## **CHAPITRE 5 : REACTION DES VACHES AUX TRAITEMENTS DE SUPEROVULATION EN FONCTION DE LA FREQUENCE D'INJECTION DES EXTRAITS HYPOPHYSAIRES**

5.1.	Introduction	60
5.2.	Matériel et méthode	60
5.2.1.	Animaux	60
5.2.2.	Milieux et médicaments	61
5.2.3.	Matériel de collecte	61
5.2.4.	Traitements de superovulation et récoltes	62
5.2.5.	Analyse statistique	65
5.3.	Résultats	65
5.4.	Discussion	67
5.5.	Conclusion	69

## **CHAPITRE 6 : EFFET DU STATUT ENERGETIQUE SUR LA REACTION OVARIENNE DES VACHES SOUMISES A UN TRAITEMENT DE SUPEROVULATION**

6.1.	Introduction	70
6.2.	Lieu et période de l'expérimentation	70
6.3.	Matériel et méthodes	70
6.3.1.	Animaux	70
6.3.2.	Matériels de dosage	71
6.3.3.	Choix des animaux	71
6.3.4.	Evaluation de l'état corporel	71

6.3.5. Profil biochimique	72
6.3.5.1. Prélèvements	72
6.3.5.2. Dosage du BHB et la glycémie	72
6.3.5.3. Dosage des AGNE	72
6.3.6. Analyse statistique	73
6.4. Résultats	73
6.4.1. Suivi du NEC	73
6.4.2. Les paramètres biochimiques	74
6.5. Discussion	77
6.5.1. Note d'état corporelle	77
6.5.2. Paramètres biochimiques	77
6.5.2.1. BHB	77
6.5.2.2. Glycémie	78
6.5.2.3. AGNE	79
6.5.3. Réaction ovarienne le jour de la récolte	80
6.5.4. Corrélations entre les différents paramètres	80
6.6. Conclusion	81
CONCLUSION GENERALE	83
RECOMMANDATION	84
RÉFÉRENCES	
ANNEXES	

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Principales étapes du développement folliculaire [29]	21
Figure 1.2 : Concentration des stéroïdes sexuels durant le cycle œstral chez la vache [6].	26
Figure 3.1 : Evolution théorique de la note d'état corporel chez les vaches laitières primipares et multipares [154]	42
Figure 4.1 : protocole de superovulation	53
Figure 4.2 : Schéma du positionnement de la sonde pour la récolte	55
Figure 5.1 : Matériel de collecte disposé à l'étable à proximité de la donneuse	62
Figure 5.2 : Matériel d'observation et de recherche des embryons.	62
Figure 5.3 : Rinçage des cornes utérines	64
Figure 5.4 a et b : Embryons transférable (a) et non transférable (b) issus d'une même récolte	65
Figure 5.5 : graphe des tendances de la qualité des embryons	67
Figure 6.1 : Matériel de dosage	71
Figure 6.2 : graphe récapitulatif de différentes concentrations des paramètres biochimiques	77
Tableau 2.1 : Variation des résultats des récoltes d'embryons chez le bovin en fonction de la race [78].	32
Tableau 4.1 : Evaluation de la réaction des vaches au traitement de superovulation	56
Tableau 4.2 : Evaluation de la qualité des embryons récoltés	56
Tableau 5.1 : résultats des récoltes des deux groupes	66
Tableau 5.2: comparaison de la qualité des embryons des deux groupes (G1: Group 1 G2: group 2)	66
Tableau 6.1 : suivie du BCS	74
Tableau 6.2 : Résultat de dosage du BHB	74

Tableau 6.3 : Résultat de dosage de la glycémie	75
Tableau 6.4 : Résultat de dosage des AGNE	75
Tableau 6.5 : Comparaison des concentrations moyennes individuelles des paramètres et la réaction ovarienne (CJ)	77

## INTRODUCTION GENERALE

L'amélioration de la fertilité est un souci majeur et un objectif prioritaire pour l'éleveur bovins afin d'optimiser le potentiel de production de ses animaux. Beaucoup d'efforts ont été concentré sur l'amélioration génétique et la sélection d'animaux plus productifs [1]. Le gain apporté par la sélection a eu des conséquences certaines sur la fertilité, Barbat et all [2] rapporte que chez la Prim'holstein, 30 à 50% du déclin du taux de réussite en première insémination est imputable à l'amélioration génétique axée sur l'augmentation de la production laitière. En Algérie le taux de réussite en première insémination varie de 50% [3] à 18.16% [4].

Avec une moyenne de 140 litres par habitant et par an, l'Algérie fait partie des plus grands consommateurs de lait dans le monde. En effet elle est classée deuxième importateur mondial de poudre de lait après la chine. L'office national interprofessionnel du lait (ONIL) rapporte que l'Algérie a enregistré une facture de 1,45 milliards de dollars pour l'importation de poudre de lait et de produits laitiers, ce qui représente 12 % de la facture alimentaire du pays. Selon le ministère de l'agriculture et du développement rural la production laitière a atteint 2,5 milliards de litre de lait de vache durant l'année 2017.

La production de lait de vache en Algérie, a été estimée en 2017 à 2,5 milliards de litres, une étude réalisée en 2012 a rapporté que 50% du lait est produit par 30% du cheptel [5]. Ce constat dénote le faible potentiel génétique de l'outil de production laitière à l'origine d'une augmentation du cout de revient du litre de lait. Une des voies d'amélioration de la productivité des vaches en Algérie, serait d'orienter la conduite d'élevage vers la sélection d'individus plus performants. L'insémination artificielle, introduite en Algérie depuis les années soixante-dix a permis une amélioration génétique apporté du côté paternel. Afin de profiter du potentiel génétique des deux ascendants la production et le transfert d'embryons représente une très bonne alternative. La sélection opérée aussi bien du côté paternel que maternel, l'utilisation de mère porteuses de race locale rustiques résistantes aux maladies et la naissance de veaux avec un potentiel génétique élevé adaptés aux condition du pays auront pour effet une multiplication rapide de bovins avec un potentiel de production intéressant



Les connaissances acquises dans le domaine de la physiologie ovarienne, et des mécanismes de la croissance folliculaire confortées par le développement de l'échographie, ont permis de mettre en place des traitements hormonaux afin de limiter le gaspillage des follicules par atrophie, 99% de la réserve folliculaire ovarienne est perdue en cours de route [6] ; [7] ; [8] ce qui ne permet pas de multiplier le potentiel génétique des femelles d'élite.

Le principe de ces traitements est d'apporter aux follicules les gonadotrophines (exogènes) dont ils manquent, pour éviter leur atrophie permettre à un plus grand nombre d'ovuler [9]. Plusieurs hormones ont été proposées dont deux ont été largement utilisées, la première est l'eCG (equine chorionique gonadotrophine) [10] ; [11]; [12] obtenue à partir de sérum de juments gravides, elle est douée d'une activité FSH et LH, administré en une injection unique. Sa longue demi-vie (environ 5 jours) [13] représentait un frein au développement des embryons en raison d'une activité résiduelle même après insémination. L'introduction d'une anti-eCG neutralisant l'hormone au moment opportun a permis une nette amélioration des résultats [14], mais ce traitement a été abandonnée en faveur de l'utilisation des extraits hypophysaires purifiés comportant essentiellement de la FSH et de la LH à des proportions bien définies [15] ; [11]. La faible teneur en acide sialique de la FSH lui confère une demi-vie très courte (de l'ordre de 5 heures) évitant toute activité résiduelle, cela présente néanmoins l'inconvénient de multiplier les injections car au bout de 12 heures l'hormone n'est plus détectable dans la circulation sanguine [13].

En Algérie très peu de travaux ont été réalisées dans le domaine de la production d'embryons chez la vache. Un nombre moyen de 4 embryons par vache a été enregistré en 2003 dans un essai en station [16]. Dans les populations bovines autochtones les premiers résultats ont été obtenus en 2004 avec une moyenne de 5 embryons collectés par vache et 2.33 transférables [17].

Cependant, la grande variabilité des résultats de production d'embryons, pour des raisons multiples, constitue un facteur limitant. En effet une vache soumise à un traitement peut donner de 0 à 50 embryons. Nibart [11] rapporte que 10 à 20% des vaches ne donnent aucune réponse au traitement de superovulation, et 24% des récoltes ne donnent aucun embryon viable [18]. Cette variabilité est due à des facteurs intrinsèques liés à l'animal et d'autres extrinsèques liés à l'environnement. Parmi ces facteurs nous retrouvons le mode

de traitement de superovulation [19]. La multiplicité des injections lors d'un traitement de superovulation à base de FSH (8 injections à 12 heures d'intervalle) pourrait produire un effet stressant néfaste au développement des embryons. La réduction de son impacte pourrait être apportée par une diminution du nombre d'injections. Certains travaux ont étudié l'effet de la fréquence d'injection des hormones de la superovulation sur les résultats des récoltes, Kimura et al [20] ont effectué une seule injection en utilisant du gel d'hydroxyde d'aluminium comme excipient, aucune différence significative n'a été observé comparativement au protocole classique (8 injections).

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, d'étudier la réaction des vaches de race améliorées (importées) aux traitements de superovulation, et de définir une moyenne d'embryons produit qui pourrait constituer un point de départ, voir une références pour les travaux dans le domaine en Algérie. Dans un deuxième temps une exploration du bilan énergétique des donneuses à travers des dosages biochimiques, métaboliques et hormonaux, sera effectuée afin d'analyser de manière objective les résultats des récoltes embryonnaires réalisées. Cela nous permettra d'optimiser les résultats de production d'embryons en agissant sur la conduite d'élevage et de limiter l'influence des facteurs limitants.

Une troisième partie a pour but d'étudier l'efficacité d'un traitement de superovulation en réduisant le nombre d'injections d'hormones hypophysaires. Une comparaison sera faite avec le protocole classique contraignant et imposant un coût plus élevé en raison de multiplicité des interventions sur l'animal.

Des recommandations seront proposées vers la fin concernant l'opportunité de développer cette technique en Algérie et les règles qui doivent être respectées pour une optimisation des réaction des vaches au traitement de superovulation et arriver à une moyenne d'embryons utilisable qui puisse apporter un bénéfice pour la transmission des caractéristique productives des animaux d'élite.

## CHAPITRE 1 : PHYSIOLOGIE DU FONCTIONNEMENT OVARIEN

### 1.1. Introduction :

L'ovaire des mammifères assure deux fonctions essentielles : la première est endocrinienne, en effet les quantités les plus importantes de stéroïdes sexuels sont produites à son niveau, mais aussi des peptides intervenant à différentes phases et niveaux de manière endocrine paracrine ou autocrine.

La deuxième fonction est « exocrine » car c'est à partir de l'ovaire que sont expulsés les ovules dans les trompes utérines pour y être fécondés. Au préalable les ovules subiront un certain nombre de changements morphologique et biochimique leur permettant d'acquérir la compétence à la fécondation. Ces changements se feront de manière parallèle au développement d'une structure intimement lié à l'ovule qui est le follicule ovarien, c'est l'ensemble de ses phénomènes que nous désignons sous le terme de folliculogénèse.

Sur le plan fonctionnel la folliculogénèse est subdivisée en deux phases successives : la croissance folliculaire basale gonado-indépendante et une croissance de type cyclique gonado-dépendante [8]. Sur le plan morphologique et cinétique la folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement folliculaire. Elle commence par le début du développement du follicule primordial et se termine avec l'ovulation ou l'atréisie.

### 1.2. Folliculogénèse :

Le développement folliculaire chez la vache passe par 3 étapes : phase de multiplication, phase de croissance, phase de maturation.

#### 1.2.1. Phase de multiplication :

Après la fécondation, chez l'embryon femelle, une fois l'endoderme, le mésoderme et ectoderme ont été formés, un groupe de cellules dérivées de l'endoderme se différencie pour former les cellules germinales primordiales (PGC) à partir desquelles les ovocytes vont se développer [21]; [22]. Autour du 30<sup>ème</sup> jour chez la vache, se développent les crêtes génitales, futures ovaires [23]. A la septième semaine de gestation chez la vache, les cellules germinales primordiales (cellules souches d'origines extra embryonnaires) colonisent après leur migration au travers de l'embryon le long de mésentère dorsal de l'intestin postérieur, la

crête génitale qui se développe et donnent naissance aux ovogonies [6], les cellules germinales souche après leur migration vont se multiplier entre le soixantième et le cent-soixante deuxième jour de gestation [24]. Durant leur migration les ovogonies continuent à se multiplier par méiose [23] qui débute entre le 75<sup>ème</sup> et le 80<sup>ème</sup> jour et se bloque au stade diplotène de la prophase 1.

Les cellules germinales primordiales migrent vers le tube digestif, puis vers les gonades primitives à travers le mésentère [25]; [26]; [23]. Sous l'influence des cellules germinales primordiales qui y ont migré, l'épithélium cœlomique et le mésonephros adjacents prolifèrent et forment les cordons sexuels primitifs. Ceux-ci abritent les gonocytes et donnent naissance aux tissus spécialisés qui assureront la nutrition et le contrôle de la différenciation des gamètes sexuels définitifs : la granulosa des follicules ovariens

Pendant la gestation une réserve de deux (02) millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase 1 pour donner des ovocytes 1.

L'induction de la méiose serait contrôlée par un facteur d'origine méso-néphrotique appelé MIS (Meosis inducing substance) synthétisé par les cellules mésenchymateuses de l'ovaire [27], le contact des ovogonies avec les cellules d'origines méso-néphrotique est donc indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires.

### **1.2.2. Phase de croissance :**

C'est la phase qui sépare le moment où les follicules sortent de réserve ovarienne et l'ovulation, elle est particulièrement longue 5 mois [6], bien au-delà de la durée du cycle chez la plupart des mammifères. Cette étape ne concerne que 10% de follicules, 1% seulement vont ovuler [8].

Cette phase se caractérise par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme dont la succession abouti à l'ovulation lorsque les conditions le permettent (Figure 1.1). Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordiale, primaire et secondaire, constituent les follicules préantaux, puis les stades tertiaires et préovulatoire ou de De Graaf représentant les follicules antraux [28].

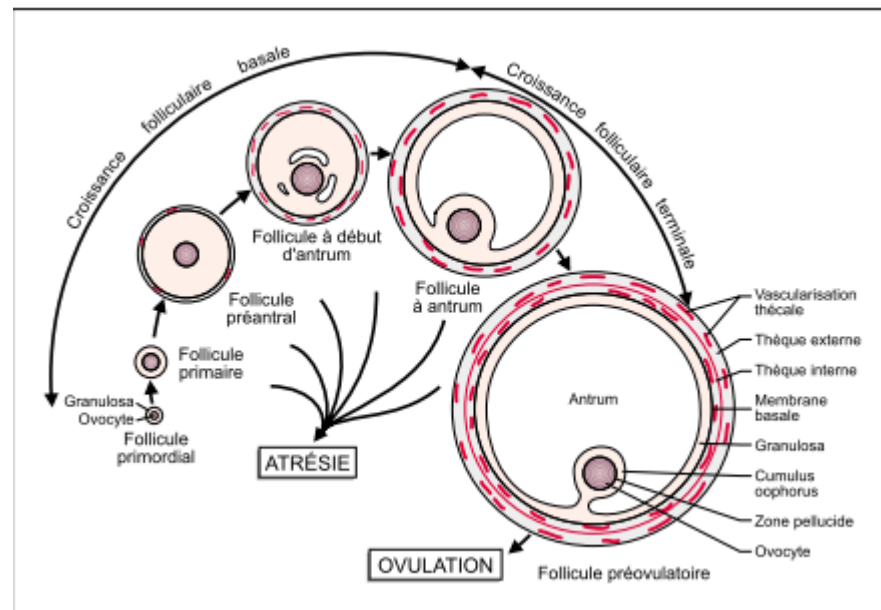


Figure 1 .1 : Principale étapes du développement folliculaire [29]

#### 1.2.2.1. Le follicule primordial :

Cette étape coïncide avec l'isolement et l'arrêt méiotique des ovocytes pendant l'ovogenèse. Chaque follicule primordial contient un ovocyte primaire bloqué en prophase 1 de la première division méiotique [30], avec une seule couche de cellules somatiques aplaties, aussi appelées cellules de granulosa [31]. Ce complexe est entouré d'une membrane basale qui sépare le follicule du stroma fibreux ovarien. En effet, cette association entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa est essentielle à l'arrêt méiotique car sans celle-ci, l'ovocyte dégénère suite à la reprise de méiose [32]. Cette population de follicule, qui est à son maximum pendant la vie fœtale, représente la réserve d'ovocytes pour la vie reproductive de la vache [33].

#### 1.2.2.2. Le follicule primaire :

Ce caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par l'agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques [31]. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse appelée zone pellucide (ZP). Cette enveloppe est formée de trois glycoprotéines : la ZP1, ZP2, ZP3, cette

dernière est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique [34].

#### **1.2.2.3. Le follicule secondaire :**

Durant cette phase l'ovocyte atteint son volume maximal, il s'est entouré d'une zone pellucide bien différenciée et de deux ou trois couches de cellules cubiques formant la granulosa [35]. L'ensemble est limité extérieurement par la membrane basale qui s'est transformée en membrane de Sklavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de protéohéparane sulfate.

#### **1.2.2.4. Le follicule tertiaire :**

Il est dit cavitaire ou antral à cause de l'apparition au sein des cellules folliculaire, de petites cavités contenant un transsudat plasmatique et de la sécrétion des cellules de granulosa. Ces cavités vont progressivement confluer pour une seule grande cavité appelée antrum. Avec le développement progressif de l'antrum, deux structures apparaissent autour de l'ovocyte, le cumulus oophorus et la corona radiata. Les cellules de la corona et du cumulus présentent de nombreuses zones jonctionnelles (GAP jonction), qui constituent un moyen privilégié de communication entre l'ovocyte et la cavité folliculaire.

Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante, compris entre 25 et 50, il dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules qui s'atrévient [36]. A ce stade, le follicule cavitaire s'entoure, en dehors de la membrane de Slavjansky, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riche en ARN (acide ribonucléique) et en enzymes nécessaires à la stéroïdogénèse, et par la thèque externe formée d'un tassement de tissu conjonctif du stroma ovarien.

#### **1.2.2.5. Le follicule mur ou follicule de De Graaf :**

Il représente la phase terminale du développement folliculaire, cette phase ne concerne qu'un follicule sur mille entré en croissance, le follicule mur se caractérise par une taille maximale de 25 mm, par un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse. Gonflé de

liquide, le follicule affleure en surface de l'ovaire, l'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de corona radiata et du cumulus oophorus, les thèques internes et externes sont bien différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne qui est une glande à part entière.

La thèque externe est de nature fibreuse, une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et la membrane basale, chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0,13 mm atteigne la taille préovulatoire [37].

### **1.2.3. La phase de maturation :**

Cette phase représente l'ensemble des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte, ces différentes modifications lui donne l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, lorsque l'ovocyte a atteint 80% de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa maturation nucléaire, c'est-à-dire la reprise de la méiose, celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire, l'ovocyte I se transforme alors en ovocyte II. La reprise de la division méiotique n'a lieu qu'après la décharge ovulante puis se termine avant l'ovulation. L'activation des récepteurs à la LH des cellules de granulosa induite lors de la décharge ovulante permet non seulement à l'ovocyte de reprendre sa méiose, mais également de réaliser sa maturation cytoplasmique, préalable essentielle au succès de la fécondation.

Le cytoplasme synthétise une protéine, l'ovopéroxydase pour préparer l'ovocyte à la fécondation et joue un rôle dans le développement précoce de l'embryon, au niveau membranaire se produit un ensemble de processus favorisant la reconnaissance spécifique de l'ovocyte par le spermatozoïde, un seul spermatozoïde fécondant doit pénétrer l'ovocyte sous l'effet de la membrane pellucide favorise et prépare la fusion entre le spermatozoïde et l'ovule et protège l'ovocyte contre la polyspermie [7].

### 1.3. L'atrésie folliculaire :

Le stock ovocytaire chez les mammifères est défini dès la naissance, il s'épuisera au fur et à mesure de la vie de l'animal. Une partie infime de cette réserve arrive au stade ovulatoire, 99% des follicules gégènèrent par atrésie [29]).

L'atrésie est un processus physiologique qui permet la régulation du nombre de follicules ovulatoires caractéristiques de 'espèce (un à deux chez la vache), en éliminant ceux en surnombre, inapte au développement ou endommagées [38]. Le mécanisme impliqué dans l'atrésie est complexe et non encore parfaitement élucidé, mais il se fait par une mort programmée des follicules en développement par apoptose.

Il existe deux types d'atrésies. La première tonique, elle concerne les follicules de la réserve ovarienne et ceux en début de développement, elle est indépendante du cycle œstral et se déroule tout au lent de la vie de l'animale. La deuxième est cyclique et concerne des follicules de taille plus grande, elle est inversement proportionnelle au niveau de FSH (follicule stimulating hormone) dans le sang.

Du point de vue fonctionnel l'atrésie est matérialisée par la mort des cellules de la granulosa par apoptose, la fragmentation de la membrane basale, une perte de la vascularisation de la membrane basale. Elle s'accompagne aussi d'un arrêt de 'expression de l'enzyme aromtase et une perte de la sensibilité à la gonadotrophine. Le déclenchement de ces phénomènes est la conséquence (dans des modèles expérimentaux) de la chute du niveau de gonadotrophine plasmatique. Chez des animaux hypophysectomisés, on observe dans les 24 heures qui suivent l'intervention une baisse drastique de la teneur en fibronectine et en récepteurs de l'IGF 2 (Insulinelike growth factor) /mannose 6 phosphate dans les cellules de la thèque, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'IGF<sub>2</sub> BP (binding protein) dans les cellules de la granulosa et de la thèque [39]. Cela a pour conséquence une disparition de l'aromatase dans la granulosa, considéré comme le marqueur précoce de l'atrésie. Cependant c'est l'apoptose, lorsqu'elle est massive, qui signe de manière certaine l'atrésie des follicules antraux. A de très faibles taux l'apoptose est un phénomène physiologique présent dans la quasi-totalité des follicules. La finalité de tous ces éléments est la dégénérescence



de la plupart des follicules empêchant ainsi l'expulsion de l'ovule, faisant de l'ovulation un événement exceptionnel et rare.

#### **1.4. Dynamique de la croissance folliculaire :**

La régulation de la croissance folliculaire est complexe chez la vache. A partir de la puberté, la croissance folliculaire est permanente et des vagues de croissance et d'atrésie se succèdent. A partir du pool de follicules ovariens (follicules primordiaux), 15 à 30 follicules vont commencer leur développement chaque jour et quitter la réserve. Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules tertiaires antraux de diamètre égal ou supérieur à 5 mm parmi lesquels apparaît le follicule dominant. Chez la vache, un cycle ne comporte habituellement que 2 à 3 vagues [40]. Chaque vague dure de 7 à 9 jours [41] et comporte un follicule dominant. Si 3 vagues sont observées, elles débutent en général aux 2<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jours du cycle [42]; [43]. Si 2 vagues sont observées, elles apparaissent aux 2<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jours du cycle [6].

Au bout de plusieurs mois, certains atteignent le stade de follicule tertiaire. Trois phénomènes vont ensuite se succéder : recrutement, sélection et dominance.

##### **1.4.1. Recrutement :**

C'est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicule gonado-dépendants, dont le nombre varie selon les auteurs de 2 à 5 follicules de taille comprise entre 3 et 6 mm [33] à 24 follicules de 3mm [44]; [41]. Le recrutement est un phénomène aléatoire, il est précédé par une augmentation des pulses de de FSH [45]; [46], ce qui a pour conséquence une augmentation des taux d'œstradiol et de d'inhibine entraînant par la suite un faible rétrocontrôle négatif [47].

##### **1.4.2. Sélection :**

Dès que les niveaux de FSH deviennent suffisamment faibles, le recrutement va cesser, ce qui conduit à l'émergence des follicules ovulatoires parmi ceux recrutés. Le follicule sélectionné correspond au premier follicule ayant acquis des récepteurs à LH (Luteinising hormone) [48], il se caractérise en outre

par sa production d'œstradiol et sa capacité de répondre aux gonadotrophines [49]. Le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'œstradiol, mais également d'inhibine qui par rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, diminue la production de FSH (figure 1.2). Seul le follicule sélectionné est capable de survivre dans cet environnement pauvre en gonadotrophines, les autres follicules recrutés entrent alors en atresie.

La fin de la sélection coïncide avec le phénomène de déviation folliculaire, permettant au follicule d'un certain diamètre d'induire la régression (par manque de FSH) des autres follicules considérés comme subordonnés [44].

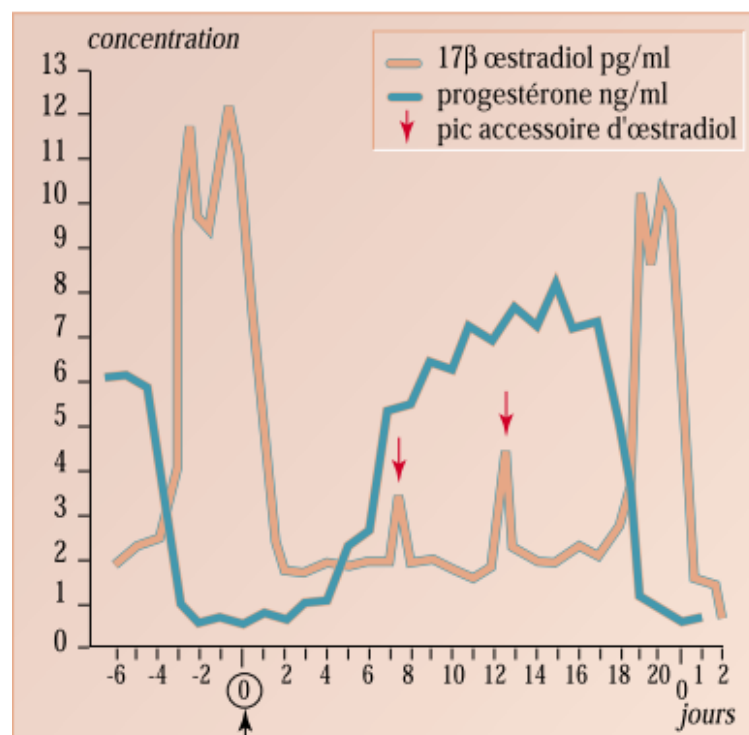


Figure 1.2 : Concentration des stéroïdes sexuels durant le cycle œstral chez la vache [6].

#### 1.4.3. Dominance :

. Elle fait suite à la sélection. Elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire. Le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression de follicules en croissance, ou d'inhiber la croissance d'autres follicules, et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié. La dominance correspond au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide de volume des follicules ovulatoires [50]. Cet effet semble être dû à des facteurs

inhibiteurs de la croissance, présent dans le liquide folliculaire [51]. Bien que l'environnement soit pauvre en FSH, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne lié notamment à la synthèse de l'IGF 1. La suite de l'évolution du follicule dominant dépend du niveau de concentration en progestérone, c'est-à-dire s'il y a lutéolyse, alors que le follicule dominant de la deuxième vague est en phase de croissance, il ovule. Si, à l'inverse, la progestéronémie se maintient à un niveau élevé après que le follicule dominant ait atteint sa taille maximale, il commence à régresser, et une autre vague de croissance apparaît [6].

## CHAPITRE 2 : SUPEROVULATION ET PRODUCTION D'EMBRYONS

### 2.1. Introduction :

La vache est une espèce mono-ovulante : le quota ovulatoire se limite dans les conditions physiologiques, à un seul ovocyte. L'amélioration génétique des vaches laitières a conduit à une spectaculaire augmentation de la production de lait et cela a été associé avec une diminution des performances de reproduction [52] ; [53]. Afin de tenter de freiner cette tendance à la baisse de fertilité, de nouveaux programmes de sélection tenant compte des index de fertilité ont été mis en place dans la plus part des pays [54]. L'objectif des traitements de superovulation chez la vache est d'obtenir le nombre maximal d'embryons fécondés et transférables avec une forte probabilité de produire des gestations [55]. Aussi la superovulation est-elle un traitement hormonal qui aide à la production d'un nombre d'ovulation supérieur à deux à l'intérieur d'un cycle sexuel. La découverte de cette technique revient à Casida et al. [56].

### 2.2. Choix et critères des donneuses :

La donneuse doit être choisie sur la base de son potentiel génétique, de son statut physiologique, de ces performances zootechniques. En effet elle doit faire la preuve de la supériorité génétique [57], la production d'embryons est une technique qui est destinée dans tous les cas de figures à des femelles d'élite. Une fois le mérite génétique prouvé, la donneuse doit répondre à des critères physiologiques, elle doit être pubère (8 mois d'âge au minimum), la plupart sont des vaches (primipares) dont les performances reproductives sont bien connues [58]. La vache ne doit pas être gestante depuis au moins 70 jours avant la superovulation [55]), période à laquelle, l'impact du bilan énergétique (négatif) diminue progressivement et permet une reproduction efficace [59]. L'examen générale et génitale vient compléter les critères de choix [55], une future donneuse ne doit présenter aucune pathologie ayant une influence directe ou indirecte sur la reproduction, tel qu'une pathologie respiratoire digestive ou même podale, toute pathologie gynécologique est aussi un élément discriminatoire car l'intégrité de l'appareil génitale et la régularité du cycle œstral sont des conditions préalables à toute opération de récolte d'embryons.

Certains auteurs rapporte une sélection des vaches sur la base des niveaux de progestérone dans le sang ou le lait [60] ; [61]. En effet selon Herller et al. [61], les vaches qui présentent des concentrations inférieures à 10.7 ng/ml donnent moins de corps jaune, d'embryons et d'embryons transférables.

En conclusion une donneuse d'embryons est une génisse ou une vache primipare ayant un potentiel génétique avéré, des performances zootechnique répondants aux objectifs de production recherchés, sans aucune pathologie gynécologique et avec un cycle régulier.

### **2.3. Hormones utilisées:**

#### **2.3.1. Equine chorionique gonadotropin (eCG):**

L'eCG ou PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) est extraite du sérum de jument gravide entre le 40<sup>ème</sup> et le 180<sup>ème</sup> jour de gestation [62]. C'est une glycoprotéine riche en hydrate de carbone, avec un taux d'acide sialique de 13.5%, ce qui lui confère une demi-vie de 5 à 6 jours L'activité biologique de l'eCG associe celle de la FSH et de la LH avec un rapport variant de 1/1 à 1/5, [63]. L'inconvénient de cette hormone est l'effet résiduel important qu'elle produit en raison de sa demie vie très longue, ce entraine l'apparition de kystes folliculaires multiples sur l'ovaire.

#### **2.3.2. Les extraits hypophysaires (FSH):**

Les extraits hypophysaires d'origine porcine le plus souvent, mais aussi bovine, ou ovine, sont de plus en plus largement utilisés. Avec une teneur faible en acide sialique (5%) la pFSH possède une demi-vie très courte (5 à 6 heures), de ce fait elle n'est plus détectable 12 heures après l'injection [13]. Nibart [11] expliquent la nécessité du maintien d'un taux sanguin suffisant par deux injections quotidiennes avec un intervalle de 12h entre les deux [64]. Dans la plupart des cas la FSH est donnée deux fois par jour pendant quatre jours [65] ; [66]. La prostaglandine est injectée 48 ou 72h après l'initiation du traitement pour induire la lutéolyse. L'œstrus et la libération préovulatoire de LH surviennent dans les 36 à 48h, avec l'ovulation subséquente de 24 à 36h plus tard [67].

### **2.3.3. Gonadotropin Releasing Hormone (La GnRH):**

La GnRH seule s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation, mais peut être utilisée en association à d'autres schémas. Certains échecs d'ovulation et de fécondation chez les animaux donneurs d'embryons ont été imputés à une absence de libération [68] ; [69] ou à une libération anormale [70] de l'hormone LH lors de l'œstrus suivant un traitement de superovulation. Certains auteurs observent l'effet bénéfique de son injection après un traitement de superovulation à base de PMSG [71] ; [72] ou de pFSH [73].

### **2.3.4. La Human Menopausal Gonadotropin (hMG):**

Une purification de ces molécules dans l'urine de femme ménopausée permet d'utiliser l'hMG en médecine vétérinaire [74]. Ainsi, au Japon, [75] ont étudié des méthodes d'administration d'hMG pour induire la superovulation chez des vaches noires japonaises. Ils ont conclu que la superovulation pouvait être induite de façon correcte par une seule injection de 450-600 UI hMG dissoute dans de la polyvinylpyrrolidone (PVP).

L'hMG fournit des résultats comparables à ceux de l'eCG seul, mais avec un coût est plus élevé. Son utilisation a été abandonnée à la faveur de préparations plus efficaces et moins coûteuses.

## **2.4. Schéma des traitements de superovulation :**

### **2.4.1. Traitement à l'eCG :**

Du fait de la longue demi-vie de l'eCG le protocole de superovulation ne comporte qu'une seule injection de 2500 à 3000 UI en intramusculaire entre le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour du cycle [76]. Une injection de prostaglandine est réalisée deux jours plus tard afin d'induire la lyse du corps jaune et l'apparition des chaleurs. Deux inséminations à 12 heures d'intervalle sont pratiquées sur chaleurs observées.

Le traitement peut aussi être réalisé sur cycle maîtrisé, un dispositif progestatif est mis en place à n'importe quel moment du cycle, l'eCG est injecté 6

à 7 jours après (en fonction de la durée du traitement progestatif), l'insémination est réalisée 36 à 48 heures après retrait du dispositif.

En raison de l'effet résiduel néfaste dû à la durée de demi-vie très longue, une injection d'anti-eCG est associée au traitement le jour de l'insémination artificielle.

#### **2.4.2. Traitement à base d'extraits hypophysaires**

Contrairement à l'eCG, les extraits hypophysaires possède une demi-vie très courte, en effet 12 heures après injection ils deviennent indétectables dans le sang [13], ce qui implique une répétition des injections pour maintenir des niveaux de FSH suffisants. Le traitement débute au même moment qu'avec l'eCG, c'est-à-dire 8 à 12 jours après observation des chaleurs de références, le traitement classique comporte 8 injections à 12 heures d'intervalle et à doses décroissantes. Une injection de prostaglandine au troisième jour du traitement permet provoquer la lyse du corps jaune, une double insémination est réalisée sur observation des chaleurs.

L'utilisation d'un dispositif progestatif, permet d'initier le traitement sans prendre en considération le jour du cycle. La superovulation débute 6 à 7 jours après mise en place du dispositif progestatif, la prostaglandine est injectée au 9<sup>ème</sup> ou au 10<sup>ème</sup> jour, au même moment on procède au retrait du dispositif progestatif. Une double insémination est réalisée sur chaleurs observées.

### **2.5. Facteurs de variation de la réponse au traitement de superovulation**

#### **2.5.1. Facteurs intrinsèques**

##### **2.5.1.1. La race :**

Il semble que les races laitières répondent moins bien aux traitements de superovulation que les races à viande [77], dans son étude (n = 269) Sharpin et al [77] a obtenu plus d'embryons transférables chez les vaches à viande par rapport aux vaches laitières (respectivement 6,9 versus 5,3). La race Simmental apparait être en tête du classement (Tableau1) en fonction du nombre d'embryons transférable [78] ; [79]. Ce phénomène peut être expliqué à régression de la fertilité due à la sélection importante en faveur de la production laitière.

Tableau 2.1 : Variation des résultats des récoltes d'embryons chez le bovin en fonction de la race [78].

Race	Nombre de collectes	Nombre d'embryons par collecte		
		Total (m ± $\sigma$ )	Transférables (m ± $\sigma$ )	Transférables (%)
Angus	11	6,9 ± 4,5	4,7 ± 3,7	68
Beefmaster	145	13,0 ± 8,8	6,1 ± 6,0	48
Brangus	248	16,2 ± 14,3	6,6 ± 8,1	43
Charolais	12	10,9 ± 9,8	4,7 ± 4,7	47
Chianina	24	10,6 ± 7,2	6,2 ± 5,1	60
Hereford	31	10,2 ± 7,9	5,0 ± 5,6	46
Limousin	54	9,6 ± 8,8	4,7 ± 5,0	52
Longhorn	120	6,0 ± 6,0	2,8 ± 3,5	47
Salers	110	9,6 ± 8,2	6,0 ± 5,7	64
Santa Gertrudis	140	11,0 ± 10,9	4,2 ± 5,7	43
Simbrah	68	15,8 ± 12,5	6,1 ± 7,7	35
Simmental	535	13,1 ± 9,4	6,6 ± 6,3	51
Zebu	98	9,2 ± 8,1	3,4 ± 4,4	39

### 2.5.1.2. L'âge :

Plusieurs auteurs rapportent que la production d'embryons est supérieure de 1 à 2.5 embryons transférable chez les vaches par rapport aux génisses [80]; [81]; [82], ce phénomène est plus remarqué si la génisse est traitée avant 16 mois d'âge [83]. Cependant le nombre d'embryons transférables par collecte est inversement proportionnel à parité. On observe une baisse du nombre d'embryons transférables par collecte à partir de la 3<sup>ème</sup> lactation [84]. Au-delà de l'âge de 6 ans, les vaches donnent un nombre d'embryons faible et beaucoup d'ovocytes non fécondés, ceci serait dû à une diminution de la qualité et la des ovocytes.

### 2.5.1.3. Le niveau de production laitière

Des avis contradictoires sur l'effet de la lactation sur la production d'embryons ont été rapportés. Darrow et al [85] observe que le nombre d'embryons transférables est supérieur chez les vaches en lactation que celles taries (4,0 versus 2,8), ils notent aussi une diminution progressive du nombre d'embryons transférables avec l'avancement de la lactation. De Ruigh et al [86] par contre, observe que les vaches en lactation produisent moins d'embryons viables que les vaches taries. Pour Hasler et al [87] la production journalière et le stade de lactation n'influencent pas la réponse aux traitements de superovulation.



#### **2.5.1.4. Le statut ovarien**

Selon Bungartz et Niemann [88] et Romero, [89] un pourcentage élevé de la variation des réponses au traitement de superovulation peut être imputées à des facteurs intrinsèques liés au statut ovarien de l'animal. Singh et al. [90] ont rapporté que la présence d'un nombre élevé de follicules de petite à moyenne taille le jour du début de la superovulation semble être associée à une augmentation de la réponse ovarienne. De plus, il a été clairement démontré que la réponse au traitement de superovulation était plus élevée lorsque celui-ci est initié la veille de l'émergence d'une vague folliculaire [91]; [92]; [76]. Pour pallier à la variabilité de la réponse ovarienne, une approche alternative consiste à initier des traitements de superovulation suite à l'induction de l'émergence d'une vague folliculaire [55] et ce en utilisant une association d'une injection d'estradiol et d'un traitement à la progestéronique [76]; [93].

De plus, un effet négatif de la présence d'un follicule dominant au jour du début de la superovulation sur la viabilité de la production d'embryons a été signalé [94]; [95]; [96]; [97] ; [98]. Dans une autre étude menée par Bassiouni et El Deeb [99] pour examiner l'effet de la présence ou de l'absence d'un follicule dominant au moment de l'injection de gonadotrophine sur la réponse au traitement, il a été démontré que le nombre de corps jaunes, d'embryons récoltés et transférables étaient plus élevés chez les femelles dont l'ovaire ne comportait pas de follicule dominant.

### **2.5.2. Facteurs extrinsèques**

#### **2.5.2.1. La saison :**

Il semblerait que l'effet de la saison serait principalement dû aux conditions climatiques. Pour Harvengt et al [100], le mois et l'année sont des facteurs qui influencent de façon significative le nombre total d'embryons collectés et le nombre d'embryons transférables. Freytag et al [101] ont mis en évidence une influence significative de la température et de la pression atmosphérique le jour du début du traitement sur le nombre d'embryons collectés. Benyei [102] a testé la capacité de génisses Prim'holstein à s'adapter au climat chaud (30 à 43 °C), ses résultats montrent que pendant la première année, les donneuses n'ont pas répondu de façon satisfaisante aux traitements de superovulation, passée cette

période, la production d'embryons a augmenté pour atteindre une moyenne d'embryons congelables supérieure à 5. Il conclue qu'une période d'environ un an serait nécessaire pour l'adaptation des donneuses à leur nouvel environnement climatique. De plus, les profils hormonaux, observés après superovulation, apparaissent différents chez des vaches exposées à un climat chaud et en particulier, le pic de LH qui est retardé de 24 heures par rapport à l'injection de prostaglandines ce qui peut conduire à utiliser un schéma d'inséminations systématiques différent [103].

Cependant les études de l'effet saison sur la réponse à la superovulation ont abouti à des résultats contradictoires. Contrairement à Shankar et al [104], Kafi et McGowan [105] et [106] ont identifié une influence de la saison sur la réponse à la superovulation. Tonhati et al [106] ont rapporté que le nombre d'embryons transférables collectés était plus faible en hiver. Sous des climats tempérés, les résultats varient peu en fonction de la saison [11]. Sous des températures élevées, Benyei et al [107] ont comparé des génisses et des vaches Holstein en lactation, ils ont un nombre d'embryons dégénérés et d'ovocytes non fécondés plus élevé chez les vaches. De plus, les vaches avaient significativement moins d'embryons de qualité 1 que les génisses. Selon Putney et al [108] la différence entre vaches et génisses semblerait due à une incapacité pour les vaches à maintenir une température corporelle normale à cause de leurs besoins métaboliques de lactation.

#### **2.5.2.2. Conduite de l'alimentation :**

Les apports nutritionnels peuvent influencer de façon complexe la reproduction et à différents niveaux : axe hypothalamo-hypophysaire, ovaire et utérus [109]. Ainsi, croissance folliculaire et ovocytaire peuvent être affectés par les conditions alimentaires et l'équilibre énergétique [110].

Une suralimentation avant l'IA (insémination artificielle) est défavorable à la qualité des embryons produits après superovulation, imputé à une baisse du taux plasmatique de progestérone avant l'ovulation [111] ; [109]; [110]. Gong et al [112] ont observé qu'un apport alimentaire élevé (200% des besoins) pendant les trois semaines précédant la superovulation, chez des génisses, augmentait le recrutement des follicules ovariens, et aboutissait à significativement plus de corps

jaunes que chez les animaux témoins recevant une ration couvrant 100 % des besoins. Pour Landau et al [113], cet effet pourrait s'expliquer par une amélioration de la qualité des ovocytes par augmentation de la concentration d'insuline circulante, mais aussi de l'environnement des follicules et en particulier leur contenu en insuline et en glucose.

Un excès d'apports nutritionnels à long terme avant la collecte des embryons peut aussi présenter des effets défavorables [114] ; [115] ; [116] ; [110]. Mantovani et al [114] ont testé chez des génisses à viande, trois régimes alimentaires couvrant 110, 135 et 150% des besoins. Les résultats une chute significative du nombre d'embryons congelables inversement proportionnelle aux niveaux des apports. L'excès d'apport énergétique est apparu comme le facteur le plus important influençant négativement la réponse ovarienne et la production d'embryons transférables [117].

De même que l'excès d'apport la restriction alimentaire paraît être néfaste. Une sous-alimentation avant l'insémination augmenterait le taux de développement blastocytaire chez les bovins selon O'Callaghan et Boland [109]. Ainsi, Dunne et al [118], ont mis en évidence l'effet d'une très forte restriction alimentaire (56% contre 140% des besoins énergétiques) juste après l'IA sur le taux de survie embryonnaire (-30% du taux de survie).

La sous-alimentation à long terme diminue l'amplitude et la fréquence des décharges de LH qui sont nécessaires à la croissance des follicules [119]. La sous-alimentation inhiberait la sécrétion pulsatile de LH par une réduction de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus.

### **2.5.2.3. Traitement de superovulation :**

De nombreuses études se sont attachées à comparer les traitements utilisant de la PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) ou de la FSH [11] ; [105]. Une altération du développement folliculaire et de la maturation des ovocytes a été remarquée lorsque de la PMSG a été utilisée dans le programme de superovulation [11]; [120] ; [105]. L'emploi de PMSG, provoquerait des aberrations chromosomiques lors de la méiose [120]. Selon Nibart [11], les extraits

hypophysaires (FSH) sont plus efficaces que la PMSG puisqu'on obtient en moyenne plus d'embryons viables (5,0 contre 3,5).

Estrada et al [121] ont évalué la réponse des vaches suite à des traitements de superovulation à base de 2 doses différentes de Folltropin (24 et 36 mg par vache). Ils n'ont pas une influence significative de la dose sur la réponse aux traitements. Yaakub et al [122] ont observé meilleure réponse avec l'augmentation des doses de pFSH sans que le nombre d'embryons transférables ne soit différent.

L'utilisation d'anticorps anti-PMSG permet de réduire l'incidence des kystes et de follicules pré-ovulatoires n'ayant pas ovulés le jour de l'ovulation [123] ; [124] ; [120]. Zeitoun et al [125] ont constaté une augmentation du nombre de corps jaunes le jour de la collecte, sans amélioration des résultats de la récolte.

La pureté des préparations de gonadotrophines peut également être à l'origine de la variabilité des résultats. Ainsi, le rapport entre LH et FSH de la préparation affecte la réponse [66]. En comparant l'efficacité de 2 préparations de FSH (Folltropin Vetrepharm, Can. Inc., à faible teneur en LH, et Pluset, Serovet, Rome, Italie, avec un rapport FSH/LH = 1) sur des vaches allaitantes, ils ont constaté une augmentation du nombre d'ovulation en faveur du Pluset mais en revanche, une grande partie des ovocytes étaient non fécondés ou dégénérés

Un contenu trop élevé de LH aboutit généralement à une plus faible réponse à la superovulation en race laitière [126] ; [66] ou allaitante [127]. En effet, un excès de LH peut provoquer une lutéinisation ou une ovulation prématurée des follicules stimulés par la FSH. Touati [128] rapporte que les meilleurs résultats ont été obtenus avec des rapports FSH/LH de 20% et 40%.

Plusieurs auteurs indiquent qu'une injection sous-cutanée unique de FSH s'avère aussi efficace que des injections multiples intramusculaires [129] ; [130] ; [131] ; [66]. Par contre Bungartz et Niemann [132] ont trouvé que le nombre d'embryons transférables après superovulation était beaucoup plus faible lors d'injections uniques. De même, pour Kelly et al [66], chez des génisses, les injections multiples de FSH permettent d'obtenir plus d'embryons congelables et transférables.

Lors du traitement avec pFSH en injections multiples, les meilleurs résultats sont obtenus, d'après Nibart [11], pour une dose totale de 32 à 40 mg chez la vache et de 28 mg chez la génisse. Suzuki et al [133] recommandent en injection unique, une dose de 30 mg diluée dans la polyvinylpyrrolidone. Selon Breuel et al [79], dans une étude menée chez des vaches allaitantes de 4 races différentes (Simmental, Charolaise, Polled Hereford et Angus) dans 2 types d'élevage (en station ou en ferme), les relations entre l'âge, la dose de pFSH et la production d'embryons totaux et d'embryons transférables n'ont pas pu être mis en évidence.

De nombreux essais avec de nouvelles préparations de pFSH et des modifications dans les protocoles ont été réalisés en vue d'améliorer les résultats de superovulation (pré-synchronisation par des progestagènes, préparation avec de la FSH ou GnRH (gonadotrophine releasing hormone), utilisation de préparations de FSH contenant différents niveaux de LH, utilisation de GnRH et LH au début de l'œstrus [10]; [134]. Ces essais montrent une amélioration des résultats des collectes d'embryons, mais le pourcentage d'embryons transférables est souvent diminué avec une grande variabilité des résultats [134].

#### **2.5.2.4. Stress et état sanitaire :**

Tout stress avant et pendant le traitement de superovulation est néfaste puisqu'il conduit à suppression de la décharge de LH et favoriser ainsi, soit la formation de kystes ovariens, soit l'ovulation d'ovocytes de mauvaise qualité [11]. Les maladies métaboliques (syndrome vitulaire, affections hépatiques) retentissent de manière négative sur la fonction ovarienne et la production d'embryons. Le taux de collecte et le nombre d'embryons viables sont inférieurs chez les vaches présentant des métrites [11]; [105], ceci est dû à leur effet sur l'ovaire et l'axe hypothalamo-hypophysaire [135]. Les vaches infertiles à chaleurs normales produiraient autant d'embryons mais de qualité inférieure par rapport aux vaches fertiles [11], avec un nombre plus élevé d'ovocytes non fécondés. Les mammites auraient un effet inhibiteur sur la sécrétion des gonadotrophines par augmentation des niveaux de cortisol [136]. L'hyperthermie engendrée par diverses affections peut avoir un effet négatif sur le développement des embryons [105]. Les vaches présentant des maladies infectieuses telles que la BVD (Bovine

Viral Diarrhea) ou l'IBR (rhinotrachéite infectieuse bovine) donnerait moins de corps jaunes et un faible nombre d'embryons transférable.

## CHAPITRE 3 : PRODUCTION D'EMBRYONS ET STATUT ENERGETIQUE

### 3.1. Introduction

Sur les trente dernières années, l'augmentation de la production laitière individuelle a été accompagnée d'une baisse de la fertilité des femelles hautes productrices. Le statut nutritionnel et la balance énergétique ont une influence majeure sur la fertilité notamment au cours du péripartum. Quand l'apport énergétique dans la ration est insuffisant, les animaux puisent l'énergie dans leurs réserves pour la production laitière. Des vaches laitières hautes productrices peuvent avoir une balance énergétique négative pendant 20 semaines post-partum. Ceci est associé à un intervalle vêlage-première ovulation allongé, une grande proportion de cycles anormaux et une diminution du taux de conception [137]. La balance énergétique négative se traduit par des augmentations des concentrations sanguines en acides gras non estérifiés (AGNE) et en  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB). Ces taux indiquent une mobilisation des réserves et sont directement ou indirectement associées à la fertilité. En plus de l'augmentation de ces taux, le déficit énergétique se traduit aussi par une perturbation de la glycémie et l'insulinémie. Or le glucose et l'insuline influencent directement la fonction de reproduction avec des actions sur le cerveau, les ovaires et le tractus génital [138]. C'est pourquoi avant de mettre en place un protocole de superovulation sur une femelle, il peut être utile d'en évaluer le statut énergétique et d'en faire un élément discriminatoire.

### 3.2. Balance énergétique

L'énergie joue un rôle déterminant dans la reproduction de la vache laitière, la perte de poids durant les périodes physiologiques critiques doit être contrôlée et maintenu à des niveaux acceptables à travers une bonne stratégie alimentaire. L'énergie est l'aspect le plus difficile à gérer, car les glucides représentent en moyenne 70% de la ration chez la vache laitière.

Chez la vache laitière, le bilan énergétique correspond à la différence entre les apports énergétiques alimentaires et les dépenses consenties pour l'entretien et la production laitière. Du fait d'une consommation alimentaire plus faible au

début de la période postpartum, une vache laitière en production connaît généralement une période variable de bilan énergétique négatif au début de la lactation caractérisée par une perte de poids et une mobilisation des réserves de graisse corporelle. Un bilan énergétique négatif peut persister pendant 10 à 12 semaines de lactation [139]. Le niveau de déficit énergétique est souvent directement lié à la production de lait [140]. Un rendement élevé en lait a été associé à une efficacité de reproduction inférieure. Sur une étude qui a concerné 4550 troupeaux de vaches Holstein, Nebel et McGilliard [141] ont montré une relation inverse entre le taux de conception en première insémination et le rendement laitier annuel par vache. Cependant, malgré la relation négative apparente entre le taux de conception et la production laitière, les mesures des performances de reproduction, dans plusieurs études, ont été plus étroitement corrélées au bilan énergétique qu'au niveau de production laitière [142]. Staples et al. [143] ont signalé une production laitière diminuée, un apport alimentaire faible et un bilan énergétique négatif chez les vaches laitières en anœstrus par rapport à celles qui ont repris une activité ovarienne cyclique avant le 60<sup>ème</sup> jour post partum. De plus, la variation du bilan énergétique parmi les vaches d'un troupeau est due en grande partie à la variation des apports énergétiques par rapport à la production laitière [144], et l'utilisation accrue des réserves énergétiques corporelles pour la production de lait a été associée à un retard de la reprise de l'activité ovarienne cyclique [143].

Les vaches laitières peuvent s'adapter à une carence énergétique par la mobilisation des réserves corporelles. La mobilisation des lipides est définie comme un déséquilibre entre la lipogénèse et la lipolyse dans le tissu adipeux. Une série de changements hormonaux de l'insuline plasmatique, des catécholamines, de l'hormone de croissance et des glucocorticoïdes favorise la lipolyse. Lors de la lipolyse, plusieurs lipases vont cataboliser les triglycérols en glycérols et en NEFAs (non esterified fatty acid) [145]. Un pic de la concentration de triacylglycerols a été observé 7 à 13 jours après le vêlage et diminue progressivement par la suite [146]. Les NEFAs plasmatiques sont principalement composés d'acides gras saturés, dont le palmitate, le stéarate et de l'acide oléique. Les NEFAs sont absorbés par le foie. Ils vont être transformés en énergie métabolisable ce qui permet au glucose d'être utilisé pour la croissance



du fœtus et la synthèse du lactose. Les NEFAs peuvent être oxydés en dioxyde de carbone afin de fournir de l'énergie ou être partiellement oxydés afin de produire des corps cétoniques ou de l'acétate. Le BHBA est la forme prédominante de corps cétoniques dans le sang et sa concentration est un indice de l'oxydation des acides gras. L'oxydation des acides gras permet de maintenir la glycémie en dépit de la concentration élevée de glucose circulante. Au moins 30% des vaches laitières vont souffrir temporairement d'une acétonémie sub-clinique dans les premiers mois de lactation [147]. Chez les vaches laitières, une stéatose hépatique est presque toujours liée à une mobilisation intense des lipides. Une stéatose hépatique est une accumulation de lipides dans le cytoplasme des cellules non adipeuses qui induit une lipotoxicité. L'excès de lipides est stocké sous forme de triglycérides dans le foie et est associé à une altération des fonctions métaboliques du foie [148]. Elle est généralement précédée par des concentrations élevées des NEFAs dans le plasma.

### **3.3. Marqueurs du Statut énergétique :**

Le statut énergétique d'un animal n'est pas facile à apprécier. L'estimation de la valeur énergétique de la ration n'est pas suffisante car les quantités ingérées varient beaucoup entre les individus. La notation de l'état corporel, qui évalue l'état d'engraissement superficiel, est la méthode indirecte la plus couramment employée. Elle présente l'avantage d'être peu coûteuse et rapide. Son interprétation est moins sujette à caution que celle de la pesée, rendue délicate par les variations de poids des réservoirs digestifs et utérins [149]. Cette technique est complémentaire des dosages biochimiques.

#### **3.3.1. La note d'état corporelle (BCS) :**

La couverture grasseuse de 4 points anatomiques postérieurs (base de la queue, tubérosité ischiatique, détroit caudal, ligne du dos) et de 2 points latéraux (pointe de la hanche, apophyses transverses et épineuses) est évaluée visuellement grâce à des grilles de notation [150]. A chaque critère anatomique est attribuée une note de 0 (vache cachectique) à 5 (vache très grasse), la moyenne de ces 6 notes donne une note globale, dont la précision est évaluée au demi-point. Un point de note correspond à environ 20-25 kg de lipides chez un animal de 600 kg.

L'inconvénient de cette technique est sa subjectivité, qui peut être plus ou moins maîtrisée grâce à des critères de notation très précis, un nombre restreint de personnes effectuant ces notations, et la répétition de ces notations. La répétabilité de la notation (corrélation entre les notes attribuées à un même animal par une même personne au cours de différents tests) atteint 82% et la reproductibilité (corrélation entre la note mise par plusieurs juges au cours d'un même test 79% [151]. La notation d'état corporel est donc un outil de choix en raison de son faible coût et sa facilité de mise en œuvre, cette technique bien maîtrisée permet une estimation fiable de l'état d'engraissement [152].

Une vache multipare haute productrice doit vêler avec une note d'état corporel de 3.5 - 4, puis perdre environ 0.5 point dans les 30 jours suivant le vêlage, se stabiliser à 2.5-3 pendant les trois premiers mois de lactation puis reprendre de l'état à partir de 12-14 semaines post partum. Une vache doit rester à 3 pendant la majeure partie de sa lactation, puis engraisser en fin de lactation, de manière à atteindre la note 3.5-4 avant son tarissement. Sur l'ensemble d'un troupeau, la perte d'état corporelle en période post-partum ne doit pas excéder un point [153].

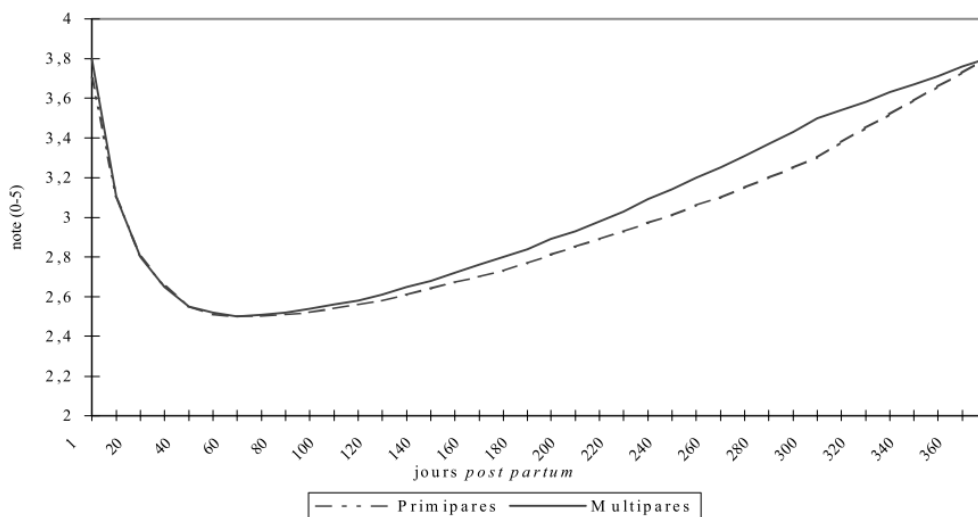


Figure 3.1 : Evolution théorique de la note d'état corporel chez les vaches laitières primipares et multipares [154]

### **3.3.2. Mesure de l'épaisseur de la graisse**

En raison d'une forte corrélation entre la graisse sous-cutanée et la graisse corporelle totale, la profondeur de la graisse est un bon indicateur des réserves adipeuses [155]. L'utilisation de l'échographie a été citée par plusieurs études comme alternative ou méthode indirecte d'estimer le BCS [156]; [157].; [158]; [159]; [160]; [161]; [162]; [163]; [164]; [165]. Dans un article de synthèse, Schröder et Staufenbiel [165] ont démontré l'efficacité des mesures l'épaisseur du gras dorsal par ultrasons comme un moyen d'évaluer réserves corporelles. Parce qu'il a le plus grand dépôt de tissu adipeux et une forte corrélation avec teneur totale en graisse corporelle, la région sacrale est le site optimal pour l'examen échographique de l'épaisseur du gras dorsale. En supposant que l'un BCS (body condition score) est équivalent à 50 kg de graisse corporelle, et une variation de 1 mm de l'épaisseur du gras dorsal est équivalente à 5 kg de la graisse corporelle totale, ces auteurs ont supposé que une unité BCS correspond à environ 10 mm d'épaisseur de gras dorsal Schröder et Staufenbiel [165].

### **3.3.3. Les acides gras non estérifiés (AGNE) :**

Les AGNE constituent la principale source d'acides gras. Ils proviennent de la mobilisation des graisses de réserves. La lipolyse est activée par l'adrénaline, dont l'effet est potentialisé par l'hormone de croissance en fin de gestation et en début de lactation. La lipogenèse quant à elle, est stimulée par l'insuline [166]. Les valeurs plasmatiques usuelles des AGNE sont de 3 -10 mg/dl (< 0.6 mmol/l) [167] ; [168]. Lorsque le bilan énergétique de l'organisme est positif ou nul ou après la prise alimentaire, la concentration plasmatique d'AGNE est faible (0.35 à 0.50 mmol/l).

A jeun ou quand le bilan énergétique devient négatif, elle augmente considérablement [166]. La corrélation entre les AGNE et les apports en UFL est forte et négative: plus la ration est pauvre en énergie, plus la concentration d'AGNE circulants est élevée [169]. La concentration plasmatique en AGNE est soumise à de nombreux facteurs de variation (rythme circadien, stress, prise alimentaire), mais elle est un bon indicateur de l'accumulation des triglycérides dans le foie. Elle augmente à partir de 2 - 3 semaines avant le vêlage jusqu'à la fin

du premier mois de lactation, se stabilise vers 6-8 semaines post partum, puis décroît [170].

Chez la vache, les sources principales de glucides sont les fibres, l'amidon et les sucres solubles. Chez la vache, les sources de glucides de la ration alimentaire vont se transformer en acides gras volatils grâce à la fermentation ruminale. Les principaux acides gras volatils produits sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Les composantes de la ration alimentaire qui ne sont pas dégradées par la flore microbienne dans le rumen sont digérées et absorbées par l'intestin afin de fournir des éléments nutritifs lipogéniques ou glycogéniques. L'acétate et le butyrate sont des composés à nombre pair de carbones et sont considérés comme des nutriments lipogéniques. Le propionate est un composé à trois carbones et est considéré comme un nutriment glycogénique [171]. Il est la principale source de glucose de la ration alimentaire, le propionate peut se transformer en oxaloacétate.

L'acétylcoenzyme A, un composé lipogénique et l'oxaloacétate, un composé glycogénique vont se transformer en citrate. Le citrate va entrer dans le cycle de Krebs afin de donner de l'ATP (adénosine triphosphate) à l'organisme. Le cycle de Krebs est la voie métabolique la plus efficace en production d'énergie. De plus, le cycle de Krebs donne le substrat nécessaire à la néoglucogenèse. En début de lactation, l'apport en énergie est plus faible que les besoins énergétiques. Le bilan énergétique négatif se traduit par une mobilisation des réserves corporelles. Les réserves corporelles sont principalement composées de lipides, une source de nutriments lipogéniques. La mobilisation des lipides se traduit par une augmentation de la concentration plasmatique d'acide gras non estérifié (NEFA). Les NEFA peuvent s'oxyder et se transformer en acétylcoenzyme-A. La forte production de lait en début de lactation nécessite une forte production de lactose. Une augmentation de l'apport de nutriments glycogéniques et une concentration réduite d'insuline permettent la synthèse d'une grande quantité de lactose. Chez la vache ayant un déficit énergétique, les nutriments lipogéniques sont utilisés pour la production de l'acétylcoenzyme-A et les nutriments glycogéniques sont utilisés pour la synthèse du lactose. Quand le ratio d'oxaloacétate et d'acétylcoenzyme-A est déséquilibré. Il induit une baisse de la production d'ATP. L'acétylcoenzyme-A en surplus va induire la synthèse de

cétones, d'acétone, d'acétoacétate et du  $\beta$ -hydroxy-butyrate (BHB). Une forte production de ces composés peut entraîner une acétonémie. L'excès de nutriments lipogéniques va être estérifié ou être entreposé dans le foie sous la forme d'acides gras tels que les triacylglycérides [171].

#### **3.3.4. Les corps cétoniques :**

Ce terme regroupe les acides acéto-acétique (AA),  $\beta$ -hydroxy-butyrique (BHB) et l'acétone (Ac). Ils se forment essentiellement à partir de l'acétyl-coenzyme-A (Ac-CoA), d'origines diverses [171]. D'une part, l'Ac-CoA provient d'aliments conduisant essentiellement à la production d'AGV en C2 (foins, ensilage d'herbe) et C4 (betterave, maïs). Dans un contexte physiologique, les corps cétoniques sont principalement d'origine alimentaire et synthétisés dans la paroi du rumen. Le BHB est le composé le plus abondant [172]. D'autre part, l'Ac-CoA est une plaque tournante du métabolisme intermédiaire. Il intervient dans la mobilisation lipidique et la  $\beta$ -oxydation des AGNE. Il peut résulter de la désamination d'acides aminés glucoformateurs (glycine, sérine, alanine) ou céto-gènes (leucine, tryptophane, tyrosine, phénylalanine). Il peut être produit à partir du pyruvate, d'origine glucidique [168]. Les corps cétoniques sont alors essentiellement synthétisés au niveau du foie, des reins, de la mamelle. Cette voie «endogène» produit surtout de l'AA (acéto-acétique acétique). La régulation de la production des corps cétoniques est liée au taux d'AGNE : si celui-ci augmente (lipomobilisation), la céto-génèse est activée. Ensuite, les corps cétoniques sont transportés vers les tissus (surtout les muscles), pour être utilisés comme substrats énergétiques, ou vers la mamelle et les reins, pour être excrétés dans le lait et l'urine. Ils contribuent aux besoins énergétiques liés à l'entretien à hauteur de 7 à 12%, ce pourcentage augmente en cas de lactation et de gestation [173]. Chez des animaux cliniquement sains, la concentration sanguine en corps cétoniques est inférieure à 10 mg/100ml (1 mmol/l) : 0.5 mg/100 ml pour l'AA, 4 mg/100 ml (< 0.8 mmol/l) pour le BHB, traces d'acétone [168]. La concentration du BHB est très dépendante du moment du repas, d'où la difficulté de fixer des valeurs plasmatiques «normales ». L'AA est moins soumis aux variations diurnes mais plus difficile à doser en routine. Les corps cétoniques augmentent pendant le premier mois de lactation, puis diminuent. En début de lactation, le BHB est corrélé négativement au bilan énergétique.

### **3.3.5. Glycémie :**

Le glucose est une molécule indispensable aux métabolismes énergétique cellulaire, lipidique, foetal, et à la production laitière (synthèse de lactose) [174]. Chez les ruminants, l'essentiel du glucose sanguin provient de synthèses endogènes. La néoglucogenèse fournit 93% du glucose utilisé : le foie en synthétise 85% et les reins 8%, à partir de substrats tels que le propionate, les acides aminés glucoformateurs, le glycérol et le lactate. Le propionate, acide gras volatile synthétisé exclusivement dans le rumen, fournit 30 à 55% du glucose. Les proportions d'acétate, de propionate et de butyrate sont respectivement de 70, 20 et 10 % avec une ration à base de foin. Le pourcentage de propionate augmente avec la teneur en amidon. Les acides aminés glucoformateurs fournissent, après désamination, 25% du glucose [168]. L'alimentation n'apporte que 7% du glucose utilisé par l'organisme, via des glucides échappant aux fermentations ruminales (amidon du maïs et de la pomme de terre, glucides de l'herbe jeune), qui s'ajoutent à l'amidon bactérien et au glycogène des protozoaires. Néanmoins, la glycémie dépend de la qualité et de la quantité des apports alimentaires, qui fournissent les substrats glycogéniques, ainsi que du moment de la prise alimentaire, car la néoglucogenèse est maximale après les repas [172]. La glycémie d'une vache en début de lactation est de 0.40-0.55 g/l (2.2-3.05 mmol/l). En dehors de cette période, elle varie de 0.60 à 0.70 g/l (3.3-3.9 mmol/l). Physiologiquement, elle est maximale au vêlage, diminue pendant les deux premiers mois post partum, puis croît au cours de la lactation [175]. Elle augmente après les repas, mais ses variations diurnes sont moins marquées que celles des AGNE ou du BHB. Les primipares ont une glycémie 10% plus élevée que les multipares [176]. Cependant, le métabolisme du glucose est très fortement régulé, pour maintenir la glycémie constante. Lors d'apports alimentaires déficitaires en substrats glucogéniques, l'organisme mobilise ses réserves lipidiques et glycogéniques. Aussi, en raison de son homéostasie, certains auteurs considèrent la glycémie comme un indicateur peu sensible du statut énergétique [177]; [178]. Par contre, Doreau et al. [168] relie de façon positive la glycémie au bilan énergétique pendant les six premières semaines de lactation. La relation entre la glycémie et la fertilité est également très controversée. Il semblerait que

la glycémie soit associée à de l'infertilité quand elle est très nettement en dessous de ses valeurs usuelles [175].

### **3.3.6. Insuline :**

L'insuline, hormone pancréatique hypoglycémisante et lipogénique, joue un rôle primordial dans le post-partum. Sa sécrétion, très faible en début de lactation, augmente avec le niveau énergétique de la ration, notamment avec le taux d'amidon : elle est activée par le propionate. En fin de lactation, le bilan énergétique positif, associé à une hyperglycémie et à un rapport C2/C3 ruminal bas, stimule la sécrétion d'insuline : on observe alors une hyper-insulinémie qui favorise l'engraissement [174]. Pour Kaneko et al. [179] et Grimard et al. [180], les valeurs physiologiques de l'insulinémie sont de l'ordre de 0-5  $\mu$ UI/ml. Chilliard et al. [181] notent des insulinémies d'environ 11  $\mu$ UI/ml avant repas et 25  $\mu$ UI/ml après repas chez des vaches nourries selon les recommandations. En cas de sous-alimentation, l'insulinémie est de 2  $\mu$ UI/ml avant repas et de 18  $\mu$ UI/ml après repas. McCann [182] observe des concentrations en insuline de 11  $\mu$ UI/ml chez des vaches en œstrus, de 7  $\mu$ UI/ml chez des vaches en dioestrus et de 10  $\mu$ UI/ml 2 semaines avant la mise-bas. La divergence des données entre les auteurs peut donc être expliquée par le niveau énergétique de la ration reçue par les vaches prélevées, le moment du prélèvement par rapport au repas et le stade physiologique de l'animal. Les IGF ou Insulin-like Growth Factors sont des facteurs de croissance synthétisés par le foie sous l'influence de la GH. Leur sécrétion est corrélée de façon positive au bilan énergétique [183].

### **3.3.7. Cholestérol :**

Le cholestérol, stérol le plus abondant dans les tissus animaux, est la source de la plupart des stéroïdes. L'effet de l'apport alimentaire sur la cholestérolémie est variable selon les auteurs. Kronfeld et al. [177] considèrent la concentration sérique en cholestérol comme l'indicateur des variations alimentaires le plus fiable parmi 17 paramètres sanguins étudiés : la cholestérolémie est hautement corrélée aux divers apports alimentaires (énergie nette, protéines brutes, Ca, P), mais de façon négative : la cholestérolémie augmente quand l'apport énergétique diminue. Cependant, Ruegg et al. [184] constatent que la cholestérolémie est inversement corrélée à la perte d'état post

partum : plus le déficit énergétique est important, plus la cholestérolémie est faible. Les teneurs plasmatiques en cholestérol augmentent lorsque la ration est riche en matières grasses [185].

Cependant, le cholestérol est le paramètre sanguin qui varie le plus en fonction des conditions de prélèvements (année, mois, heure, lieu, délai vêlage-prise de sang), de l'âge de l'animal (numéro de lactation), de la production laitière (quantité, TB) [186]. La cholestérolémie est soumise à d'importantes variations diurnes. Elle est plus élevée chez les vaches en 2<sup>ème</sup> lactation par rapport aux autres rangs de lactation [176]. Elle commence à diminuer un mois avant vêlage, et ce, jusqu'à 4 jours post partum, puis elle augmente au cours des 3 mois suivants. Elle est positivement corrélée à la production laitière au cours des 100 premiers jours de lactation [184]. Les valeurs sanguines usuelles sont de 80-130 mg/dl (1.3-3.8 mmol/l) pour le cholestérol total, 22-52 mg/dl (0.57-1.3 mmol/l) pour le cholestérol libre, 58-88 mg/dl (1.5-2.3 mmol/l) pour le cholestérol estérifié [168].

### **3.3.8. Les marqueurs hépatiques**

Le foie est l'organe central du métabolisme des nutriments. Il assure le maintien de l'homéostasie du glucose via l'anabolisme et le catabolisme du glycogène, des lipides et des acides aminés glucoformateurs. Il synthétise les protéines plasmatiques à partir des acides aminés issus de la digestion. Il détoxifie les xénobiotiques et les catabolites non tolérés par l'organisme (NH<sub>3</sub>). Il intervient dans la digestion des substances lipidiques (bile), dans leur transport (lipoprotéines) et leur stockage (triglycérides) [166]. Un dysfonctionnement hépatique peut être préjudiciable à l'utilisation optimale de la ration et provoquer des déséquilibres nutritionnels altérant toutes les fonctions organiques, dont la reproduction. Une ration déséquilibrée peut provoquer des désordres hépatiques préjudiciables à la fertilité [186]. Pour évaluer l'intégrité et le fonctionnement hépatique, des enzymes sériques présentes dans le foie à des concentrations importantes sont dosées. Lors de troubles hépatocellulaires ou choléstatiques, ces enzymes sont relarguées massivement par le foie et passent dans le sang. En cas de nécrose hépatique, l'activité des enzymes suivantes augmente : alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT), ornithine carbamoyltransférase (OCT), glutamic déshydrogénase (GLDH), sorbitol



déshydrogénase (SDH), arginase. L'augmentation de l'activité des phosphatases alcalines (PAL), des gammaglutamyl transférases (GGT) et des nucléotidases signe une cholestase. Les GLDH et les GGT sont des marqueurs spécifiques du foie chez les ruminants. L'activité de la GLDH sérique chez un bovin sain est d'environ 5 à 11 UI/l. La GGT présente une activité de 12 à 18 UI/l environ [179].

#### **3.4. Balance énergétique et production d'embryons :**

Plusieurs études montrent une relation entre le BCS et la production d'ovocytes : les vaches en mauvais état corporel présentaient moins d'ovocytes normaux que celles en meilleur état [187] ; [188]. Les meilleures réponses à la superovulation sont obtenues chez les femelles en bon état général. Ceci s'explique par le fait que les vaches maigres ont souvent une fonction ovarienne défectueuse. Certaines équipes de transfert embryonnaire ne démarrent un traitement de superovulation chez les vaches à «haute production laitière», que lorsque celles-ci ne sont plus en courbe négative de poids corporel [11]. Dans une étude menée chez des vaches Montbéliardes, Delacharlerie [189] a montré que l'état corporel des vaches était lié de façon significative à la production d'embryons transférables, les meilleures donneuses étant les vaches en bon état (note d'état  $\geq 3$ ) par rapport aux vaches en état moyen (note d'état  $< 3$ ). Les résultats faibles des donneuses en état moyen s'expliquaient selon lui, par une proportion importante de réponses très faibles (0 ou 1 embryons transférables) au traitement de superovulation.

Parce que les changements dans les réserves d'énergie ont une influence importante sur la productivité des vaches, la santé et la production, il est clairement nécessaire de surveiller l'état des réserves corporelles chez les vaches laitières. Maltz et al. [190] ont démontré que les changements de poids corporel pourraient être utilisés pour la détection précoce de certains problèmes de santé et comme un composant dans un système automatique de détection des chaleurs.

Cependant, les changements dans poids corporel sont influencés par des facteurs autres que les changements dans la quantité de graisse corporelle, y compris les changements dans la protéine interne et eau, contenu gastro-intestinal, modification du poids des organes, développement fœtal ment et la taille du cadre [191]; [156]; [165]. Un système idéal quantifierait la quantité réelle

des graisses de l'animal et détecterait leurs changements. Des facteurs métaboliques et hormonaux peuvent être utilisés pour évaluer le bilan énergétique de manière rapide, tel que les AGNE, la créatinine, albumine, BHBA, hormone de croissance, diverses enzymes, glucose, cholestérol, urée, insuline, IGF-1, les hormones thyroïdiennes et lactose [165].

Pour le choix des vaches donneuses il est indispensable de contrôler la note d'état corporel (NEC) au vêlage et trois semaines plus tard. En effet, la NEC est importante à évaluer autour du vêlage car elle permet de prédire, en partie, une reprise de cyclicité retardée ou non. Une NEC trop élevée ou trop basse avant le vêlage peut être délétère, la NEC idéale au vêlage étant de 3,5 [138]. De plus, il faut aussi estimer la NEC après le vêlage afin de voir s'il y a une perte d'état et la quantifier. En effet, il a été démontré que les vaches avec la plus grosse perte d'état entre le vêlage et dix semaines post-partum ont le plus grand nombre d'embryons dégénérés et les taux d'embryons viables les plus bas. Ainsi, il est conseillé de réaliser un contrôle de la NEC trois semaines après le vêlage sur les animaux à forte production laitière. Ce contrôle permettra d'estimer l'efficacité d'un traitement de superovulation sur ces animaux. La perte de points de NEC ne doit pas dépasser 1,5 [192].

Plusieurs chercheurs suspectent que les changements métaboliques liés à la mobilisation des réserves tissulaires en période post-partum seraient la cause des problèmes de fertilité. Un bilan énergétique négatif modifie les métabolites sanguins dans le liquide folliculaire et peut causer des dommages à l'ovocyte bovin [193]. In vitro, des concentrations élevées de NEFAs entravent la maturation de l'ovocyte et la compétence au développement embryonnaire [194]. De plus, les problèmes métaboliques tels que la stéatose hépatique et l'acétonémie, même légère, sont associés à des problèmes de santé et une diminution des performances de reproduction chez les vaches laitières [195]. Chez les vaches multipares, une concentration élevée de NEFAs, à moins d'une semaine avant le vêlage, a été associée à une probabilité accrue d'endomérite [196]. Les changements métaboliques semblent affecter la qualité de l'ovule ainsi que le lieu d'implantation de l'embryon.

## **CHAPITRE 4 : INVENTAIRE DES RESULTATS DES RECOLTES D'EMBRYONS EN ALGERIE DURANT LA PERIODE D'ETUDE CHEZ LES VACHES AMELIOREES**

### **4.1. Introduction :**

A l'augmentation des besoins en lait de la population en Algérie s'oppose une production décroissante liée à des facteurs zootechnique (alimentation), mais aussi une baisse de la fertilité. La production d'embryons peut être une alternative intéressante et une méthode de sélection plus efficace. Elle permet aussi de multiplier le potentiel génétique des vaches hautes productrices en multipliant leurs produits. Une donneuse peut produire une moyenne de 5 embryons par récolte qui donneront une fois transférés des produits avec le même potentiel génétique sans influence de la receveuse.

L'objectif de ce chapitre est de faire l'inventaire de la production d'embryons réalisée par notre équipe de recherche affiliée au laboratoire des biotechnologies de la reproduction animale de l'université de Blida (LBRA), durant la période d'étude étude, seule équipe à faire des récoltes d'embryons dans les races bovines améliorées. Les résultats nous permettront de faire un état des lieux de la technique en Algérie et de se positionner par rapport à ce qui se fait par ailleurs.

### **4.2. Matériel et méthode :**

#### **4.2.1. Lieu et période de l'expérimentation :**

Notre travail s'est déroulé entre l'année 2010 et 2018, la période de l'année (saison) a été imposé par des impératif du terrain, notamment la disponibilité de vaches non gestante, répondant aux critères physiologiques, et sanitaire que nous avons mis en place.

Les récoltes ont été réalisées dans quelques régions du centre de l'Algérie, à savoir les wilayas de Blida, Alger, Tipaza et Médéa. Les fermes bovines appartiennent au secteur étatique et privé et sont toutes à vocation laitière, elles se distribuent comme suite :

- Au niveau de la station expérimentale de l'université de Blida,

- au niveau de la station du centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique de Baba Ali (Alger).
- au niveau d'une ferme privée de la région de la Chiffa (wilaya de Blida), au niveau de la ferme pilote Dhaoui à Ouamri (Médéa)
- et au niveau de la ferme privée « Lahiani » dans la région de H'tatba (Tipaza).

#### **4.2.2. Animaux :**

Les vaches donneuses proviennent des différentes fermes citées, elles sont de races diverses, principalement mixte (montbéliarde et flekvieh) et laitière (Holstein), âgées de 4 à 8 ans et présentent un état d'embonpoint variant de 2.5 à 4. Leur alimentation est composée de ration à base de fourrage sec la majorité de l'année, voir toute l'année (ferme expérimentale de l'université de Blida), avec quelque apports de fourrages vert, essentiellement du trèfle fourrager et du sorgho, cette ration est supplémentée d'aliment concentré à base de céréales et de compléments minéralo-vitaminés. Les donneuses utilisées ont toutes dépassé les 70 jours postpartum et ne présentent aucune pathologie gynécologique.

#### **4.2.3. Matériel de récolte :**

Les récoltes ont été réalisées à l'aide d'une sonde Type Folley à deux voies dont une est destinée à gonfler le ballonnet qui permet de fixer la sonde à l'intérieur de la corne utérine. Un mandrin métallique servira à donner une rigidité à la sonde afin de lui permettre le passage du col utérin. Le rinçage des cornes utérines est réalisé grâce à une solution de tampon phosphate (PBS) (Euroflush IMV technologies, l'aigle France). Une fois récoltés les embryons sont dans une solution nutritive puis dans un milieu de congélation à base d'éthylène glycol. Un microscope inversé (Hund, GmbH, Germany) et une loupe binoculaire serviront à la recherche des embryons dans le liquide de rinçage des cornes. Des boîtes de pétri quadrillées, des petite boîtes rondes de 30 mm, des seringues de différents volumes, des paillette de 0.25 et 0.5 ml ont été utilisées à différentes étapes de la récolte.

#### 4.2.4. Hormones et médicaments :

La superovulation a été réalisée en utilisant des extraits hypophysaires porcins dosés à 50 Unité Armour (UA) avec un rapport FSH/LH de 20 % (STIMUFOL, Reprobio SPRL – Belgique) et 40 UA (Solution non commerciale destiné à la recherche, Ulg, Belgique) avec un rapport FSH/LH de 40% (1 unité Armour est égale à 10 mg de FSH). Une prostaglandine (Enzaprost® T, Ceva, France) a servi à induire la lutéolyse à différentes étapes, de la lidocaïne à l'anesthésie épidurale et des antibiotiques en prévention des infections après les récoltes, ont été également utilisés. Des dispositifs à base de progestérone (PRID® DELTA, Ceva, France) ont été utilisés chez certaines vaches pour la synchronisation.

#### 4.2.5. Traitement de superovulation :

Après un suivi rigoureux des chaleurs, toutes les vaches ayant présenté trois chaleurs successives et à intervalles réguliers et un corps jaune palpé par voie rectale 10 à 11 jours après une chaleur de référence, ont été préparées pour la superovulation. Toutes les donneuses ont subi un traitement de superovulation de quatre jours, avec une dose totale de 40 à 50 UA (en fonction de la solution utilisée). Les injections biquotidiennes de pFSH à doses décroissantes ont été réalisées dans le muscle au niveau de l'encolure à des intervalles de temps fixes (Figure 4.1). Chez toutes les vaches une injection de prostaglandine en intramusculaire a été réalisée au troisième jour du traitement de superovulation. Au cinquième jour du traitement les vaches ont été inséminées deux fois à douze heures d'intervalle.

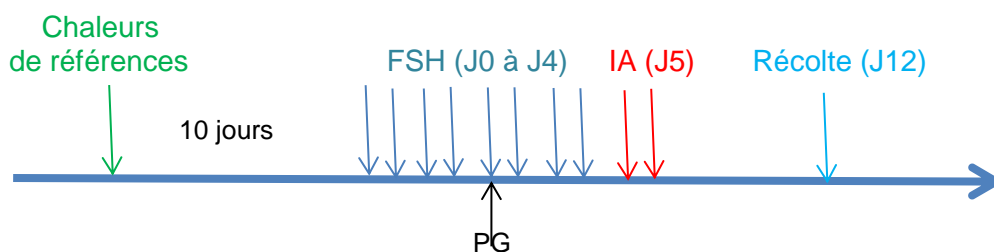


Figure 4.1 : protocole de superovulation

#### **4.2.6. Récolte :**

Les récoltes ont été réalisées par voie cervicale entre six et sept jours après insémination. Avant chaque récolte une palpation des ovaires par voie rectale permet d'évaluer le nombre de corps jaune, et éventuellement détecter la présence de kystes ovariens. Le rectum est ensuite vidangé des matières fécales afin de faciliter la manipulation de l'utérus à travers la paroi rectale et éviter de contaminer la sonde de récolte.

Après nettoyage du périnée, la main gauche est placée dans le rectum pendant que la droite introduit la sonde de récolte munie du mandrin métallique et d'une chemise sanitaire à travers les lèvres vulvaires. Une fois arrivée à l'entrée du col, la chemise sanitaire est retirée et la sonde est introduite à travers le col de manière progressive en évitant de le léser. A l'entrée de la corne utérine le mandrin est retiré progressivement en même temps que la sonde progresse. Le ballonnet est ensuite gonflé avec de l'air (0 à 15 ml en fonction de la taille de la corne) pour vérifier sa position (idéalement 3 à 4 doigts de la bifurcation) et la fixer au niveau de la corne (figure 4.2).

Lorsque la sonde est en place le rinçage de la corne peut commencer en introduisant le PBS (tiède) grâce à une seringue de 50 ml, avec des quantités croissantes (2x 20 ml, 2x30ml, 2x40ml, 1x50ml, 1x2ml + 30ml d'air) à chaque fois le liquide est récupéré et mis dans un flacon en verre. La même opération est réalisée sur la corne opposée. Enfin une injection de prostaglandine est réalisée pour provoquer la lyse du corps jaune et le retour en chaleur de la donneuse. Toutes les donneuses reçoivent une dose d'antibiotiques par voie intra-utérine ou générale.

Le liquide ainsi récupéré est transporté au laboratoire ou sur une paillasse de fortune aménagée (en ferme privée), il est déposé quelques minutes pour permettre la décantation. Un siphonage du surnageant est réalisé en maintenant un débit très faible pour éviter d'aspirer les embryons. Le liquide restant au fond (avec les embryons) est mis dans des boîtes de pétri quadrillées et observées sous une loupe ou un microscope inversée pour la recherche des embryons.

Chaque embryon retrouvé et aspiré et déposé dans une petite boîte ronde contenant du milieu nutritif, il sera classé selon des critères morphologiques (Annexe 3) et photographié. Les embryons utilisables (Classe 1, 2 et 3) sont conditionnés dans des paillettes transparentes de 0.25 ml.

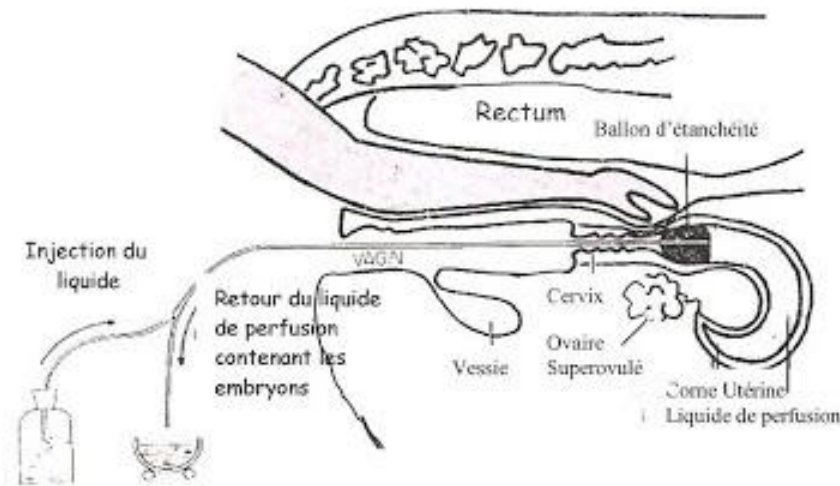


Figure 4.2 : Schéma du positionnement de la sonde pour la récolte

#### **4.2.7. Analyse statistique :**

Les résultats ont été préparés par le tableur Microsoft Excel 2007. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel R version 3.5, 2018. Il a été fait appel en premier au Test de Shapiro-Wilk pour tester la normalité de la distribution des variables quantitatives, préalable à toute application de test paramétrique. Dans un deuxième temps nous avons utilisé l'écart réduit et le test de student afin de comparer les moyennes des valeurs obtenues à une des valeurs de références (valeurs théoriques).

#### **4.3. Résultats :**

Les donneuses utilisées dans ce travail ont subi entre 1 et 3 récoltes avec un total de 33 récoltes et une moyenne de 1.8 récoltes/vache (1 à 2 récoltes par vache). Plusieurs vaches n'ont pas été récoltés soit par absence de réaction ovarienne soit un nombre de corps jaune inférieur à quatre au total et donc n'ont pas été comptabilisées dans cette étude. La réaction ovarienne est faible avec

une moyenne de 11.06 CJ/récolte, le nombre de structures récolté se situait entre 0 et 20 embryons par récolte (Annexe 2) ce qui implique par conséquent une moyenne d'embryons de 6.30 embryons/récolte (Tableau 4.1).

Tableau 4.1. : Evaluation de la réaction des vaches au traitement de superovulation

Paramètres	Nombre	$\bar{x}$
<b>Vaches</b>	18	—
<b>Récolte</b>	33	—
<b>CJ</b>	365	11.06
<b>Embryons</b>	208	6.30

Malgré le nombre faible d'embryon récolté la qualité reste correcte (l'annexe 5 représente quelques embryons collectés) avec un rapport embryons récoltés/embryons utilisable de plus de 46% et une moyenne d'ovocytes non fécondés et d'embryons dégénérés de, respectivement, 1.36 et 2.03 embryons/récolte (Tableau 4.2). Il est à noter que nous avons considéré les embryons classe 1, 2 et 3 comme utilisables.

Tableau 4.2 : Evaluation de la qualité des embryons récoltés

Paramètre	Nombre	$\bar{x}$
<b>Embryons</b>	208	6.30
<b>Utilisables</b>	96	2.91
<b>Dégénérés</b>	67	2.03
<b>Non fécondés</b>	45	1.36
<b>Utilisable/récolté</b>	46.15%	



#### **4.4. Discussion :**

L'originalité du travail réside dans le fait que nous sommes les seules à avoir réalisé des récoltes d'embryons (avec embryons viables) chez les races bovines améliorées en Algérie. De ce fait, le travail effectué nous a permis de maîtriser les principales étapes de ce processus. Il est important de signaler la difficulté que nous avons eu pour convaincre les éleveurs de l'intérêt de cette technique. L'absence de maîtrise de la conduite d'élevage a fait de sorte que les candidate à la superovulation soit très peu nombreuse.

Durant la période d'expérimentation 33 récoltes ont été effectuées avec une moyenne de 1.8, ce qui est inférieure à la capacité d'une vache à être superovulée, elle peut subir sans conséquence sur sa santé une récolte tous les deux mois pendant deux années. Ceci est dû aux aléas du terrain notamment en élevage privé, en effet plusieurs des vaches ayant été incluses dans le cheptel expérimental ont présenté des pathologies diverse, notamment gynécologiques, au cours du travail. Une fréquence importante de kystes ovariens a été observée chez les vaches après la première ou la deuxième récolte, ce qui a provoqué l'éviction de ces vaches.

Concernant la réaction ovarienne au traitement de superovulation les vaches ont globalement moyennement répondu avec une moyenne de 11.06 CJ/vache supérieure à 7 CJ considéré comme seuil au-delà duquel on considère que la réaction est satisfaisante [197], dans la littérature les résultats varient d'une dizaine de corps jaune [198] à 32 obtenus par Paulo et al [199], ce résultat peut être imputé principalement à un manque de maîtrise de la conduite d'élevage et notamment l'alimentation. Aucune stratégie de rationnement n'est appliquée, des changements brusques sont souvent opérés en raison de la fluctuation dans la disponibilité de l'aliment et de sa qualité. En élevage privée la distribution d'aliment concentré en excès influence de manière évidente le fonctionnement ovarien avec une diminution des concentrations circulantes de progestérone [110], en effet Chagas Silva et al. [200] rapporte une influence négative des faibles concentrations de P4 sur le développement folliculaire. Martins et al. [201] notent une amélioration des résultats par addition de progestérone au protocole de superovulation. De la même manière la sous-alimentation en période de rupture,

provoque des dérèglements hormonaux entraînant une insuffisance de LH [119] avec une diminution de l'amplitude et la fréquence des décharges de LH.

Les récoltes réalisées ont données une moyenne d'embryons de 6.3 dont 2.9 utilisables, ce qui est inférieur aux résultats obtenues par plusieurs auteurs, ainsi Carvalho et al [199] obtient une moyenne de 8.5 embryons dont 6.5 utilisables, Tribulo et al [202] obtient une moyenne d'embryons de 12.7 avec 8.5 transférables. Divers facteurs peuvent être incriminés l'alimentation en premier lieu, mais aussi l'âge des vaches (pour certaines âgées de 8 ans), l'état d'embonpoint et la saison qui sont autant d'élément influençant négativement les résultats des récoltes.

#### **4.5. Conclusion :**

En dépit des problèmes rencontrés sur terrain, les résultats restent encourageants. Ce travail nous a permis de maîtriser les différentes étapes de la technique de production d'embryons. Beaucoup reste à faire avec les éleveurs afin d'améliorer les conditions d'élevage et minimiser l'intervention des facteurs externes sur les résultats et diminuer la variabilité dans le nombre et la qualité des embryons.

Il est à noter toutefois l'originalité du travail effectué, en effet très peu de récoltes ont été réalisées chez les vaches de races améliorées en Algérie. De ce fait, les résultats obtenus peuvent être considérés comme valeurs référence pour les travaux avenir. On peut aussi remarques une différence entre le nombre de CJ et celui des embryons récolté, il serait utile de travailler à améliorer notre technique de récolté avec du matériel plus adapté. Néanmoins certaines vaches de notre étude ont montré un réel potentiel avec des résultats surprenants : 33 corps jaune ce qui est considéré comme une excellente réaction et un nombre d'embryons récolté de 20 (la meilleur récolté) dont 8 utilisable parmi lesquels 6 de classe 1 (voir annexe 2).

Un important travail de vulgarisation sur la technique doit être fait, en collaboration avec les institutions concernées, notamment le CNIAAG, l'ITELV et les chambres agricoles. La valorisation de cette technique comme outil de sélection au niveau des centres spécialisés (CNIAAG), mais aussi à l'échelle de

l'élevage, sera obtenu par la généralisation du transfert embryonnaire, un soutien de l'état au même titre que l'insémination artificielle pourrait aider à atteindre cet objectif.

Une étude des facteurs de variation telle que la saison ou la spéculation (laitière ou viandeuse) serait utile pour réduire la variabilité des résultats des récoltes. Un travail devra aussi être conduit sur les protocoles de traitement, il est en effet important pour réduire les coûts de l'opération et le stress sur les donneuses en réduisant le nombre d'injections de pFSH et donc par conséquent les déplacements du vétérinaire et les manipulations des animaux, cela est envisagé dans le deuxième partie de cette thèse.

## **CHAPITRE 5 : REACTION DES VACHES AUX TRAITEMENTS DE SUPEROVULATION EN FONCTION DE LA FREQUENCE D'INJECTION DES EXTRAITS HYPOPHYSAIRES**

### **5.1. Introduction :**

Cependant, la grande variabilité des résultats de production d'embryons constitue un facteur limitant dans la production d'embryons chez la vache. En effet les femelles soumises à un traitement peuvent donner de 0 à 50 embryons. Jusqu'à 20% des vaches ne donnent aucune réponse au traitement de superovulation Nibart [11] et 24% ne donnent que des embryons non utilisables [18]. Cette variabilité est due à des facteurs multiples. Le mode de traitement de superovulation joue un rôle important dans la variabilité des résultats [19]. La multiplicité des injections lors d'un traitement de superovulation à base de FSH pourrait en effet, produire un stress néfaste au développement des embryons. La réduction de son impacte par une diminution du nombre d'injections pourrait être une des voies d'amélioration. Kimura et al [20] ont effectué une seule injection en utilisant du gel d'hydroxyde d'aluminium comme excipient, aucune différence significative n'a été observé comparativement au protocole classique.

Notre travail a pour objectif de comparer la réaction des vaches à deux traitement de superovulation, Le premier, classique, comporte 8 injections à 12 heures d'intervalle, le deuxième avec trois injections à 24 d'intervalle, en utilisant la même solution, avec des doses constante et plus élevées par injection par.

### **5.2. Matériel et méthode :**

#### **5.2.1. Animaux :**

L'étude s'est déroulée dans une exploitation laitière de la région de la Chiffa à 40 Km au sud de la capitale, dans la plaine de la Mitidja située sous une latitude de 36.46° Nord et une longitude de 2.81° Est. L'exploitation comporte 120 vaches laitières, 30 veaux et vèles et une dizaine de taurillons destinés à l'engraissement. Huit vaches Holstein (réparties en deux groupes homogènes) âgées entre 4 et 6 ans et ayant un BCS (body condition score) de 3.5 à 4 estimé sur des critères d'apparence externe selon la table d'évaluation décrite par Shröder et Staufenbiel [165]. Les vaches concernées par le protocole de travail sont cyclées et ne présentent aucune pathologie gynécologique à l'examen clinique. Tous les animaux sont maintenus dans les mêmes conditions d'élevage et reçoivent la

même alimentation composée principalement de foin d'avoine et de concentré durant toute l'année. Cette ration est complétée par un apport en fourrage vert (inconstant) avec du sorgho hybride durant l'été (de juin à août et parfois jusqu'à septembre), et du trèfle fourrager entre les mois de février et avril.

### **5.2.2. Milieux et médicaments :**

Une solution commerciale d'extraits hypophysaires (Stimufol ND) a servi aux traitements de superovulation. Un milieu de collecte à base de tampon phosphate (Euroflush IMV technologies, l'aigle France), un milieu nutritifs (IMV technologies, l'aigle France) composée d'une solution de PBS additionnée de 4 g/l de BSA (bovine serum albumine), d'antibiotiques et d'antifongiques, et un milieu de congélation à base d'éthylène glycol (IMV technologies, l'aigle France) ont été utilisés lors des collectes, transfert et congélation. Une solution de lidocaïne à 2% (Xylocaine ND) a été également utilisée pour l'anesthésie épidurale. Après chaque collecte d'embryons une dose d'antibiotiques en intra utérine a été administré, ainsi qu'une prostaglandine (Prostavet ND, Virbac SA) en intramusculaire.

### **5.2.3. Matériel de collecte :**

Le matériel de collecte est constitué d'une sonde à deux voies (woerlein CH 18) munie d'un mandrin métallique, de seringues de 60 ml pour injecter et récupérer le liquide de rinçage des cornes utérine et de 20 ml pour gonfler le ballonnet situé à l'extrémité de la sonde (Figure 5.1). Pour la mise en évidence et le conditionnement des embryons nous avons utilisé un microscope inversé au plus faible grossissement, des boites de pétri ronde de 60 mm de diamètre (quadrillées) et des boites rondes de 35 mm de diamètre ainsi que des paillettes de 0.25 ml pour le conditionnement des embryons (Figure 5.2). Des chemises sanitaires ont servi à protéger la sonde de collecte.



Figure 5.1 : Matériel de collecte disposé à l'étable à proximité de la donneuse



Figure 5.2 : Matériel d'observation et de recherche des embryons

#### **5.2.4. Traitements de superovulation et récoltes :**

Les traitements de superovulation se sont étalés sur toute l'année, le troupeau de vache a été divisé en deux groupes, chacun d'eux a subi un protocole différent. Chaque vache a reçu au moins 2 traitements de

superovulation. Une dose totale de 500 µg de Stimufol ND a été injectée suivant un protocole bien précis. Une dose de prostaglandine est administrée au 3<sup>ème</sup> jour du traitement. Une double insémination est réalisée systématiquement 48 et 60 heures après. Les protocoles dans les deux groupes sont mis en place entre le 9<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour du cycle œstral après les chaleurs de référence de la manière suivante :

- **Groupe 1** : les vaches reçoivent un traitement de superovulation classique comportant 8 injections d'une solution de 500 µg de pFSH diluée dans 10 ml de solvant à concurrence de 2 injections par jour, à 12 heures d'intervalle et à doses décroissantes.

- **Groupe 2** : les vaches reçoivent un traitement de superovulation comportant 3 injections d'une solution de 500 µg de pFSH diluée dans 9 ml de solvant, à 24 heures d'intervalle et à doses constantes.

Les récoltes sont réalisées au 7<sup>ème</sup> jour après l'insémination artificielle, par voie cervicale. 5 ml de xylocaine sont administrés en épidurale, la queue est ensuite fixée latéralement. Le rectum est vidé de la matière fécale, une palpation des ovaires est réalisée à cette occasion afin d'évaluer la réaction au traitement de superovulation en estimant le nombre de corps jaunes. La région du périnée est soigneusement lavée avec une solution antiseptique puis séchée. La sonde de récolte munie d'un mandrin métallique et protégée par une chemise sanitaire est introduite, avec la main droite, à travers les lèvres vulvaires avec un angle de 45° dans un premier temps, afin d'éviter le méat urinaire, puis redressée et dirigé vers le col utérin qui est maintenu par voie transrectale avec la main gauche, la chemise sanitaire est alors rompue à l'entrée du col. La sonde progresse à travers le col par manipulation délicate. Une fois la sonde dans le corps utérin, celle-ci est dirigée vers l'une des cornes, à plus ou moins 4 cm de la bifurcation. Le ballonnet est alors gonflé afin d'immobiliser la sonde. Le liquide de collecte (PBS) est injecté et récupéré par la même voie (Figure 5.3) avec des volumes croissants (20ml×2, 30ml×2, 40ml×2, 50ml puis 20 ml de PBS et 30 ml d'air).

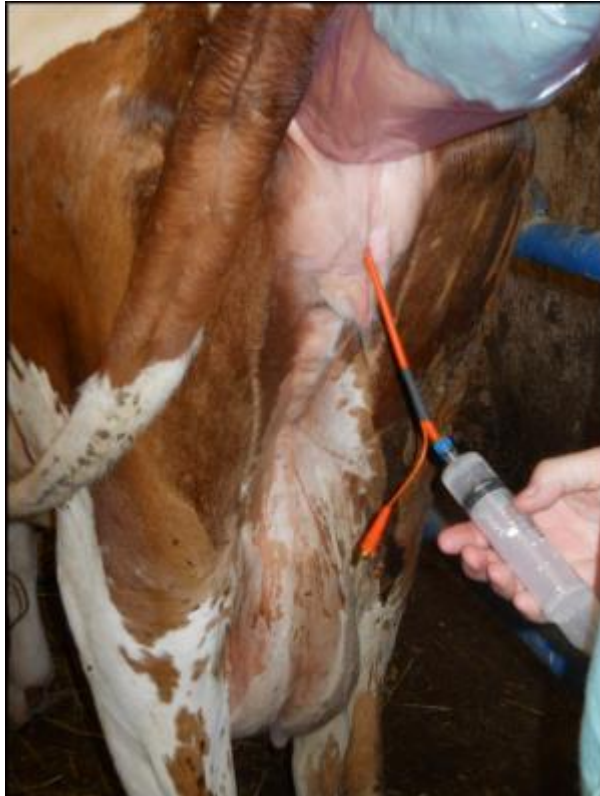


Figure 5.3 : Rinçage des cornes utérines

Une fois le rinçage de la corne droite terminé, le mandrin métallique est remis en place, le ballonnet est dégonflé, la sonde est partiellement retirée puis dirigée vers la corne gauche, une fois en place (4 cm de la bifurcation) le ballonnet est regonflé et enfin le rinçage est effectué de la même manière que pour la corne droite. Un volume total de 500 ml de la solution de PBS est nécessaire pour la collecte (250 ml par corne). Le liquide récupéré est transporté dans une paillasse aménagé à proximité de l'étable. Après décantation et élimination du surnageant, le liquide est transvasé dans les boîtes de pétri quadrillée. La recherche des embryons se fait sous un microscope inversé, ils sont transférés ensuite dans le milieu nutritif de conservation, classés sur la base de critères morphologiques [203] (Annexe 3), puis conditionnés dans des paillettes transparentes, en prenant la précaution de placer l'embryon (baignant dans le milieu nutritif) entre deux bulle d'aires, limité de part et d'autre par une phase de solution nutritive pour le transfert en frais, la paillette est ensuite bouchée puis observée sous microscope pour de vérifier la présence de l'embryon. Les embryons destinés à la congélation sont d'abord mis dans une solution de cryo-protecteur (éthylène glycol) avant d'être conditionnés en paillette puis congelés. Nous avons considéré les embryons de



classe 1, 2 et 3 comme utilisable (figure 5.4 a), les dégénérés ont été comptabilisé dans les embryons totaux et les non fécondé ont été mis à part (figure 5.4 b).

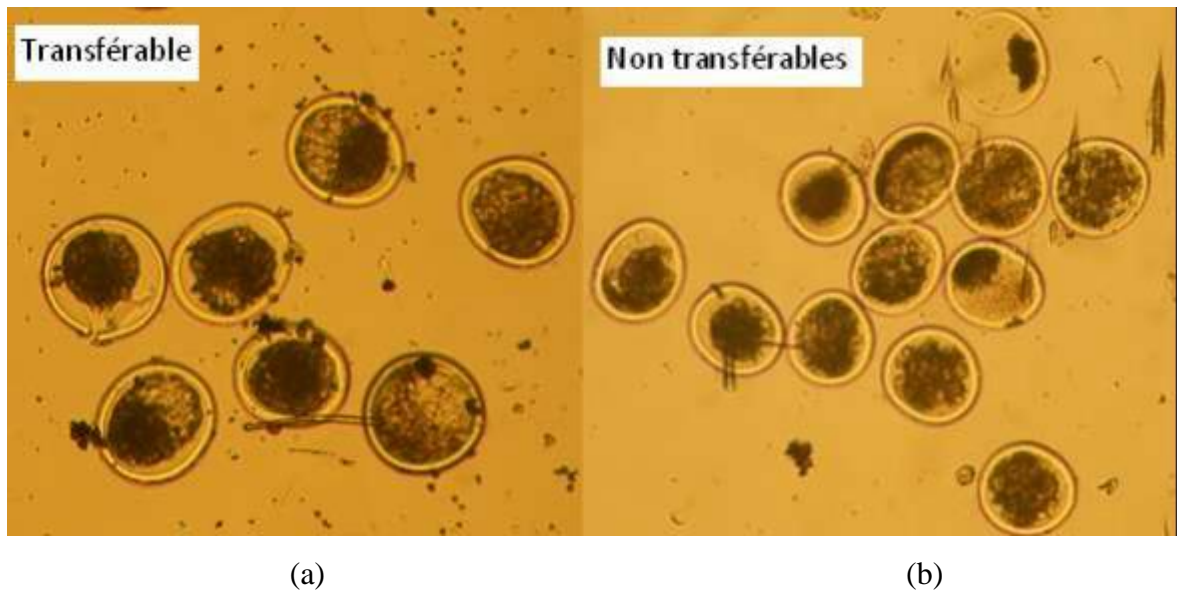


Figure 5.4 a et b : Embryons transférable (a) et non transférable (b) issus d'une même récolte

### **5.2.5. Analyse statistique :**

Les données ont été traitées grâce au logiciel SYSTAT version 7.0. La comparaison des résultats de la réaction ovarienne, du nombre et de la qualité des embryons entre les deux protocoles (3 vs 8 injections) a été réalisée avec le test de Kruscal-wallis. Les différences ont été considérées significatives pour  $p < 0.05$

### **5.3. Résultats :**

Durant les 12 mois de l'expérimentation 23 collectes ont été réalisées au total. Le tableau 4.3 représente le résultat global des collectes en fonction du protocole de superovulation.

Les réactions ovariennes sont faibles, avec un nombre moyen de corps jaunes de 9.1 par vache pour le groupe 1 et 10.4 dans le groupe 2 (Tableau 5.1). La baisse de ses moyennes est due à l'existence de plusieurs collectes avec un nombre de corps jaune de moins de 10 par vache dans les deux groupes.

Tableau 5.1: résultats des récoltes des deux groupes

Paramètres	Groupes	
	1	2
vaches	4	4
récoltes	11	12
CL ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	9.09±2	10.41±1.82
Embryons ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	5.63±1.22	6.5±1.49
utilisable ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	2.27±0.94	3.83±0.99
utilisable/récoltés (%)	45.16	56.41

SEM :Standard Error of the Mean ; CL : corpus luteum

Le nombre global d'embryons collectés dans les deux groupes est de 140 (62 et 78 respectivement pour le groupe : 1 et 2) et une moyenne globale de 6.08 par vache et un léger avantage pour le groupe 2 (5.6±1.2 et 6.5±1.5) respectivement pour le groupe 1 et 2). Malgré les faibles moyennes d'embryons par vache aussi bien dans le premier groupe que dans le deuxième, les proportions d'embryons utilisables restent correctes notamment dans le groupe 2 avec 56.41 % contre 45.16 % pour le groupe 1.

Tableau 5.2 : comparaison de la qualité des embryons des deux groupes

Paramètres		groupes	
		groupe 1	groupe 2
utilisable ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	congelables (CI 1 et 2)	2±0.90	2.83±0.83
	transférable (CI 3)	0.27±0.12	1±0.32
Non utilisable ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )	Dégénérés	1.81±0.68	2.16±0.60
	Non fécondés	1.54±0.63	0.83±0.37

SEM :Standard Error of the Mean ; CI : classe

Un léger gain en qualité des embryons a été enregistré pour le groupe 2 sans que la différence ne soit significative (tableau 5.2), néanmoins le graphe des tendances (figure 5.5) montre un avantage pour ce groupe. En effet un total de 71 embryons transférables a été collecté dont 46 dans le groupe 2 (une moyenne de

3.83±0.99) et 25 pour le groupe 1 (une moyenne de 2.27±0.94), avec 28 embryons de classe 1 contre 12 seulement pour le groupe 1 (moyennes respectives : 2.33±0.77 et 1.09±0.71). Concernant les non transférables (dégénérés et non fécondés) aucune différence n'est observée avec des moyennes de 3.36±0.98 et 3±0.75 respectivement pour le groupe 1 et 2.

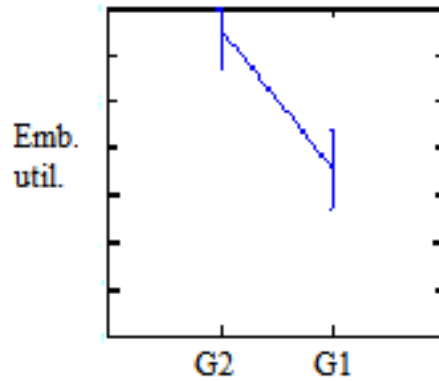


Figure 5.5: graphe des tendances de la qualité des embryons  
(G1: Group 1 G2: group 2)

#### 5.4. Discussion :

Il existe une grande variabilité dans la réaction ovarienne et les résultats des récoltes suite à un traitement de superovulation. Plusieurs facteurs conditionnent la qualité des embryons produits aussi bien intrinsèque liés à l'animal qu'extrinsèques dues aux éléments de l'environnement et la conduite d'élevage. L'un des facteurs ayant un effet sur la fertilité et la viabilité des embryons est le stress quel que soit son origine. La conception du protocole classique de superovulation, et en raison de la très courte demi vie des extraits hypophysaires utilisés [13], impose la multiplicité des interventions sur l'animal. Ainsi des injections biquotidiennes pendant quatre jours (huit injections au total) sont indispensables, ce qui constitue autant d'éléments stressants pour les animaux.

Dans notre travail nous avons réalisé 23 récoltes chez 8 donneuses réparties en deux groupes afin de voir l'éventuel avantage apporté par une réduction du nombre d'injections lors du traitement de superovulation comparativement au protocole classique. Malgré un examen clinique gynécologique préalable et un suivi de la cyclicité, un défaut de maîtrise de la conduite d'élevage et notamment de l'alimentation a fortement influencé les

réactions ovariennes et les résultats des récoltes dans les deux groupes. En effet l'action de l'alimentation sur l'activité ovarienne et la fertilité ont été bien démontrés.

Avec une moyenne globale de corps jaune d'environ 9.8 (respectivement 9.09 et 10.4 pour le groupe 1 et 2) la réaction ovarienne reste faible. Ce résultat pourrait s'expliquer par une mauvaise conduite d'élevage et notamment une alimentation déséquilibrée dans le sens d'un excédent énergétique apporté par une ration trop riche en aliment concentré. En effet l'acidose subaigüe du rumen dû à une ration riche en aliment rapidement fermentescible est préjudiciable à la reproduction [204] avec une diminution de la fertilité de 53% quand l'apporte est de 400 à 500 gr de concentré [205]. D'autre part Paragon [206] rapporte une augmentation de la fréquence des kystes folliculaires, nous avons pu faire ce constat dans notre cheptel, ce qui a été à l'origine, à plusieurs reprises, de report des traitements de superovulation.

Dans notre travail, la comparaison de la réaction ovarienne ainsi que les résultats des collectes entre les deux protocoles (3 vs 8 injections), n'a montré aucune différence significative, le même constat a été rapporté par Purwantara et al. [207], Donaldson en 1990 [208] a obtenu le même nombre moyen d'embryons transférables avec 5,3 et 5,5 respectivement pour le protocole à 3 et 8 injections. D'autres auteurs ont travaillé sur l'effet de la réduction du nombre d'injections en comparant les résultats des protocoles à injections multiples en intramusculaire et celui comportant une injection unique par voie sous-cutanée [129] ; [209]; [131] ; [66]. Ces travaux indiquent la même efficacité pour les deux protocoles. Dans notre travail, malgré l'absence de significativité, nous avons observé un léger gain en qualité des embryons collectés en faveur du groupe 2 (protocole à 3 injections), ceci est illustré dans le graphe des tendances des embryons transférables (figure : 7). Ceci pourrait être expliqué par la diminution de l'effet du stress imposé par les traitements de superovulation en réduisant les interventions sur l'animal. En effet l'action délétère du stress sur la fertilité a été rapportée par plusieurs auteurs [108] ; [11] ; [210] ce qui se matérialise le plus souvent soit par un retard de développement soit par une dégénérescence des embryons. Selon Nibart [11], la survenue d'un quelconque stress avant ou pendant un traitement de superovulation conduit à une augmentation de la sécrétion d'ACTH et empêche

l'apparition du pic de LH favorisant la formation de kyste et d'ovules de mauvaise qualité.

### **5.5. Conclusion :**

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'efficacité d'un traitement de superovulation ne comportant que 3 injections à 24h d'intervalle et de la comparer à celle d'un protocole classique (8 injections à 12h d'intervalle). Malgré le faible nombre d'embryons récoltés dans les deux groupes (3 et 8 injections), l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative, ce qui est un avantage en soit en raison de la diminution des contraintes sur l'animal et sur l'opérateur. Le graphe des tendances a néanmoins indiqué un avantage pour le groupe 2 (3 injections) concernant la qualité des embryons, une optimisation des conditions de l'expérimentation (augmentation de la taille de l'effectif et du nombre de récoltes, une meilleure maîtrise des conditions d'élevage) pourrait mettre en évidence cette amélioration qualitative. Ces constats peuvent avoir un impact direct sur le cout de la production d'embryons chez la vache, en effet la diminution du nombre d'injections réduit considérablement le coût lié aux déplacements du vétérinaire lors de la superovulation d'une part, d'autre part la possible amélioration de la qualité des embryons (suite à la réduction du stress imposé par la multiplicité des injections) permet d'accroître le rendement de l'animal.

## **CHAPITRE 6 : EFFET DU STATUT ENERGETIQUE SUR LA REACTION OVARIENNE DES VACHES SOUMISES A UN TRAITEMENT DE SUPEROVULATION**

### **6.1. Introduction :**

Le problème majeur de la production d'embryon chez les bovins réside d'une part dans l'incapacité de prédire les résultats, et d'autre part dans la variabilité des réponses aux traitements de superovulation. Cette variabilité peut être due à des facteurs intrinsèques liés à l'animal et extrinsèques tel que le climat, la conduite d'élevage, le stress et l'alimentation. Tous ces facteurs ont une action directe ou indirecte sur l'équilibre énergétique dont les perturbations sont néfastes à la reproduction des animaux.

L'objectif de ce travail est d'identifier l'influence du bilan énergétique (BE) sur la réaction ovarienne des vaches soumises à un traitement de superovulation. L'exploration du BE est matérialisée par le dosage de quelques paramètres biochimiques (AGNE, BHB, glycémie) et un suivi de la note d'état avant et pendant le traitement de superovulation.

### **6.2. Lieu et période de l'expérimentation :**

Le travail a été réalisé au niveau de la station du Centre National de l'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique (CNIAAG) situé à Baba Ali, pendant la période allant du mois de janvier à juin 2016.

### **6.3. Matériel et méthodes :**

#### **6.3.1. Animaux :**

Notre étude a porté sur 05 vaches mères à taureaux, choisi parmi 24 sélectionnées comme donneuses d'embryons (Par le CNIAAG) selon des critères zootechniques (conformation, génétique, production) et sanitaires (cyclicité, absence de pathologies gynécologiques). Les femelles sélectionnées sont de deux races mixtes : normande (n=2), race française à fort potentiel laitier, et flekvieh (n=3) dont le potentiel viandeux est prédominant voir exclusif dans certains pays tel que les USA. Les femelles sont primipares, en lactation entre 70 et 90 jours post partum, maintenues stabulation semi entravée, recevant une alimentation à base de fourrage sec complémenté avec un aliment concentré.

### 6.3.2. Matériels de dosage :

Les concentrations de BHB et la glycémie ont été déterminées sur sérum à l'aide d'un appareil portatif FreestyleOptium® (PrecisionXceed, Abbott Laboratories). Les AGNE ont été mesurés par spectrophotométrie sur un appareil DVM-NEFA (Veterinary Diagnostics, Newburg, Wisconsin, USA) (figure 6.1).



Figure 6.1 : Matériel de dosage

### 6.3.3. Choix des animaux :

Un suivi de la cyclicité des 24 vaches donneuses potentielles a été réalisé par des visites régulières au niveau de la ferme où nous avons relevé principalement le BCS et l'état des ovaires (par palpation transrectale et échographie). Un dépistage de maladies métaboliques et mammaires a été effectué suite à un examen clinique systématique et des examens complémentaires à partir de prélèvements de sang et de lait (CMT, pH, métabolites sanguins). Après avoir traité les vaches présentant des pathologies diverses (mammites, fourbures, troubles métaboliques), cinq vaches ont été retenues pour la superovulation.

### 6.3.4. Evaluation de l'état corporel :

L'évaluation du BCS est basée sur l'inspection visuelle des régions caudales et lombaires sur une grille de notation de 1 à 5 (annexe 4) décrite par

Edmonson al [211]. Les observations ont débuté quelques jours avant le traitement (15 jours environ). Trois autres observations ont réalisées au début de la superovulation, le jour de l'IA et le jour de la récolte

### **6.3.5. Profil biochimique :**

#### **6.3.5.1. Prélèvements :**

Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine caudale dans des tubes Secs de 5ml. Les tubes sont centrifugés à (3000 g pendant 10 minutes) le sérum est ensuite séparé puis transféré dans des cônes Eppendorf pour être congelés à -18°C jusqu'à réalisation des dosages.

Les prélèvements (Pr) ont été réalisés aux mêmes dates que le BCS, à savoir : J-15 (Pr1), J0 (Pr2) (Début de la superovulation), J5 (Pr3) (le jour de l'IA) et J12 (Pr4) (le jour de la récolte)

#### **6.3.5.2. Dosage du BHB et la glycémie:**

Le BHB ainsi que le glucose ont toujours été dosés avec le lecteur FreestyleOptium®. Pour utiliser cet appareil nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Une bandelette est insérée dans le lecteur
- Une goutte de sérum est déposée dans l'emplacement prévu à cet effet sur la bandelette.
- Le résultat est lu au bout de 10 secondes.

Au niveau de la bandelette, les éléments à doser (corps cétoniques et glucose) subissent une réaction d'oxydoréduction. Cette réaction est à l'origine d'un courant électrique proportionnel à la quantité d'élément à doser et c'est ce courant qui va être mesuré par l'électrode.

#### **6.3.5.3. Dosage des AGNE :**

Pour la réalisation de dosage des AGNE nous avons effectué les étapes suivantes :

- Préparer les témoins négatif (eau distillée) et positif (solution dont la concentration en AGNE est connue : 1mmol/l, et fourni avec l'appareil). Pour



le témoin négatif, le sérum est remplacé par 50µL d'eau, et pour le témoin positif, par 50µL d'une solution concentrée à 1 mmol/l en AGNE. Rajouter pour chaque échantillon 1 ml de réactif 1, laisser réagir pendant 10 minutes (réaction enzymatique). Ajouter ensuite 500µl de réactif 2 laisser agir là-encore pendant 10 minutes. Petit à petit, les tubes se colorent plus ou moins en violet. Chaque échantillon est ensuite lu par le spectrophotomètre.

- commencer d'abord par mesurer l'absorbance de la solution témoin dont la concentration est connu. Avant la mesure de la concentration en AGNE de chaque échantillon, il est nécessaire d'étalonner avec le témoin négatif.
- L'opération est répétée de manière similaire pour chaque échantillon de sérum.
- après la lecture de l'appareil, la concentration des AGNE est obtenue par la règle suivante :

$$[\text{AGNE}] \text{ échantillon} = (\text{A échantillon} \times [\text{AGNE}] \text{ témoin}) / \text{A témoin}$$

#### **6.3.4. Analyse statistique :**

L'analyse statistique été réalisée par le logiciel R version 3.5, 2018. Pour explorer une éventuelle corrélation entre le nombre de corps jaunes d'une part et les paramètres biochimiques d'autre part, Nous avons appliqué le test de corrélation des rangs de Spearman. En effet, en raison de la taille réduite de l'échantillon, la distribution des données n'obéit pas à la loi normale (de Laplace-Gauss), on a recouru au test de corrélation non paramétrique, dit aussi test de corrélation des rangs de Spearman, étant donné que le test de corrélation de Pearson exige une distribution normale des données et un grand échantillon ( $N \geq 30$ ).

### **6.4. Résultats**

#### **6.4.1. Suivi du NEC**

Il apparat d'après les résultats que le BCS des vaches est resté stable durant le traitement de superovulation, avec une variation minime de 0.25 notamment chez la vache 3 et 4 (tableau 6.1).

Tableau 6.1 : suivie du BCS

Vache	BCS			
	Obs 1	Obs 2	Obs 3	Obs 4
1	2,75	2.75	2.75	2.75
2	2,75	2.75	2.75	2.75
3	2,75	2.5	2.5	2.5
4	3	3.25	3.25	3.25
5	2,75	2.75	2.75	2.75
<b>Moyenne</b>	2,8	2,8	2,8	2,8

#### 6.4.2. Les paramètres biochimiques :

Les concentrations de BHB des donneuses sont assez faible (0.2 à 0.8 mmol/ml), sauf pour la vache 2 chez qui on a noté le niveau le plus élevé avec 2.2 mmol/ml avant le début du traitement (Pr1) mais qui diminue progressivement lors du deuxième et du troisième prélèvement (J0 et J5) (Tableau 6.2).

Tableau 6.2 : Résultat de dosage du BHB

Vache	BHB m mol/l			
	Pr 1	Pr 2	Pr 3	Pr4
1	0,7	0,4	0,2	/
2	2,2	0,8	0,4	/
3	0,8	0,2	0,4	0,3
4	/	0,3	/	0,3
5	/	0,5	/	0,3
<b>Moyenne</b>	1,23	0,44	0,33	0,3

La glycémie a subit des variations entre le début et la fin du traitement de superovulation chez la majorité des vaches. Une augmentation du glucose sanguin est notée chez toutes les femelles au début du traitement de superovulation (de l'ordre de 0.13 g/l en moyenne). Les niveaux les plus élevés, en moyenne, sont observés le jour de l'insémination (Tableau 6.3).

Tableau 6.3 : Résultat de dosage de la glycémie

Vache	glycémie g /l			
	Pr 1	Pr 2	Pr 3	Pr 4
1	0,45	0,79	0,74	/
2	0,51	0,79	1,01	/
3	0,54	0,6	0,6	0,36
4	/	0,54	/	/
5	/	0,44	/	/
<b>Moyenne</b>	0,5	0,63	0,76	0,6

Dans le tableau 6.4 on note des niveaux d'AGNE faible avant le traitement de superovulation (J-15), ces concentrations augmentent de manière importante lors de l'IA et la récolte, avec une variation d'environ 0.6 mmol/l en moyenne entre J-15 et J12. La vache 2 fait exception avec une concentration de 1.01 (le niveau le plus élevé enregistré dans toute l'expérimentation).

Tableau 6.4 : Résultat de dosage des AGNE

Vache	AGNE mmol/l			
	Pr 1	Pr 2	Pr 3	Pr4
1	0.86	1.40	2.92	/
2	0.64	0.75	0.10	/
3	0.61	0.33	1.06	1.03
4	/	0.53	/	1.55
5	/	1.31	/	1.28
<b>Moyenne</b>	0,7	0,83	1,36	1,29

Globalement nous avons noté une variation des moyennes de concentrations des paramètres biochimiques (figure 6.2). Avec une évolution croissante pour les AGNE avec les plus hauts niveaux à J5 (jour de l'IA) et J12 (le jour de la récolte), et décroissante pour les BHB débutant avec des concentrations élevées à J-15 (avant la superovulation).

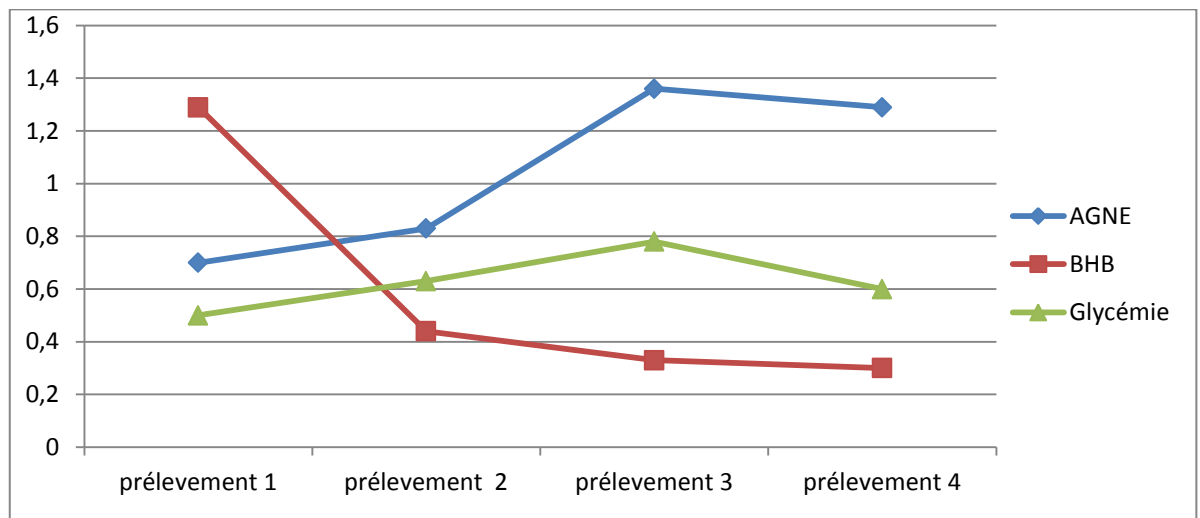


Figure 6.2 : graphe récapitulatif des concentrations moyenne des différents paramètres biochimiques.

Concernant les réactions ovarienne au traitement de superovulation, la vache 4 se démarque avec un résultat excellent avec 25 CJ, il est à noter que cette même vache a présenté les niveaux de BHB les plus faibles, les autres donneuses ont enregistré des réactions moyennes voire faibles, entre 10 CJ pour la vache 5 et 4 CJ pour la vache 2 qui a présenté les niveaux de BHB les plus élevés. Le tableau 6.5 représente les concentrations moyennes des 4 prélèvements pour les différents paramètres biochimiques ainsi que les réactions ovariennes des donneuses évaluée à travers le nombre de CJ par vache estimé le jour de la récolte.

Tableau 6.5 : Comparaison des concentrations moyennes individuelles des paramètres et la réaction ovarienne (CJ)

Vaches	GLY	BHB	AGNE	CJ
1	0,66	0,43	1,72	6
2	0,77	1,13	0,49	4
3	0,52	0,42	1,01	5
4	0,54	0,3	1,04	25
5	0,44	0,4	1,29	10

## **6.5. Discussion :**

### **6.5.1. Note d'état corporelle :**

Les mesures du BCS de la donneuse d'embryons est un bon outil pour le choix des femelles donneuses d'embryons. Tous les auteurs s'accordent à dire que l'estimation des réserves énergétiques est le principal objectif de la notation de l'état d'embonpoint même si la méthode reste subjective pour évaluer la quantité d'énergie stockée dans les muscles et dans les tissus adipeux [211]

Au regard de nos résultats la moyenne de la BCS des 5 vaches donneuses reste stable à 2,8 durant toutes les observations réalisées (avant traitement de superovulation, le début de superovulation, jour de l'IA et le jour de la récolte) elle est plus proche du profil optimal décrit par Kérouanton [154].

Il est à signaler que chez les vaches 1, 2 et 5 le BCS est de 2,75 pendant les quatre observations effectuées, alors que la vache 3 et 4 présentent une variation de 0.25 de note d'état (vers le haut pour la vache 3 et vers le bas pour la vache 4) entre la première et la dernière observation tout en restant dans des valeurs acceptables, en effet d'après Dram [212] un BCS de 2,5 à 3,5 révélerait un état corporel suffisant pour de bonnes performances reproductives.

L'absence de variation du BCS peut être dû à l'intervalle réduit entre les observations, il n'en demeure pas moins que les vaches primipares reprennent de l'embonpoint plus lentement que les multipares, car elles achèvent leur croissance lors de leur première lactation, mais leur métabolisme énergétique est plus performant [213].

Delacharlerie [189] avait montré que le BCS des vaches influait de façon significative sur la production d'ovocytes et d'embryons transférables, les meilleures donneuses ayant une note d'état supérieure ou égal à 3. En effet, pour se placer dans de bonnes conditions lors de superovulation, la plupart des collectes sont réalisées chez des vaches en bon état corporel [11].

### **6.5.2. Paramètres biochimiques :**

#### **6.5.2.1. BHB :**

Dans notre étude les résultats révèlent que les moyennes de BHB des 5 vaches durant les observations effectuées sont dans les normes sauf dans la 1<sup>ère</sup>

observation (avant superovulation), le BHB dépasse le seuil avec une moyenne de 1.23 mmol/l.

Chez les vaches 1 ,3 ,4 et 5 la concentration du BHB varie entre 0,2 et 0,8 mmol/l (limite supérieure). Pour la vache 2 il y a une augmentation importante de la concentration au prélèvement 1 (avant superovulation) de 2,2 mmol/l puis diminue à la limite supérieure de 0,8 mmol/l au 2<sup>ème</sup> prélèvement (début de traitement) on note ensuite un rétablissement à une valeur normale de 0,4 mmol/l au 3<sup>ème</sup> prélèvement (jour de l'insémination artificielle). Dans la littérature la norme pour la concentration sanguine en corps cétoniques est de (< 0.8mmol/l) pour le BHB [168].

Selon Van der Drift et al [214] et Mc Art et al [215] une vache est donnée comme présentant une cétose si elle a une concentration sanguine en BHB supérieure à un seuil compris entre 1mmol/l et 1,4 mmol/l. Le seuil le plus couramment utilisé dans la littérature est de 1,2 mmol/l à l'échelle de l'individu.

Les corps cétoniques constituent donc un réel substrat énergétique, et ne sont pas néfastes, seul leur excès peut entraîner des troubles. Un état de cétose ne peut se développer que si la production de corps cétoniques dépasse la capacité d'utilisation de ces derniers par les tissus périphériques [216]. Les corps cétoniques sont de bons indicateurs du déficit énergétique [175].

L'augmentation de la concentration sanguine en BHB relative à un épisode de cétose est associé à un risque relatif de développement de métrite selon les auteurs [217]; [218]; [219], cela peut altérer de manière importante la réaction des vaches à la superovulation, empêcher la récolte d'embryons. L'état de déficit énergétique accompagnant la cétose conduit à une diminution de la fréquence des pulses de GnRH car le rétrocontrôle exercé par l'œstradiol sur l'hypothalamus est perturbé. Ceci entraîne une diminution de la sécrétion de LH pouvant conduire à une anovulation [220].

#### **6.5.2.2. Glycémie :**

Selon Miettinen [175] les valeurs physiologiques des glycémies varient entre 0.60 à 0.70 g/l. Nos résultats révèlent que les moyennes de glycémie sont globalement dans les normes, et ne présente que des variations minimales

La glycémie, que l'organisme tend à maintenir constante, est d'une utilité très contestée pour évaluer le statut énergétique [221]. La relation entre la

glycémie et la fertilité est également très controversée. Il semblerait que la glycémie soit associée à l'infertilité quand elle est très nettement en dessous de ses valeurs usuelles [175].

Lorsque la glycémie est élevée, l'insulinémie augmente [222]. Cette augmentation de l'insulinémie entraîne une augmentation de la lipogenèse, une diminution de la néoglucogenèse hépatique, une augmentation de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (notamment les muscles) et une inhibition de la CPTI (Carnitine palmitoyltransferase I). La CPTI est une enzyme qui permet aux AGNE de pénétrer la mitochondrie. Il en résulte une baisse de la glycémie, une baisse de la concentration sanguine en AGNE et un stockage hépatique des AGNE sous forme de TG [223]. Ce qui confère à ce paramètre une influence indirecte sur le statut énergétique, il ne peut être considéré que lorsqu'il est associé à d'autres indicateurs.

#### **6.5.2.3. AGNE :**

Les valeurs plasmatiques usuelles des AGNE doivent être  $< 0.6$  mmol/l [167] ; [168]. Dans notre étude les résultats révèlent que les moyennes des AGNE durant toutes les observations réalisées sont au-dessus des normes avec des moyennes un peu élevées dans le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> prélèvement (avant et début de superovulation) de 0.7 et 0.83 mmol/l respectivement, et augmentent progressivement dans la 3<sup>ème</sup> prélèvement (IA) avec moyenne de 1.36 puis cette moyenne diminue dans le 4<sup>ème</sup> prélèvement (récolte) à 1,29 mmol/l.

L'étude de Gaal, et al. [224] donne quant à elle un seuil de concentration en AGNE de 0,7 mmol/l pour la mise en évidence d'une cétose sub-clinique avec le lecteur DVM NEFA. Chez la vache 1 la concentration des AGNE est de 0,86 mmol/l dans le premier prélèvement (avant superovulation) puis elle atteint des valeurs élevées de 1,40 mmol/l (le jour d'IA et maximale valeur de 2,92 mmol/l à la récolte. Alors que la vache 2 présente une valeur de 0,64 mmol/l avant superovulation qui augmente à 0,75 au 2<sup>ème</sup> prélèvement (début de traitement de superovulation) puis diminue à 0,10 mmol au 3<sup>ème</sup> prélèvement (IA).

La vache 3 présente une valeur de 0,61 mmol/l au premier prélèvement (avant superovulation) qui diminue à 0.33 mmol/l au début de traitement de superovulation et augmente après à 1.06 et 1.03 en 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> prélèvement (IA et récolte). La 4<sup>ème</sup> vache enregistre une augmentation de 0.53 mmol et 1.55

au 2<sup>ème</sup> (début de superovulation et 4<sup>ème</sup> prélèvement (récolte) successivement. Alors que chez la vache 5 on note des valeurs de 1.31mmol/l au début de superovulation et de 1.28 mmol/l dans le jour de la récolte, il y a donc une augmentation de la concentration des AGNE dans le 3<sup>ème</sup> (IA) et 4<sup>ème</sup> prélèvement (récolte) pour les vaches 3, 4 et 5.

Lorsque le bilan énergétique de l'organisme est positif, la concentration plasmatique d'AGNE est faible (0.35 à 0.50 mmol/l). A jeun ou quand le bilan énergétique devient négatif, elle augmente considérablement [166]. La corrélation entre les AGNE et les apports en UFL est fortement et négative : plus la ration est pauvre en énergie, plus la concentration d'AGNE circulants est élevée [169]. Les AGNE du sang sont une conséquence de la mobilisation des acides gras, ils apparaissent lors de déficit énergétique.

### **6.5.3. Réaction ovarienne le jour de la récolte**

Les structures ovariennes appréciées par palpation transrectale et échographique, révèlent une moyenne de 10 CJ et pour les 5 vaches. On note tout de même une bonne réaction ovarienne la vache 4 (25CJ). Lors d'un déficit énergétique, la diminution de la sécrétion des hormones hypophysaires et la baisse de la sensibilité ovarienne à la stimulation par les gonadotrophines expliquent les retards de maturation folliculaire et d'ovulation [225]. En effet la fréquence et à l'amplitude des pulses de LH, augmentent parallèlement au bilan énergétique [226].

Il est à signaler qu'aucune vache n'a donné d'embryons viables, les seules structures récoltées sont des embryons dégénérés et des ovocytes non fécondé, ce qui nous conduit à considérer la corrélation des paramètres biochimique plutôt avec la réaction ovarienne qu'avec les résultats des récoltes.

### **6.5.4. Corrélations entre les différents paramètres:**

La sous nutrition intervenant sur la reproduction par l'hypoglycémie provoqué, ayant pour conséquence un retard de l'apparition de follicules matures avec anomalies ultérieure de l'ovulation et mortalité embryonnaire. La mobilisation des graisses de réserves (lipolyse) se produit lorsque la glycémie est basse et se traduit par la mise en circulation d'acide gras et de glycérolé. Aussi la cétogenèse et d'autant plus importante que la disponibilité en glucose est faible [227].



Lorsque le déficit énergétique augmente, les teneurs plasmatiques en AGNE et BHB augmentent alors que la glycémie diminue. Si la glycémie représente la disponibilité en substrats énergétiques, AGNE et BHB sont en revanche les témoins de la mobilisation des réserves corporelles par l'hydrolyse des triglycérides libère en glycérol et AGNE [11].

Les bonnes productrices d'embryon présentent une concentration en AGNE plus forte Ceci nous laisse apercevoir qu'un léger déficit énergétique semble propice à de meilleurs résultats de collecte chez les vaches en lactation. Cependant, les vaches à BHB supérieur à 1mmol/l tendent à présenter moins de follicules que les vache à BHB inférieur à 1mmol/l après le vêlage l'augmentation de la teneur en corps cétoniques dans le sang fait suite à l'augmentation des AGNE [228]; [229].

Dans notre travail l'analyse statistique n'a révélée aucune corrélation entre les différents paramètres biochimiques et la réaction ovarienne. Cela est dû en grande partie à la taille de l'échantillon. Il n'en demeure pas moins que les observations individuelles signalent une mobilisation notable des réserves corporelles au cours du traitement, en témoigne les concentrations en AGNE en fin de traitement et en BHB au début du traitement. Ce nous conduit à conclure que la majorité des vaches ont présenté à un moment ou à un autre de l'expérimentation un déficit énergétique qui aurait influencé la réaction ovarienne en altérant les sécrétions de gonadotrophines [225]; [226].

#### **6.6. Conclusion :**

Malgré l'absence de corrélation révélée par l'analyse statistique, les résultats sont prometteurs. Les variations individuelles des concentrations d'AGNE et de BHB, même avec un BCS stable et correcte, signe une mobilisation des réserves corporelles. Ce fait, pendant un traitement de superovulation, est néfaste au fonctionnement ovarien et impacte de manière importante les résultats des récoltes. Les dosages effectués n'ont pas la prétention de prédire les résultats, mais ils peuvent être utilisés à priori pour le choix des donneuses.

Au vu des résultats nous pouvons envisager d'étudier la possibilité d'inclure certains indicateurs du statut énergétique dans les critères de choix des donneuses d'embryons. Il serait utile avant cela de déterminer des valeurs seuils au-delà desquelles une décision sera prise pour débiter ou non un traitement de

superovulation. Toutefois, il ne s'agit nullement de se passer des données cliniques, notamment le suivi de la cyclicité.

Nous pouvons donc recommander de refaire le travail, en augmentant le cheptel, et inclure d'autres indicateurs du statut énergétique, mais aussi de la fonction hépatique, car celle-ci aurait une influence sur le fonctionnement ovarien et la fertilité des vaches.

## CONCLUSION GENERALE

Durant ce travail de thèse, nous avons tracé la perspective de généraliser et de simplifier l'utilisation de la production et le transfert d'embryons dans les élevages à fort potentiel de production en Algérie comme outil de sélection. L'objectif en lui-même est difficile à atteindre dans les conditions actuelles, il faudrait faire au préalable un travail de vulgarisation sur les techniques moderne d'élevage et sur la technique elle-même.

Notre travail a, dans un premier temps permis de mettre à disposition des chercheurs dans le domaine de chiffres concernant la réaction ovarienne, la moyenne de récolte par vache et la proportion d'embryons utilisables par récolte. Sans parler de référence, ces chiffres peuvent en tous cas être un point de départ pour de futures recherches.

Dans un deuxième temps nous avons démontré à l'instar des rares publications à ce sujet, que le fait de réduire la fréquence d'injection d'hormones dans le protocole de superovulation, n'altère nullement les résultats des récoltes d'embryons. En soit ce résultats est important car le fait de réduire les déplacements du personnel intervenant (vétérinaire, techniciens...) permet de diminuer le coût de manière non négligeable. Nous avons noté aussi un gain de qualité d'environ un embryon par récolte, pour une vache d'élite cela représente un bénéfice important. L'efficacité du traitement de superovulation expérimental (comportant 3 injections), nous pousse à poser un certain nombre de questions pour tenter d'expliquer l'action de la FSH après le délai au-delà duquel cette hormone ne devrait plus exister dans la circulation sanguine imposé par sa demi-vie.

Enfin, dans une dernière partie nous avons tenté, malgré le faible nombre d'animaux, d'établir une relation entre le bilan énergétique et la réaction ovarienne au traitement de superovulation. Quatre paramètres ont été pris en compte, le BCS, les concentrations de BHB, d'AGNE et la glycémie, malgré l'absence de corrélation apparente, pris individuellement on peut noter un fait important, c'est que à un moment ou à un autre de l'expérimentation les donneuse était en situation de déficit en substrat énergétique, puisque les concentration des élément dosés démontre une mobilisation des réserves corporelles. C'est les traces de cette mobilisation que nous avons essayé de mettre en évidence.

## **RECOMMANDATIONS**

Au terme de ce travail, nous recommandons l'introduction de la production d'embryons, à l'échelle de l'élevage, comme outil de sélection car il compense la baisse, inévitable de la fertilité due à la sélection. Une meilleure formation des éleveurs bovins, devrait avoir un effet positif, permettant l'application de la technique dans des conditions optimales.

Un travail important doit être fait pour explorer différentes voies d'amélioration des traitements de superovulation. La fréquence des injections est un élément à approfondir, nous avons pu obtenir un résultat similaire à la méthode classique en doublant l'intervalle des injections de FSH, ce résultats pourrait être amélioré en utilisant un excipient permettant un largage progressifs. Il serait aussi intéressant d'étudier l'effet du « *priming* » ou pré traitement (en injectant de la FSH avant le début du traitement) sur les résultats des récoltes.

Certains travaux ont exploré la possibilité de prédire la réaction ovarienne, en testant la qualité de la réserve folliculaire, l'AMH (anti mühlerian hormone) parait bonne valeur prédictive. Malgré la difficulté dans notre contexte d'envisager le dosage de l'AMH dans la pratique courante, il n'en demeure pas moins que dans un cadre de recherche cela peut être réalisé dans le but de lui trouver des applications sur terrain.

Concernant la recherche dans ce domaine, il faudrait peut-être continuer à travailler sur les indicateurs du statut énergétique pour définir une liste de paramètre discriminatoires dans le choix des donneuses au lieu de se baser exclusivement sur l'aspect génétique et sanitaire des donneuses, car une vache ayant un fort potentiel et sans pathologie cliniquement décelable n'est pas toujours une bonne donneuse d'embryons.

## RÉFÉRENCES

1. Schutz, M.M. and Pajor, E.A., "Genetic Control of Dairy Cattle Behavior", *J. Dairy Sci.* 84, (2001) 31-38.
2. Barbat, A., Druet, T., Bonait, I.B., Guillaume, F., Colleau, J.J., "Overview of phenotypic fertility results after artificial insemination in the three main French dairy cattle breeds", *Renc. Rech. Rum.* 12, (2005), 137-140.
3. Ghozlane, F., Yakhlef, H., Allane, M., Bouzida, S., "Evaluation de la Durabilité des Exploitations Bovines Laitières de la Wilaya de Tizi-Ouzou (Algérie)", *New Medit.*, vol 5, n° 4(2006), 48-52.
4. Ghozlane, M. K., Atia, A., Miles, D., Khellef, D.,. *Insémination artificielle en Algérie: Etude de quelques facteurs d'influence chez la vache laitière*, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (2010).
5. MADR (Ministère de l'agriculture et du développement rural), *Dynamique de développement de la filière lait en Algérie*, Bulletin N°6 (2013), 1-3.
6. Drion, P.V., Beckers, J.F., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J.Y., Lonergan, P., *Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atresie*. *Point Vét.*, 28 (1996) 881-891.
7. Hanzen, C., Pieterse, M., Scenczi, O., Drost, M., *Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum*. *Vet. J.* 159, (2000) 161-170.
8. Monniaux, A., Caraty, F., Clément, R., Dalbiès-tran, J., Dupont, S., Fabre, N., Gérard, P., Mermillod, P., Monget, S., Uzbekova., *Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères*. *Inra Prod. Anim.* 22, 2 (2009), 59-76
9. Touati, K., Bormans, M., Ectors, F.J., Delval, A., Beckers, J.F., Ectors, F., *Effet d'une préstimulation ovarienne en début du cycle sur la réaction à un traitement de superovulation chez la vacue* *Ann. Méd. Vét.* 133 (1989) 609-612.
10. Foote, R.H. and Ellington, J.E. *Is a superovulated oocyte normal?* *Theriogenology*, 29 (1988) 111-123.
11. Nibart M., *Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage*, *Rec.Méd.Vét.* 167 (3/4) (1991) 261-290.

12. Goulding, D., Williams, D.H., Roche, J.F., Boland, M.P., Superovulation in heifers using either PMSG or FSH during the mid-luteal stage of the estrus cycle, *Theriogenology*, 36 (1991) 949-958.
13. Demoustier, M.M., Beckers, J.F., Van Der Zvalmen, P., Closset, J., Gillard, J.L., Ectors, F., Determination of plasma porcine follitropine level during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, vol 30, Issue 2(1988), 379–386.
14. Saumande J., Procureur, R., Chupin, D., Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology*, 21 (1984) 727-731.
15. Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J., Superovulatory responses of cattle, *Theriogenology*, 19 (1983) 55-81.
16. Adel, D. Etude comparative de deux extraits hypophysaire dans la production d'embryons chez la vache. Mémoire de Mgister. Faculté agrovétérinaire , Université de Blida, Algerie, (2003).
17. Ferrouk, M., Gharbi, I., Adel, D., Lafri, M., Touati, K., Kaidi, R. and Guetarni, D., Production and transfer of embryos in Algerian "Cheurfa" bovine breed, *Afr. J. Agric. Res.* Vol. 3, 4 (2008), 320-323.
18. Mapeltoft, R. and Bo, G., Superovulation in cattle, in Hopper, R.M., *Bovine reproduction*, Chapitre 75, Ed. John Wiley & Sons (2015).
19. Kanitz, W., Becker, F., Schneider, F., Kanitz, E., Leiding, C., Nohner, H. and Pöhland, R., Superovulation in cattle: practical aspect of gonadotropin treatment and insemination. 18e reunion AETE – Rolduc (2002).
20. Kimura Koji, Hirako Makoto, Iwata Hisataka, Aoki Mari, Kawaguchi Mamoru, Sekie Makoto, Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel, *Theriogenology*, 68 (2007) 633–639.
21. Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 1;69,72-80.
22. Mollgard, K., Jespersen, A., Lutterodt, M.C., Yding-Andersen, C., Hoyer, P.E., Byskov, A.G., Human primordial germ cells migrate along nerve fibers and Schwann cells from the dorsal hind gut mesentery to the gonadal ridge, *Theriogenology*, 16 (2010) 621-631.

23. Aerts, J.M., Bols, P.E., Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (2010)171- 179.
24. Wandji, S.A., Fortier, M.A., Sirard, M.A., Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol. Reprod.*, 46 (1992) 1034-1041.
25. McNatty, K.P., Heath, D.A., Lundy, T., Fidler, A.E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N., Tistall, D.J., Control of early ovarian follicular development, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 54 (1999) 3-16.
26. Smitz, J.E.J., Cortvrindt, R.G.. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*, 123 (2002)185-202.
27. Westergaard, L., Callesen, H., Hyttel, P., Meiosis inducing substances (MIS) in bovine prevulatory follicles, *Zucht hygiene* 20, (1985) 217-221.
28. Hulshof, S.C.J., Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Donk, J.A., Van Den Hurk, R., Effect of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 44 (1995) 217-226.
29. Monniaux D., Mandon-Pepin B., Monget P., 1999. Follicular atresia, a programmed wastage. *Med. Sci. (Paris)*, 15, 157-166.
30. Sirard, M.A., Florman, H.M., Leiberied-Rutledge, M.L., Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol.Reprod.*, 40(1989), 1257- 1263.
31. Gougeon, A., Busso, D., Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163 (2000) 33-42.
32. Russe, I., Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica*, 24 (1983) 77-92.
33. Driancourt, M.A., Thatcher, W.W., Terqui, M., Andrieu, D., Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy, and in response to PMSG. *Domestic Animal Endocrinology*, 8 (1991) 209-211.
34. Yanagimachi, R., Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. Second edition. Raven Press Ltd , New York, (1994), 189-317.

35. Fair, T., Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence, *Animal Reproduction Science*, 78 (2003) 203-216.
36. Armstrong, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39 (1993) 7-24.
37. Lussier, J.G., Matton, P., Dufour, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(1987) 301-307.
38. Guthrie, H. D., Grimes, R. W. and Hammond, J. M., Changes in insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 in follicular fluid during atresia of follicles grown after ovulation in pigs. *Journal of reproduction and fertility*, 104, Issue 2, (1995) 225–230
39. Monget, P., Besnard, N., Huet, C., Pisselet, C., · Monniaux, D., Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins and Ovarian Folliculogenesis, *Hormone research*. 45 (2017) 211
40. Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., Crowe, M.A., Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle, *Animal Reproduction Science*, 124 (2010)163-169.
41. Mihm, M., Austin, E.J., Good, T.E., Ireland, J.L., Knight, P.G., Roche, J.F., Ireland, J.J., Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, 63 (2000) 811-819.
42. Adams, G.P.,. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 54 (1999) 17-32.
43. Webb, R., Campbell, B.K., Garverick, H.A., Gong, J.G., Gutierrez, C.G., Armstrong, D.G., Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 54 (1999) 33-48.
44. Ginther, O.J, Kot, K., Kulick, L.J., Martin, S., Wiltbank, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108 (1996) 271-279.
45. McGee, E.A., Hsueh, A.J., Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, *Endocrine Reviews*, 21 (2000) 200-214.
46. Webb, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Campbell, B.K., Gutierrez, C.G., Garverick, H.A., Armstrong, D.G., Mechanisms regulating follicular



- development and selection of the dominant follicle, *Reproduction Suppl.* 61 (2003)71-90.
47. Ginther, O.J., Betgfelt, D.R., Kulick, L.J., Kot, K., Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles, *Biology of Reproduction*, 62 (2000) 920-927.
  48. Adams, G.P., Kot, K., Smith, C.A., Ginther, O.J., Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers, *Canadian Journal of Animal Science*, 73 (1993) 267-275.
  49. Fortune, J.E., Rivera, G.M, Evans, A.C. and Turzillo, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65 (2001) 648-654.
  50. Hodgen, G.D., The dominant ovarian follicle, *Fertil. Steril.* 38 (1982) 281–300
  51. Kastelic, J.P., Ko, J.C.H., Ginther OJ. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology*, 34 (1990) 499-509.
  52. Washburn, S.P., Silvia, W.J., Brown, C.H., McDaniel, B.T., McAllister, A.J., Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds, *J. Dairy Sci.* 85 (2002) 244–251.
  53. Wall, E., Brotherstone, S., Woolliams, J.A., Banos, G., Coffey, M.P.,. Genetic evaluation of fertility using direct and correlated traits, *J. Dairy Sci.* 86 (2003) 4093-4102.
  54. Minery S., La fertilité dans les objectifs de sélection internationaux, *Bulletin Technique de l'Insémination Animale*, 126 (2007) 23-26
  55. Mapletoft R.J., *Bovine Embryo Transfer (Ed.)*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY, R0104.1106 (2006).
  56. Casida, L.E.R., Meyer, K., McShan, W.H. and Wisnicky, W., Effects of pituitary gonadotrophins on the ovaries and induction of superfecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 4 (1943) 76.
  57. Mapletoft, R.J., Embryo transfer in the cow: General procedure. *Revisi tech off int Epiz.*, 4 (1985) 843-858.
  58. Keller, D.S., Teepker, G., The effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. *J. Dairy Sci.*, 73 (1990) 549-554.

59. Santos, J.E.P., Bilby, T.R., Thatcher, W.W., Staples, C.R., Silvestre, F.T., Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle, *Reprod. Domest. Anim.*, 43, Suppl. 2, (2008) 23–30.
60. Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P., Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. *Theriogenology*, 30, 3 (1988) 477-488.
61. Herller, A., Farries, E., Niemann, H., A trial to stimulate insulin like growth factor I levels to improve superovulatory response in dairy cows, *Theriogenology*, 33 (1990) 248.
62. Derivaux, J., *Reproduction chez les animaux domestiques*. Ed. Derouaux, Liège, I (1971) 156.
63. Saumande, J., Superovulation in cattle: last improvements and prospects, 3rd meeting european embryo transfer association, Lyon 4-5 septembre, (1987) 97-141
64. Rokhayatou, Fall, contraintes du transfert d'embryons en milieu villageois (1992) 16 20.
65. Gong, J.G., Lee, W.J., Garnsworthy, P.C. and Webb, R., Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows, *Reproduction* 123 (2002) 419-427
66. Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F. and Boland, M.P., Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns, *Ani. Reprod. Sci.* 46 (1997) 1-14.
67. Alkemade, S.J., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Superovulation in the cow: Effects of biological activity of gonadotropins, *Proc 12th Ann. Conv. AETA*, Portland, Maine, (1993).
68. Saumande, J., Concentrations of luteinizing hormone, oestradiol-17 $\beta$  and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *Journal of Endocrinology*, Volume 84, Issue 3 (1980) 425-437
69. Bevers, M.M., and Dielman, S.J., Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, a estradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicules, *Anim. Reprod. Sci.* 15 (1987) 37-52.

70. Greve, T., Bousquet, D., King, W.A. and Betteridge, K.J., In-vitro fertilization and cleavage of in-vivo matured bovine oocytes, *Theriogenology*, 22 (1984)151-165.
71. Guay, P., Bedoya, M., Effects of Gn-RH on blood serum hormone concentrations, ovulation rates and embryo production in lactating cows treated with PMSG. *Can J Comp Med.* 45, 4, (1981 Oct) 352-356.
72. Takahashi, Y., Kangawa, H., effects of LH-rh analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF2 $\alpha$ , *Japanese Journal of Veterinary Research*, 32, 4, (1984) 183 -189.
73. Wubishet, A., Graves, C.N., Spahr, S.L., Kesler, D.J., Favero, R.J.,. Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows, *Theriogenology*, 25 (1986) 423-427.
74. Drion, P., Houtain, J., Mc Namara, M., Baril, G., Heyman, Y., Cognié, Y., Theau-Clément, M., Leboeuf, B., Ectors, F., Segers, K. Beckers, JF., Utilisation répétée des gonadotropines exogènes dans le contrôle de la reproduction: justifications et effets secondaires potentiels, *Ann. Méd. Vet.*, 28 (1998) 375-396
75. Sugano, M., Shinogi, T., Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinyl pyrrolidone. *Anim. Reprod. Science.* 55 (1999)175-181.
76. Bo, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R.A., Mapletof, R.J., Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle, *Anim. Reprod. Sci.*, 39 (1995) 193-204.
77. Sharpin, R.K.C., Greaney, K.B., Rogerson, A.R., Application of Ovagen in superovulation of dairy and beef cows in USA. In: *Proceedings 16<sup>th</sup> AETE meeting, Santander, (2000 september)* 208.
78. Donaldson, L.E., The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle, *Theriogenology*, 22 (1984) 97-99.
79. Breuel, K.F., Baker, R.D., Butcher, R.L., Townsend, E.C., Inskip, E.K., Dailey, R.A., Lerner, S.P., Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows, *Theriogenology*, 36 (1991) 241-255.

80. Hasler, J.F., Brooke, G.P., McCauley, A.D., The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers, *Theriogenology*, 15 (1981) 109.
81. Detterer, J., Schmidt, T., Harlizius, B., Factors influencing the variability in superovulation results in German Holstein cattle, *Theriogenology*, 47 (1997) 169.
82. Menard, D.P., Martinez, D., We can identify our better donor cows by collecting them as heifers, In : Proceedings 13th AETE meeting, Lyon, (12-13 september 1997) 178.
83. Nibart, M., Compte-rendu du 12<sup>ème</sup> congrès ICAR, La Haye, 255 (august 1992) 19-23.
84. Govignon, A., Rohou, A., Ponsard, C., Delcroix, P., Humblot, P., Sources of variation of embryo production after superovulation in Prim Holstein dairy cows, In: Proceedings 16th AETE meeting, Santander (08-09 septembre 2000) 158.
85. Darrow, M.D., Lindner, G.M., Goemann G.G., Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows. *Theriogenology*, 17 (1982) 84.
86. De Ruigh, L., Pearson R.E., Van Wagendonk-De Leeuw J.A.M. –1995– Are “permanent donor cows” permanent donor cows?, In: Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, (8-9 septembre 1995) 158.
87. Hasler, J.F., McCauley, A.D., Scermerhorn, E.C., Foote, R.H. “Superovulatory responses of Holstein cows”, *Theriogenology*, 19 (1983) 83-99.
88. Bungartz, L., Niemann, H., “Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy suitable for superovulation by a single ultrasound examination”, *J. Reprod. Fert.*, 101 (1994) 583-591.
89. Romero, A., Albert, j., Brink, Z., Seidel, G.E., “Number of small follicles in ovaries affect suerovulatory response in holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states”, *theriogenologie* 35 (1991) 915-929
90. Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., “A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle”. *Theriogenology*, 62 (2004) 227–243.

91. Nasser, L., Adams, G.P., Bo, G.A., Mapletoft, R.J., "Ovarian super stimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers", *Theriogenology*, 40 (1993) 713–724.
92. Adams, G.P., "Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation", *Theriogenology*, 41 (1994) 19-24.
93. Malhi, P.S., Adams, G.P., Pierson, R.A., Singh, J., "Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronization and superstimulation". *Theriogenology*, 66 (2006) 1257–1266.
94. Guilbault, L.A., Rouiller, P., Matton, P., Glencross, R.G., Beard, A.J., Knight, P.G., "Relationships between the level of atresia and inhibin content (alpha subunit and alpha- beta dimer) in morphologically dominant follicle during their growing and regressing phases of development in cattle". *Biol. Reprod* 48 (1993) 268–276.
95. Baracaldo, M.I., Martinez, M.F., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., "Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle", *Theriogenology*, 53 (2000) 1239-1250.
96. Shaw, D.W., Good, T.E., "Recovery rates and embryo quality following Dominant follicle ablation in superovulated cattle". *Theriogenology*, 53 (2000) 1521–1528.
97. Driancourt, M.A., "Regulation of ovarian follicle dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction", *Theriogenology*, 55 (2001) 1211-1239.
98. Kim, I.H., Son, D.S., Yeon, S.H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H. Lee, D.W., Lee, H.J., Yoon, J., "Effect of dominant follicle removal before superstimulation of follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows", *Theriogenology*, 55 (2001) 937–945.
99. Bassiouni, H., El Deeb, Y., "Superovulatory response in relation to follicular dynamics and presence of dominant follicles in Egyptian buffaloes", *Adv. Biol. Res.* 4, 3 (2010) 169-174.
100. Harvengt, A., Chapaux, P., Spronck, C., Hanzen, C., Michaux, C., *Analyse de facteurs d'environnement influençant la récolte d'embryons*, In: *Renc. Rech. Rum.*, 5 (1998) 87.

101. Freytag, A., Lange, H., Gehrmeyer, D., Jongeling, C. "Effect of temperature, atmospheric pressure and relative humidity on the response of superovulation in cattle", In : Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, (8-9 september 1995) 170.
102. Benyei, B., "Superovulation response of Holstein-Frisian cattle – born and grown up in mid-Europe in tropical environment", In: Proceedings 13th AETE meeting, Lyon, (12-13 september 1997) 130.
103. Humblot, P., Rodrigues, J.L., Nibart, M., Silvestrini, Tiezzi, F.L., Jeanguyoy, N., Thibier, M., "Effet du mode de synchronisation des cycles sexuels sur la réponse hypophysaire et la fonction ovarienne après superovulation chez la vache, Elev. Insem. 261(1994) 7-18.
104. Shankar, U., Agarwal, S.K., Yadav, M.C., "Seasonal influence on superovulation response and production of embryos in cattle". Indian Vet. J. (September 1998) 807-809.
105. Kafi, M., McGowan, M.R., "Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle". Ani. Reprod. Sci. 48 (1997) 137-157.
106. Tonhati, H., Lobo, R.B., Oliveira, H.N., "Repeatability and heritability of response to superovulation in holstein cows", Theriogenology, 51 (1999) 1151-1156.
107. Benyei, B., Fari, M., Baarros, C.W.C., Solti, L., "Superovulatory response in continuously heat stressed holstein-friesian cattle in Brazil", Theriogenology, 51(1999) 260.
108. Putney, D.J., Drost, M., Thatcher, W.W. "Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination", Theriogenology, 30 (1988)195-209.
109. O'Callaghan, D., Boland, M.P., "Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants", Anim. Science. 68 (1999) 299-314.
110. Freret, S., Grimard, B., Ponter, A., Humblot P., Variation du niveau d'apport nutritionnel et production d'ovocytes et d'embryons chez les ruminants: étude bibliographique . Elev. Insem. 297 (2000) 3-25.
111. McEvoy, T.G., Broadbent, P.J., Gebbie, F.E., Dolman, D.F., Watt, R.G., Higgins, L.C., "Progesterone profiles and superovulatory responses of

- Simmental heifers in relation to pre-ovulatory energy intake and progesterone priming treatment”, *Theriogenology*, 45, (1996) 330.
112. Gong, J.G., Armstrong, D.G., Baxter, G., Garnsworthy, P.C., Webb, R. “The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers”, *J. Repro. Fertil.* 23 (1999) 22.
113. Landau, S., Braw-tal, R., Kaim, M., Bor, A., Bruckental, I. “Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows”, *Ani. Reprod. Sci.* 64 (2000) 181-197.
114. Mantovani, R., Enright, W.J., Keane, M.G., Roche, J.F., Boland, M.P., “Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers”, *Proceeding 9th AETE meeting. Lyon, (10-11 septembre 1993).*
115. Negrao, S., Nibart, M., Humblot, P., “Negative effects of overfeeding on superovulatory response and embryo production in dairy heifers”, *Proceeding 13th AETE meeting. Lyon (12-13 september 1997)* 186.
116. Humblot, P., Negrao S., Nibart, M., “Effects of high energy supply and metabolic status on superovulatory response and embryo production in dairy heifers” *Theriogenology*, 49 (1998) 378.
117. Laizeau, J.S., *Facteurs de variation de la production d’embryons chez la vache laitiere de race montbeliarde, Thèse ENV paris , France (2003)* 395
118. Dunne, L.D., Diskin, M.G., Boland, M.P., O’Farrell, K.J., “Sreenan, J.M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim. Science*”. 69 (1999) 411-417.
119. Schillo, K.K., “Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep”, *J. Anim. Sci.* 70 (1992), 1271-1282.
120. Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Gielen, J.T., Wurth Y.A., Janszen B.P.M., Van De Broek, J., Willemse, A.H. “Yield of embryos in PMSG-superovulated cows treated with anti-PMSG six or 18 hours after the peak of luteinising hormone. *Veterinary Record*”, 132 (1993) 186-189.
121. Estrada, J.L., Pachon, L.A., Olivera, M., Pidrahita, J., Westhusin, M., “Superovulatory response of colombian creole cattle to two doses of FSH”, *Theriogenology*, 49 (1998) 377.
122. Yaakub, H., Duffy, P., O’Callaghan, D., Boland, M.P., “Effect of timing of œstradiol benzoate injection relative to gonadotropin treatment on

- superovulatory response and on embryo yield and quality in beef heifers”. *Ani. Reprod. Sci.* 52 (1998) 191-204.
123. Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Wurth, Y.A., Gielen J.T., Willemse A.H., “Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak”, *Theriogenology*, 31(1989) 473-487.
  124. Alfuraiji, M.M., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S.M., Dolman D.F., Atkinson, T., “Superovulation using different doses of PMSG and monoclonal anti-PMSG in cattle”. *Theriogenolog.* 33 (1990) 186.
  125. Zeitoun, M.M., Yassen, A.M., Hassan, A.A., Fathelbab, A.Z., Wise, T.H., Maurer, R.R., “Superovulation using PMSG and anti-PMSG in beef cows”, *Theriogenology*, 29 (1988) 339.
  126. Gonzales A., Lussier J.G., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. “Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new FSH preparation containing reduced LH activity”. *Theriogenology*. 33, (1990), 519-529.
  127. Yamamoto, M., Ooe, M., Fujii, C., Suzuki T., “Superovulation of Japanese Black heifers treated with FSH-P and FSH-R. *J. Vet. Med. Sci.* 55, (1993) 133-134.
  128. Touati, K., Thèse de doctorat, « Essai de production d’embryons dans l’espèce bovine », université de Liège, Belgique (1993).
  129. Misra, A.K., Chaubal, S.A., Krishna Kishore, G., Rajeshwaran, S., Joshi, B.V, Jaiswal, R.S., “Superovulatory response to single subcutaneous injection of Folltropin in Holstein and Sahiwal cows. *Theriogenology*” 37 (1992) 260.
  130. Hockley, D.K., Bo, G., Palasz, A.T., Del Campo, M.R., Mapletof, R.J. “Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin-V in the cow: effect of dose and site of injection”, *Theriogenology*, 37 (1992) 224.
  131. Bo, G.A., Pierson R.A., Mapletoft R.J. “The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants’. *Theriogenology*. Vol 36, Issue 2, (1991), 169–183.
  132. Bungartz, L., Niemann, H. “Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy suitable for superovulation by a single ultrasound examination”, *J. Reprod. Fert.*, 101 (1994) 583-591.



133. Suzuki, T., Yamamoto, M., OE M., Takagi, M. "Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone". *Vet. Record.* 135, (1994) 41-42.
134. Hahn J. "Attempts to explain and reduce variability of superovulation", *Theriogenology.* 38 (1992) 269-275..
135. Sheldon, I.M., Dobson, H. "Postpartum uterine health in cattle". *Anim. Reprod. Sci.* 82–83 (2004) 295–306.
136. Barros, C.M., Betts, J.G., Thatcher, W.W., Hansen, P.J. "Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon- $\alpha$  in cows: effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH". *J. Endoc.* 133 (1992) 175–182.
137. Butler, W.R. "Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle". *Animal Reproduction Science* 60-61 (2000) 449-457.
138. Wathes, D. C., Fenwick, M. Cheng, Z. Bourne, N. Llewellyn, S. Morris, D. G. Kenny, D. Murphy, J. and Fitzpatrick, R.. "Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology,* 68 (Suppl. 1) (2007) 232.
139. Bauman, D.E., and Currie, B. "Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis". *J. Dairy Sci.* 63 (1980) 1514.
140. Butler, W.R., Everett, R.W., Coppock, C.E. "The relationship between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows". *J.Anim.Sci.* 53 (1981) 742-748.
141. Nebel, RL, Mcgilliard, ML. "Interactions of high milk-yield and reproductive performance in dairy-cows". *J Dairy Sci;* 76 (1993) 3257-3268.
142. Butler, W.R, Smith, R.D. "Interrelationships between energy balance and post-partum reproductive function in dairy cattle". *J. Dairy Sci.* 72 (1989) 767-783.
143. Staples, CR, Thatcher, W.W. Clark, J.H, "Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows" *Journal of Dairy Science* 73 (1990) 938-947.
144. Villa-Godoy, A, Hughes, T.L, Emery, RS. "Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.,* 71 (1988) 1063-1072.

145. Langin, D, Dicker, A, Tavernier, G, Hoffstedt, J, Mairal, A, Rydén, M, Amer, E, Sicard, A, Jenkins, C.M, Viguerie, N, Van Harmelen, V, Gross, RW, Holm, C, Arner, P. "Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity". *Diabetes* 54 (2005) 3190-3197.
146. Bauman, D.E and Bruce Currie, W "Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis". *Journal of Dairy Science* 63 (1980), 1514-1529.
147. Asl, A.N, Nazifi S, Ghasrodashti, A.R & Olyae, A. "Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. *Preventive Veterinary Medicine*" 100 (2011) 38-43.
148. Grummer, R.R "Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle". *The Veterinary Journal* 176 (2008) 10-20.
149. Wolter, R. "Alimentation de la vache laitière". Paris : France Agricole, (1992), 223 p.
150. Bazin, S. "Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie-Noires". Paris (France) : ITEB-RNED, (1984). 31 p.
151. Agabriel, J, Giraud, JM, Petit, M, Barboiron, C, Coulaud, G, "Détermination et utilisation de la note d'état d'engraissement en élevage allaitant". *Bull. Tech. C.R.Z.V.* 66 (1986) 43-50.
152. Broster, W.H Broster, V.J. "Body score of dairy cows. *J. Dairy Res.*, 65 (1998) 155-173.
153. Heinrichs, A.J, O'Connor, M.L. "Charting body condition identifies problems in dairy cows. *Feedstuffs*", 15 (1991) 15-16.
154. Kerouanton, J. "Etat d'engraissement des vaches laitières : des courbes-objectifs réajustées. *A la pointe de l'élevage*", (1993), 11-14.
155. Butler-Hogg, B. W., J. D. Wood, and J. A. Bines. "Fat partitioning in British Friesian cows: The influence of physiological state on dissected body composition". *J. Agric. Sci.* (1985)104-519.
156. Otto, K.L. "Relationship between body condition score, ultrasonic fat measurement, and composition of 9–11<sup>th</sup> rib tissues in Holstein dairy cows". MS Thesis. Cornell Univ., Ithaca, NY (1990).

157. Domecq, J.J., Skidmore, A.L. Lloyd, J.W. and Kaneene. J.B. "Validation of body condition scores with ultrasound measurements of subcutaneous fat of dairy cows". *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 2308.
158. MacDonald, K.A., Penno, J.W. and Verkerk. G.A. "Validation of body condition scoring by using ultrasound measurements of subcutaneous fat". *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 59 (1999) 177.
159. Mizrach, A., Flitsanov, U. Maltz, E. Spahr, S.L. Novakofski, J.E. and Murphy. M.R. "Ultrasonic assessment of body condition changes of the dairy cow during lactation". *Trans. ASAE.* 42 (1999) 805.
160. Schwager-Suter, R. "Efficiency of dairy cows differing in body size when feed quality is varied". PhD Diss. Swiss Fed. Inst. of Technol., Zurich, Switzerland (1999).
161. De Campeneere, S., Fiems, L.O. and Boucqué. C. V. "In vivo estimation of body composition in cattle". *Nutr. Abstr. Rev.* 70 (2000) 495.
162. Schwager-Suter, R., Stricker, C. Erdin, D. and Kunzi. N. "Relationship between body condition scores and ultrasound measurements of subcutaneous fat and musculus longissimus dorsi in dairy cows differing in size and type". *Anim. Sci.* 71 (2000) 465.
163. Zulu, V.C., Nakao, T. Moriyoshi, M. Nakada, K. Sawamukai, Y. Tanaka, Y. and Zhang. W.C. "Relationship between body condition score and ultrasonographic measurement of subcutaneous fat in dairy cows. Asian-Australas". *J. Anim. Sci.* 14 (2001) 816.
164. Jaurena, G., Moorby, J. M. Fisher, W. J. and Cantet. R. "Association of body weight, loin longissimus dorsi and backfat with body condition score in dry and lactating dairy cows". *Anim. Sci.* 80 (2005) 219.
165. Schröder, U.J., and Staufenbiel. R. Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. *J. Dairy Sci.* 89, (1), (2006) 1-14.
166. Jean-Blain C. « Adaptation ou défaillance hépatique au cours du cycle de reproduction chez les ruminants ». *Point Vét.*, (n° spécial "Maladies métaboliques des ruminants") 27 (1995), 9-16.
167. Wolter R. « Alimentation de la vache laitière ». Paris : France Agricole, (1992) 223.

168. Brugere-Picoux J. « Maladies métaboliques et biochimie clinique de la vache laitière ». La Dépêche Technique, 46 (1995), 30 p.
169. Doreau M, Flechet J, Lefaiivre R, Ollier A, Sornet C. "Effects of food intake on variations in different plasma constituents at the end of gestation and the start of lactation". Ann. Rech. Vet., 14, (1983), 39-48
170. Schelcher F, Valarcher JF, Foucras G, Espinasse J. « Profils métaboliques : intérêts et limites ». Point Vét., 27 (n° spécial "Maladies métaboliques des ruminants"), (1995), 25-31.
171. Van Knegsel ATM, Van den Brand H, Dijkstra J., Kemp B., "Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation". Theriogenology 68, (Supplement 1) (2007), S274-S280.
172. Bareille S, Bareille N. "La cétose des ruminants". Point Vét., 27 (n° spécial "Maladies des ruminants"), (1995), 47-58.
173. Brockman RP. "Roles for insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis - a review". Can. Vet. J., 20, (1979), 121-126.
174. Vagneur M. « Biochimie de la vache laitière appliquée à la nutrition ». La Dépêche Technique, 28, (1992), 26 p.
175. Miettinen PV. "Correlation between energy balance and fertility in Finnish dairy cows". Acta. Vet. Scand., 32, (1991), 189-196.
176. Kappel LC, Ingraham RH, Morgan EB, Zeringue L, Wilson D, Babcock DK "Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows". Am. J. Vet. Res., 45, (1984), 2607-2612.
177. Kronfeld DS, Donoghue S, Copp RL, Stearns FM, Engle RH "Nutritional status of dairy cows indicated by analysis of blood". J. Dairy Sci., 65, (1982) 1925-1933.
178. Parker BN, Blowey RW. "Investigations into the relationship of selected blood components to nutrition and fertility of the dairy cow under farm conditions". Vet. Rec., 98, (1976), 394-404.
179. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. "Clinical biochemistry of domestic animals". San Diego (USA) : Academic Press, (1997). 932 p.
180. Grimard B, Humblot P, Ponter A, Mialot J, Sauviant D, Thibier M. "Influence of post-partum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol

- secretion and follicular development in suckled beef cows". *Reprod. Fertil.*, 104, (1995), 173-179.
181. Y. Chilliard, F. Bocquier, C. Delavaud, Y. Faulconnier, M. Bonnet, M. Guerre-millo, P. Martin, A. Ferlay. « Leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels ». *INRA Productions Animales*, 12, (1999), 225-237.
  182. McCann JP, Bergman EN. "Endocrine and metabolic factors in obesity". In: Dobson A & Dobson MJ. "Aspects of digestive physiology in ruminants". Proceedings of a satellite symposium of the 30<sup>th</sup> international congress of the International Union of Physiological Science. Ithaca (NY, USA): Cornell University Press, 1998.
  183. Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD. "Insulin-like growth factor I in dairy cows: relationship among energy balance, body condition, ovarian activity, and oestrus behavior". *J. Dairy Sci.*, 73, (1990), 929-937.
  184. Ruegg, PL, Goodger, WJ, Holmberg, CA, Weaver, LD, Huffman, EM. "Relation among body condition score, milk production, and serum urea nitrogen and cholesterol concentrations in high-producing Holstein dairy cows in early lactation". *Am. J. Vet. Res.*, 53, (1992), 5-9.
  185. Beam, SW, Butler, WR., "Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat". *Biol. Reprod.* , 56 (1997), 133-142.
  186. Barnouin, J, Fayet, JC, Levieux, D, Chacornac, JP, Paccard, P. « Ecopathologie et utilisation de marqueurs biochimiques en épidémiologie globale. Application aux facteurs de risque de l'agression hépatique chez la vache ». In : XXII Simposio Internazionale di Zootecnia, (1988), 43-59.
  187. Dominguez, M.M. "Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows". *Theriogenology*. 43, (1995), 1405-1418.
  188. Snijders, SEM, Dillon, P, O'Callaghan, D, Boland, MP, "Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows". *Theriogenology* 53 (2000), 981-989.
  189. Delacharlerie, P.F, « Relations entre le régime alimentaire et la réponse à la superovulation chez la vache laitière. DEA Sciences Agronomiques ». ENSAIA Nancy, (1995) 28 p.

190. Maltz, E., S. Devir, J. H. M. Metz, and H. Hogeveen. "The body weight of the dairy cow I. Introductory study into body weight changes in dairy cows as a management aid". *Livest. Prod. Sci.* 48, (1997),175.
191. Mulvany, P.M. "Dairy cow condition scoring. p. 349 in *Occas*". Publ. No.4. Br. Soc. Anim. Prod., Edinburgh, UK (1981),.
192. Carvalho, P.D, Souza, A.H. Sartori, R. Hackbart, K.S. Dresch, A.R. Vieira, L.M. Baruselli, P.S. Guenther, J.N. Fricke, P.M. Shaver, R.D. Wiltbank, M.C., "Effects of deep-horn AI on fertilization and embryo production in superovulated cows and heifers" *Theriogenology*, 80 (2013) 1074–1081
193. Leroy, JLMR, Vanholder, T, Delanghe, JR, Opsomer, G, Van Soom, A, Bols, PEJ, Dewulf, J, De Kruif, A "Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post-partum". *Theriogenology* 62 (2004), 1131-1143.
194. Leroy, JLMR, Vanholder, T, Mateusen, B, Christophe, A, Opsomer, G, De Kruif A, Genicot, G & Van Soom, A, Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130 (2005), 485-495.
195. Bobe, G, Young, JW & Beitz, DC, "Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows". *Journal of Dairy Science*, 87 (2004), 3105-3124.
196. Kaufmann, T, Drillich, M, Tenhagen, B.A, & Heuwieser, W, "Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis". *BMC Veterinary Research* (2010), 647.
197. Kohram H. et Poorhamdollah M., "Relationships between the ovarian status and superovulatory responses in dairy cattle". *Animal Reproduction Science*, 131, (2012), 123–128.
198. Mattos, M.C.C. Bastos, M.R. Guardieiro, M.M. Carvalho, J.O. Francoc, M.M. Mourão, G.B. Barros, C.M. Sartori, R. "Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors", *Animal Reproduction Science*, 125, (2011) 119–123.

199. Paulo D. Carvalho, Katherine S. Hackbart, Robb W. Bender, Giovanni M. Baez, Ana R. Dresch, Jerry N. Guenther, Alex H. Souza, Paul M. Fricke "Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study", *Theriogenology* 82 (2014) 481–489.
200. Chagas Silva, J., Lopes da Costa, L., Robalo Silva, J., "Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers". *Anim. Reprod. Sci.* 69, (2002), 1-8.
201. Martins, CM, Rodrigues, CA, Vieira, LM, Mapletoft, RJ, Bó, GA, Sa, FM, Baruselli PS, "The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination". *Theriogenology*: 05 (2012), 007
202. Tríbulo, A. Rogan, D.H. Tríbulo, R. Alasino, D. Beltramo, Bianco, I. Mapletoft, R.J. and Bó. G.A. "Super-stimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V". *Anim. Reprod. Sci.* 129, (2011), 7–13.
203. Eldsen, R.P, Nelson, LD. and Seidal, GE. "Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin", *Theriogenology*, 9. 224 (1978) 17-26.
204. Barnouin, J, Chacornac JP. "A nutritional risk factor for early metritis in dairy farms in France, *Prev. Vet. Med*, 13 (1992) 27-37.
205. Poncet, J. « Etude des facteurs de risque de l'infertilité dans les élevages bovins laitiers de l'île de la réunion/ influence de l'alimentation sur la reproduction, Thèse d'exercice. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France (2002).
206. Paragon, BM. "Food quality and fertility in heifer and adult cow: importance of non-energy nutrients". *Bull. G.T.V.*, 91. (1991), 39-52.
207. Purwantara, B., Callesen, H. and Greve, T. "Characteristics of ovulations in superovulated cattle", *Ani. Reprod. Sci.*, 37. (1994), 1-5.
208. Donaldson, L.E "Superovulation in cattle". In: *Proceedings 6th AETE meeting, Lyon, (7-8 septembre 1990)*. 136
209. Hockley, DK, Bo, GA, Palasz, AT, Del Campo, MR, Mapletoft, RJ. "Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin-V in the cow: effect of dose and site of injection". *Theriogenology*, 37 (1992) 224.

210. Dobson, H., Tebble, J.E, Smith, RF. and Ward, WR. "Is stress really all that important?". *Theriogenology*, 55. (2001) 65-73.
211. Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, (1989), 68-78.
212. Dram, .ED, Hanzen, CH, Hontain, JY, « Profil de l'état corporel ou cours du post partum chez la vache laitière ». *Ann. Ned. Vet*, 143 (1999), 265-270.
213. Ruegg, PL, Milton, RL. "Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward island, Canada: Relationships with yield, Reproductive Performance and Disease". *J Dairy Sci*, 78 (1995), 552-564
214. Van der Drift, S.G.A, Jorritsma, R,J. Schonewille, T. Knijn, H.M., Stegeman J.A. "Routine Detection of hyperketonemia in Dairy Cows Using Fourier Transform Infrared spectroscopy analysis of B-hydroxybutyrate and acetone", Vol. 35, 9, (2012), 4886-4898
215. McArt, J., Nydam, D.V. Ospina, P.A and. Oetzel, G.R, "A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis", *Journal of Dairy Science* Vol. 94 (2011) 12.
216. Le Bars, H. Interrelation entre glycogénèse et lipogénèse chez les ruminants. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 1991, Vol. 64, 2, (1991), 193-206.
217. Galvão, N.K. Flaminio, M.J.B.F Brittin, S.B. Sper, R. Fraga, M. Caixeta, L. Ricci, A.L. Guard, C. Butler, W.R. Gilbert, R.O. "Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows". *Journal of Dairy Science*, Vol. 93, 7 (2010), 2926-2937.
218. Duffield, TF, Lissemore, KD, McBride, BW, Leslie, KE "Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production". *J Dairy Sci* 92 (2), (2009), 571-580.
219. Ospina, P.A.,. Nydam, D.V Stokol, T. and Overton. T.R. "Associations of elevated non esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States". *J. Dairy Sci.* 93-4 (2010) 1596-1603.



220. Monget, P., Froment, P., Moreau, C., Grimard, B. & Dupont, J. « Les Interactions métabolisme-reproduction chez les Bovins – Influence de la balance énergétique sur la fonction ovarienne ». Proceeding Congrès de la Buiatrie- Québec. (Juillet 2004).
221. Randel, R.D. “Nutrition and postpartum rebreeding in cattle”. J. Anim. Sci., 68, (1990), 853-862.
222. Herdt, TH, Stevens, JB, Linn, J, Larson, V. “Influence of ration composition and energy balance on blood B-hydroxybutyrate (ketone) and plasma glucose concentrations of dairy cows in early lactation”. Am. J. Vet. Res. 7, (1981), 1177-1180.
223. De Boer, G., Trenkle, A. Young, J.W., “Glucagon, insulin, growth hormone, and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows”. Journal of Dairy Science, Vol. 68, 2, (1985), 326-337.
224. Gaal, T., et Ribiczey, P. “Evaluation of three laboratory methods measuring NEFA in cow's blood”. Hungarian Veterinary Journal. Vol. 130, (2008) p. 7.
225. Jolly, PD, McDougall, S, Fitzpatrick, LA, Macmillan KL, Entwistle KW. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. J. Reprod. Fertil. Suppl, 49, (1995), 477-492.
226. Canfield, RW, Sniffen, CJ, Butler, WR. “Effects of excess degradable protein on post-partum reproduction and energy balance in dairy cattle”. J. Dairy. Sci., (1990), 73, 2342-2349
227. Metge, J. Berthelot, X. carotte, G. “la production laitière, livre édition, Nathan, Paris, France“ (1990).
228. Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T.F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos J.E.P. and Le Blanc S.J., “The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period”, J. Dairy Sci. Vol. 94, 10, (2011) 4897-4903
229. Roberts, T., Chapinal, N., Leblanc, S.J, Kelton D.F, Dubuc, J, Duffield, T.F “Metabolic parameters in transition cows as indicators for early lactation culling risk”, J. Dairy Sci. Vol. 95, 6, (2012), 3057-3063.

## ANNEXE 1 : LISTE DES ABREVIATIONS

AA: Acide acétique

AGNE: Acides gras non estérifiés

ALAT: Alanine aminotransférase

ARN : Acide ribonucléique

ASAT : Aspartique aminotransférase

ATP: Adenosine triphosphate

BCS: Body score condition

BHB: Beta hydroxybutirat

BP: Binding protéine

BVD: Bovine viral diarrha

Cl: Classe

eCG : Equine chorionique gonadotrophine

FSH : Follicul stimulating hormone

GGT: Gammaglutamyl transférases

GLDH: Glutamic déshydrogénase

GnRH : Gonadotropine

hMG ; Human menauposal gonadotrophine

IA: Insémination artificielle

IBR: Infectious bovine rhinotracheite

IGF: Insuline-like growth factor

LH : Luteinising hormone

MIS : Meiosis inducing substance

ND: Nom déposé

NEC: Note d'état corporelle

NEFA: Non esterified fatty acide

OCT: Ornithine carbamoyltransférase

ONIL : Office interprofessionnel de lait

PAL: Phosphatase alcaline

PBS: Phosphate buffered saline

PGC : Primordial germinal cells

PMSG: Pregnant mare serum gonadotropine

PVP: Polyvidone pyrrolidone

SDH: Sorbitol déshydrogénase

SEM: Standard error of the mean

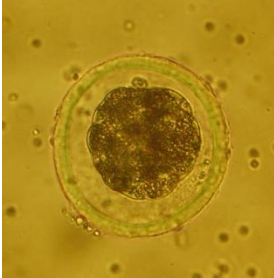
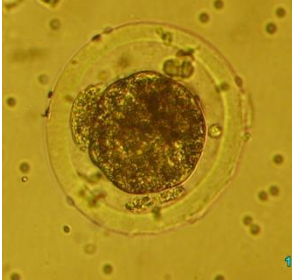
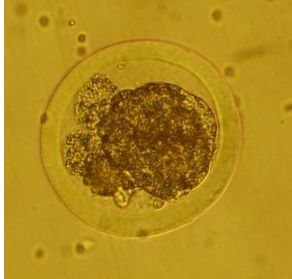
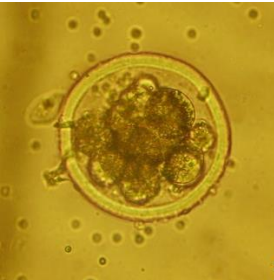
ZP: Zone pellucide

**ANNEXE 2 : DETAIL DES REACTIONS OVARIENNES ET DES RECOLTES  
PAR VACHE (EXPERIMENTATION 1)**

N°	CJ	Récoltés	CI 1	CI 2	CI 3	CI 4	NF	Util
1	8	4	1	2	1	0	0	4
2	2	0	0	0	0	0	0	0
3	5	4	0	0	0	2	2	0
4	6	6	0	0	0	1	5	0
5	4	4	0	2	0	1	1	2
6	1	1	0	0	1	0	0	1
7	12	11	1	1	0	3	6	2
8	10	7	0	0	0	6	1	0
9	21	9	8	1	0	0	0	9
10	20	13	2	4	1	6	0	7
11	11	3	0	0	0	1	2	0
12	7	7	2	2	2	1	0	6
13	2	0	0	0	0	0	0	0
14	23	14	6	0	3	5	0	9
15	9	4	2	0	0	2	2	2
16	9	8	1	0	3	4	0	4
17	7	0	0	0	0	0	0	0
18	5	5	0	0	1	4	0	1
19	8	8	0	0	0	0	8	0
20	10	9	1	1	1	6	0	3
21	8	5	5	0	0	0	0	5
22	16	9	3	2	1	3	0	6
23	21	11	8	1	1	1	0	10
24	22	8	0	0	0	0	8	0
25	4	1	0	0	0	1	0	0
26	2	0	0	0	0	0	0	0
27	7	0	0	0	0	0	0	0
28	15	0	0	0	0	0	0	0
29	14	11	2	2	0	7	0	4
30	23	20	6	1	1	12	0	8
31	24	15	7	3	2	3	0	12
32	7	3	0	1	0	0	2	1
33	22	8	0	0	0	0	8	0
Total	365	208	55	23	18	69	45	96
Moyenn e	11,06	6,30					1,36	2,91

CJ : corps jaunes ; CI : classe ; NF : non fécondés ; Util : utilisables

### ANNEXE 3 : DIFFERENTES CLASSES D'EMBRYONS

Classe	Qualité	Description
1	Excellent	<ul style="list-style-type: none"> <li>Embryon au stade normal de développement au jour de récolte. Aspect sphérique, symétrique.</li> <li>Blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact.</li> </ul>  <p style="text-align: center;">(Photos personnelle)</p>
2	Bon	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semblable à l'embryon de classe 1 mais asymétrique, peut contenir des blastomères détachés de la morula compacte</li> <li>Peut être légèrement en retard de développement par rapport aux autres embryons de la même récolte.</li> </ul>  <p style="text-align: center;">(Photos personnelle)</p>
3	Moyen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours.</li> <li>Blastomères sphériques de taille différente au stade morula.</li> <li>Présence de vésicules dans les cellules, aspect plus claire ou plus sombre que la normale</li> </ul>  <p style="text-align: center;">(Photos personnelle)</p>
4	Mauvais	<ul style="list-style-type: none"> <li>Embryon en retard de développement de plus de 2 jours.</li> <li>Limites cellulaires non distinctes.</li> </ul>  <p style="text-align: center;">(Photos personnelle)</p>

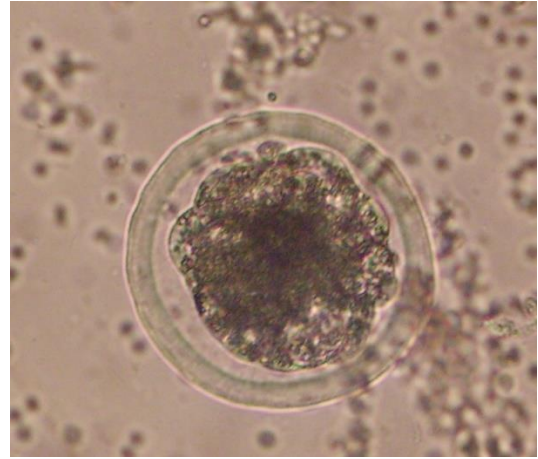
**ANNEXE 4 : NOTATION DU BCS SELON L'ASPECT EXTERNE**



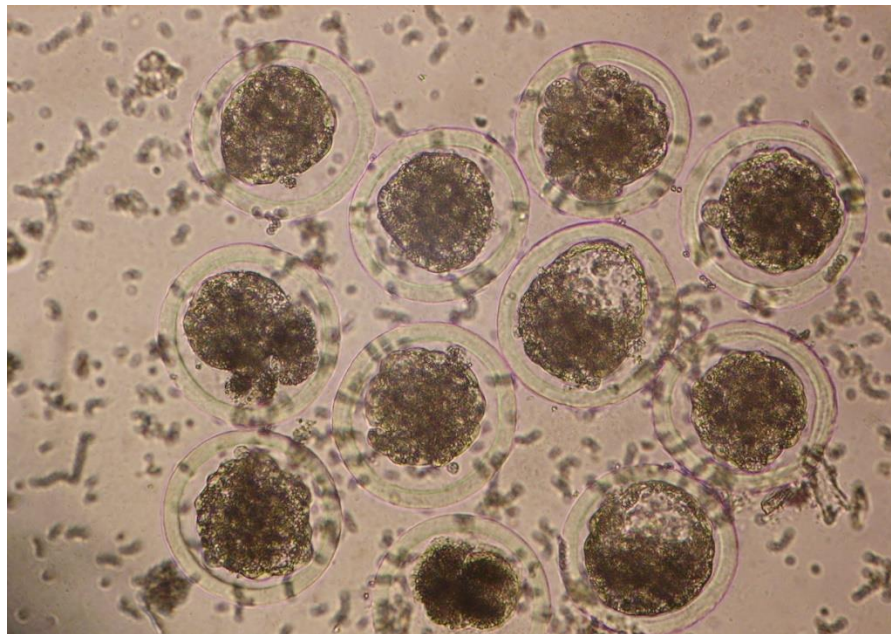
**ANNEXE 5 : PLUSIEURS EMBRYONS RECOLTES LORS DE  
L'EXPERIMENTATION (PHOTOS PERSONNELLES)**



Jeune blastocyste (classe 1)



Morula compacte (classe 1)



Embryons de différentes classes issus d'une même récolte