

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOC



841THV-1

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET

UNIVERSITE DE BLIDA1

INSTITUT SCIENCES VETERINAIRE



PROJET DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de docteur en Médecine Vétérinaire

THÈME :

**ETUDE DE LA RÉPONSE DES VACHES À UN
TRAITEMENT DE SUPEROVULATION À BASE
D'EXTRAITS HYPOPHYSAIRES**

Présenté par :

Mr: BOUDIF Omar.

Mr: BEN ZAHI Tarik.

Promoteur : ADEL DJallel, MAA, Université de Blida1.

Examineur : FERROUK Mustapha, MCB, Université de Blida1.

Président de jury : KAIDI Rachid, professeur, Université de Blida1.

PROMOTION : 2013 - 2014

REMERCIEMENTS

Un remerciement à notre DIEU qui par sa grâce, nous avons pu achever notre parcours et pour son aide à la réalisation de ce travail.

A Monsieur ADEL Djallel,

Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail, pour ses conseils pertinents, sa patience remarquable, sa disponibilité et son aide précieux qui a grandement facilité la réalisation de ce travail.

Veillez accepter l'expression de notre respectueuse gratitude

A Monsieur le professeur KAIDI Rachid

*Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir accepter la présidence de notre jury de mémoire
Remerciements et hommage respectueux*

A Monsieur FERROUK Mustapha

*Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir accepter d'examiner notre mémoire et de siéger à
notre jury de mémoire
Remerciements et hommage respectueux*

Aux travailleurs de la station expérimentale de l'institut vétérinaire de l'université Blida 1,

Pour leur accueil, leur patience, leur aide, leurs conseils et encouragements continus.

*Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont encouragé tout au long de notre
parcours et ceux qui ont contribué à notre formation.*

Dédicace

Je dédie mon travail à :

A mes chers parents,

**Les plus chers dans ma vie, eux qui ont souffert sans se plaindre à
m'élever, afin que j'atteigne ce niveau, eux qui m'ont soutenu
dans ma joie, dans ma tristesse, dans ma fatigue et
dans mes moments de faiblesse.**

**A mes sœurs et frères: Mohammed, Naïma, Farida, Tassadit,
Razika, Toufik, et Nadjat, surtout notre aînée Aziza.**

**Ainsi mes adorables Nièces et Neveux: Sandra, Islam, Anaïs,
Emylia, Imane, Ikrame, Ryad et Elyne.**

**A mon Grand-père Mohammed, et ma Grand-mère Fatima,
notre symbole de la grande famille.**

A tous mes amis (es) de la promotion étudiants vétérinaire 2014.

A mon binôme Tarik ainsi sa famille.

Omar

Dédicace

Avec un très grand amour et beaucoup de respect, je dédie
ce modeste travail :

A la femme qui a tellement sacrifié pour
moi, et qui mérite toute mes reconnaissances

à ma très chère mère « Yamina » que dieu la protège.

A celui qui m'a donné tout sans recule, à mon cher père

« Abdelkader » que dieu m'aide à lui rendre
qui son dû et que dieu le protège

A mes sœurs « Souad » et « Sihem »,
et à toute ma grande famille

A ma chère Kahina et sa famille « Diana »

A mes deux amis Nassim et Idir

Aux Dr. Ali, Abdelkrim et Makhlouf.

A mes collègues étudiants de ma promotion 2014.

A mon binôme Omar qui m'a donnée
le courage durant mon cursus.

A tous mes amis et à toutes les personnes qui m'aiment.

Jarikh

Résumé :

Notre travail consiste d'étudier la réponse des bovins à un traitement de superovulation réalisé sur une vache laitière de race Holstein âgée de 05 ans, et une génisse de même race âgée de 03 ans, au niveau de l'étable de la station expérimentale de l'université de BLIDA1. Le traitement de superovulation est à base des extraits hypophysaires porcins (Stimufol : FSH/LH 20%), par 08 injections à 12h d'intervalle et une double insémination le 5^{ème} jour et une récolte est réalisée après 7jours, par la voie cervicale. La réaction des vaches était satisfaisante, avec des chaleurs de superovulation en moyenne 60heures après injection de PGF2 α , un nombre moyen de 15,66 corps jaunes par vache, et aucun embryon transférable.

Mots clés : bovins, superovulation, FSH/LH 20%, chaleurs, corps jaune, embryons.

Abstract

Our work is to study the reaction of bovin a treatment of superovulation with a Holstein cow aged 05 years and a heifer of 03years old of the same breed, at the stable of the Experimental Station of the University of BLIDA1. The superovulation treatment is based on pig pituitary extracts (Stimufol: FSH/LH 20%), with 08 injection espaced by 12h, and a harvesting is carried out by the transcervical method. The reaction of cows was satisfactory, with the heat of superovulation at approximately 60 hours after injection of PGF2a, with an average of 15.66 corpus luteum per cow, and no transferable embryo.

Key word: bovin, superovulation, FSH/LH 20%, estrus, corpus luteum, embryo

ملخص

عملنا يتعلق بفرط الاباضة عند بقرة من سلالة هولشتاين عمرها 05 سنوات وعجلة من نفس السلالة عمرها 03 سنوات, علي مستوى المحطة التجريبية بجامعة البلدية 1 في الفترة الممتدة من نوفمبر 2013 إلى ماي 2014

علاج إفراط الاباضة على أساس مقطفات الغدة النخامية الخنازير (Stimufol:FSH/LH%20), وتم الحصاد عن طريق عنق الرحم. كانت ردة فعل الأبقار غير مرضية, مع سخانة إفراط المبيض بعد حقن PGF2a بمعدل 60 ساعة بعد الحقن, و معدل 15,66 جسم اصفر للبقرة, و ليس هناك جنين للتحويل

الكلمات الرئيسية: بقر, إفراط الاباضة, FSH/LH 20%, سخاته, جسم اصفر, جنين.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUME

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION..... 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

I. 1 : Ovogénèse.....	2
I. 1. 1 : Multiplication.....	2
I. 1. 2 : Accroissement.....	2
I. 2 : Folliculogénèse.....	2
I. 2. 1 : Phase foetale.....	2
I. 2. 1 : Phase pré-pubertaire.....	2
I. 2. 2 : Phase adulte.....	2
I. 3 : Notion de vagues folliculaires	3
I. 3. 1 : Recrutement	3
I. 3. 2 : Sélection.....	3
I. 3. 3 : Dominance.....	3
I. 4 : Atrésie folliculaire	4
I. 5 : Ovulation	4
I. 6 : Phase lutéale	4
I. 6. 1 : Métoestrus.....	5

I. 6. 2 : Di-œstrus.....	5
I. 7 : Régulation neuro-hormonale	5
I. 7. 1 : FSH et LH.....	5
I. 7. 2 : Progestérone.....	6
I. 7. 3 : Prostaglandines.....	6

CHAPITRE II : SUPEROVULATION

II. 1 : Définition	7
II. 2 : Choix de la donneuse	7
II. 2. 1 : Critères zootechniques.....	7
II. 2. 2 : Age.....	7
II. 2. 3 : Etat sanitaire.....	7
II. 3 : Hormones utilisées.....	8
II. 4 : Traitement de la superovulation.....	8

CHAPITRE III : RECOLTE DES EMBRYONS

III. 1 : Récolte.....	10
III. 2 : Examen des embryons.....	10
III. 3 : Facteurs de variations des résultats de récolte des embryons.....	12
III. 3. 1 : Influence de la donneuse des embryons.....	12
III. 3. 1. 1 : Facteurs génétiques	12
III. 3. 1. 1. 1 : Race.....	12
III. 3. 1. 2 : Facteurs physiologiques	12
III. 3. 1. 2. 1 : Age et la parité.....	12
III. 3. 1. 2. 2 : Lactation et le niveau de production laitière	13
III. 3. 1. 2. 3 : Intervalle vêlage-vêlage.....	13

III. 3. 1. 3 : Facteurs sanitaires	14
III. 3. 1. 3. 1 : Infertilité et production d'embryons.....	14
III. 3. 1. 3. 2 : Influence d'une infection par le virus BVD.....	14
III. 3. 2 : Influence du mâle	14
III. 3. 2. 1 : Effet direct du taureau.....	14
III. 3. 2. 2 : Effet du protocole d'insémination.....	15
III. 3. 3 : Influence du traitement	15
III. 3. 3. 1 : Hormones utilisées	15
III. 3. 3. 1. 1 : Choix de l'hormone de la superovulation.....	15
III. 3. 3. 1. 2 : Association PMSG/anti-PMSG.....	16
III. 3. 3. 2 : Protocole	16
III. 3. 3. 2. 1 : Rythme d'injection	16
III. 3. 3. 2. 2 : Site d'injection.....	17
III. 3. 3. 2. 3 : Cycle naturel ou maîtrisé.....	18
III. 3. 3. 2. 4 : Influence de la répétition des traitements.....	18
III. 3. 3. 2. 5 : Influence du jour du cycle auquel débute le traitement.....	19

PARTIE EXPERIMENTALE

I.INTRODUCTION.....	20
II.OBJECTIF.....	20
III.MATERIEL	21
III. 1 : Lieu, durée.....	21
III. 2 : Animaux utilisés.....	21
III. 3 : Matériel de contention.....	22
III. 4 : Matériel du traitement.....	22

III. 5 : Matériel de l'insémination artificielle..... 23

III. 6 : Matériel de la récolte..... 24

III. 7 : Matériel de la recherche des embryons..... 25

IV.METHODES

IV. 1 : Suivi des chaleurs..... 26

IV. 2 : Traitement de superovulation, d'insémination artificielle, et de la récolte..... 26

IV. 3 : Récolte..... 26

V.RESULTATS 27

VI.DISCUSSION 31

CONCLUSION..... 32

RECOMMANDATIONS..... 33

ANNEXE

Liste des Figures :

Figure N°01 : Régulation hormonale du cycle chez la vache.....	6
Figure N°02 : Schéma de traitement de la superovulation par FSH-p (en phase lutéale d'un cycle naturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes).....	9
Figure N°03 : Etable de la station expérimentale de l'université Blida1.....	21
Figure N°04 : Matériel de contention.....	22
Figure N°05 : Matériel de traitement.....	23
Figure N°06 : Matériel d'insémination artificielle.....	24
Figure N°07 : Matériel de récolte des embryons.....	25
Figure N°08 : Matériel de la recherche des embryons.....	25
Figure N°09 : Schéma de traitement de la superovulation.....	26
Figure N°10 : Ovocytes non fécondés sous un microscope inversé.....	30

Liste des Tableaux

Tableau N°01 : Classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCCLA 1990)	11
Tableau N°02 : Protocole de la superovulation.....	26
Tableau N°03 : Résultats du suivi des chaleurs.....	28
Tableau N°04 : Résultats de des chaleurs de la superovulation.....	28
Tableau N°05 : Résultats de la superovulation.....	29
Tableau N°06 : Résultats de la récolte embryonnaire.....	29
Tableau N°07 : Résultats du classement des embryons.....	30

Liste des Abréviations

- %** : pour cent.
- µg**: microgramme.
- ADN** : acide désoxyribonucléique.
- ATB**: antibiotique.
- BVD** : Bovin Virus Diarrhée.
- cc** : centimètre cube.
- CJ** : Corps Jaune.
- CNIAAG** : Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique.
- E2**: œstrogène.
- eCG**: equine ChorioncGonadotrophine.
- FSH**: Follicle Stimulating Hormone.
- FSH-p**: Follicle Stimulating Hormoneporcs.
- GnRH**: Gonadotropine Releasing Hormone.
- H**: Heure.
- IA**: inséminationartificielle.
- IETS**: International Embryo Transfer Society.
- IGF-1**: Insulin-like Growth Factor 1.
- IM**: intra-musculaire.
- J**: jours.
- LH**: luteinising hormone.
- ml**: millilitre.
- mm**: millimètre.
- n**: nombre.
- ND**: Non Déposé.
- OMI**: Oocyste Meiosis Inhibitor.
- PBS**: Phosphate buffered saline.
- PGF2α**: Prostaglandine F2 alpha.
- PMSG**: Pregnant Mare Serum Gonadotropine.
- S/C**: sous/cutané.
- MI** : microscope inversé.

Introduction générale :

La reproduction est une fonction de luxe constituant un facteur limitant des performances du troupeau, Il est alors nécessaire de maîtriser la reproduction à la fois chez le mâle et chez la femelle, pour fournir le plus grand nombre d'animaux de la qualité voulue au meilleur moment et au moindre coût.

Le développement de la biotechnologie lié à la reproduction chez les bovins a favorisé la mise au point des technologies d'induction, de synchronisation de l'œstrus, d'insémination artificielle, du transfert embryonnaires, sexage, fécondation in vitro. Le progrès de connaissance sur la physiologie de reproduction a permis l'apparition d'une quatrième génération visant à modifier encore plus en avant les caractéristique de l'embryons c'est la transgénèse et le clonage.

Le premier essai couronné de succès de prélèvement d'un embryon suivi de son transfert dans une lapine fut réalisé par **Heape en 1891**. C'est en 1951 que Naquit à l'USA le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse (**Willet et al. 1951**). Le premier veau né après transfert d'un embryon congelé puis décongelé Naquit en 1973 (**Wilmatt et Rowson 1973**), il portait le nom de Frosty II. En Algérie, le premier veau issu de transfert d'embryons est né en 2004 à l'université de Blida d'une collaboration entre le laboratoire de biotechnologie des la reproduction (LBRA), la faculté de médecine vétérinaire de Liège (Belgique) et le CNIAAG (.

Dans ce contexte la réalisation d'une étude de réaction des vaches améliorées à un traitement de superovulation, notre étude a pour objectif de maîtriser les différentes étapes de la production d'embryons dans l'espèce bovine. En utilisant des extraits hypophysaires dans un protocole classique de superovulation.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

CHAPITRE I : NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

I.1 L'ovogenèse

Ensemble de multiplications et de différenciations des : gonocytes dans l'ovaire fœtal.

I.1.1 La multiplication

Les gonocytes subissent des mitoses donnent naissance aux ovogonies, multiplication limitée dans le temps. Détermine le nombre maximum de gamètes femelle définitivement fixées (400 000 chez la vache, 160 000 chez la brebis, 1 000 000 chez la femme).

I.1.2 L'accroissement

Les ovogonies deviennent ovocyte I par accumulation de réserves cytoplasmiques

- Accroissement de leurs tailles; entrent en méiose
- S'arrêtent au stade : diplotène de prophase de la 1ère division (cellule à 2n chromosome)
- Ce blocage se fait grâce au polypeptide OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor).
- Chaque ovocyte s'entoure de cellules folliculeuses formant un follicule primordial.

I.2 La folliculogenèse

Ensemble des phénomènes qui assurent la croissance et la maturation des follicules cela en trois phases :

I.2.1 La phase fœtale

Les cellules germinales migrent vers les ébauches ovariennes, puis elles se multiplient entre les 60^{ème} - 170^{ème} jours de gestation (Wandji et al. 1992).

I.2.2 La phase pré-pubertaire

Le stock d'ovogonies pendant cette phase est d'environ 250 000 dans l'espèce bovine.

I.2.3 La phase adulte

Durant cette phase on a un démarrage de la vie reproductrice de la vache ceci par un développement folliculaires accru, scindé en 2 :

- Phase de croissance.
- Phase de maturation.

CHAPITRE I : NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

I.3 Notion de vagues folliculaires

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. Au bout de plusieurs mois, certains atteignent le stade de follicule tertiaire. Trois phénomènes vont ensuite se succéder : recrutement, sélection et dominance (Mialot et Chastant, 2000).

I.3.1 Le recrutement

Est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonadodépendants (diamètre : 2 mm). Ces follicules ont dépassé le stade où habituellement la plupart des follicules deviennent atrétisiques. Le recrutement est un phénomène aléatoire, provoqué par l'augmentation transitoire du taux circulant de FSH (Follicle Stimulating Hormone), (Drion et al, 1996).

I.3.2 La sélection

Est ensuite l'émergence du (ou des) follicule(s) ovulatoire(s) parmi les follicules recrutés. Cette sélection est secondaire à la réduction de FSH qui a initié le recrutement. En effet, le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'oestradiol, mais également d'inhibine qui par rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, diminue la production de FSH. A l'exception du (ou des) follicule(s) sélectionné(s) capable(s) de se développer en présence de faible taux de FSH, les autres follicules recrutés entrent en atrésie (Drion et al, 1996).

I.3.3 La dominance

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 du (ou des) follicule(s) ovulatoire(s).

Bien que la FSH diminue, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne (l'oestradiol qu'il produit amplifie sa synthèse d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) qui stimule sa synthèse d'oestradiol). La suite de l'évolution du follicule dominant dépend de l'évolution de la progestéronémie. Si la progestéronémie diminue, c'est à dire s'il y a

CHAPITRE I : NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

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 (Drion et al, 1996).

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 ou 3 vagues. Chaque vague comporte un follicule dominant. Si 3 vagues sont observées, elles débutent en général aux 2ème, 9ème et 16ème jours du cycle. Si 2 vagues sont observées, elles apparaissent aux 2ème et 11ème jours du cycle (Drion et al, 1996). Ceci explique la variation de la longueur des cycles parfois observée.

I.4 L'atrésie folliculaire

99,9 % des follicules n'atteignent jamais le stade ovulatoire, ils dégèrent à un stade quelconque de leur développement. L'ovocyte et les cellules de la granulosa entrent en apoptose par perte de l'activité de l'aromatase, et apparition de grains de pycnoses par fragmentation de l'ADN des cellules, et découplage des récepteurs aux hormones gonadotropes, et la disparition des enzymes thécales de la stéroïdogénèse.

I. 5 L'ovulation : elle comporte les étapes suivantes :

- Augmentation du volume de l'antrum.
- Dissociation des faisceaux de collagène de la thèque externe (apex).
- Détachement des cellules de la granulosa.
- Rupture de la lame basale.
- Désintégration de l'apex du follicule.
- Contraction du follicule.
- Expulsion de l'ovocyte.

I.6 La phase lutéale

Elle comporte deux phases :

CHAPITRE I : NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

I.6.1 Le metoestrus

- Période très courte pendant laquelle le corps jaune hémorragique est présent (follicule mature rupturé).
- Peu de LH et de FSH.
- Peu de progestérone.

I.6.2 Le dioestrus

- Période où le corps jaune hémorragique s'est lutéinisé pour devenir le corps jaune.
- Peu de LH et de FSH.
- De plus en plus le taux progestérone augmente.

Si la femelle est non gestante : le corps jaune se prolonge pour une durée variable selon l'espèce puis régressera (lutéolyse par une hormone appelée $\text{PGF2}\alpha$) pour devenir le corps blanc, un nouveau cycle œstral débutera peu après.

Si la femelle est gestante : le corps jaune sera conservé afin de maintenir la gestation. Le taux augmenté de progestérone empêche le développement de nouveaux follicules.

I.7 La régulation neuro-hormonale du cycle œstral

I.7.1 FSH et LH

Dans la régulation du cycle ovarien, l'hypothalamus reçoit des informations du cortex et des ovaires et, par l'intermédiaire de la gonadolibérine (GnRH), induit la libération hypophysaire de FSH qui provoque la croissance d'un ou de plusieurs follicules sur les ovaires. L'émergence d'une vague de croissance folliculaire est précédée d'un pic de FSH.

Ces follicules produisent des œstrogènes à l'origine des modifications rencontrées lors des chaleurs. L'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse antérieure, ce qui va provoquer une baisse de la sécrétion de FSH (diminution qui provient également de l'inhibine sécrétée par le follicule). Seul va pouvoir continuer à se développer le follicule dominant car il a mis en place des stratégies pour se développer avec peu de FSH. L'œstradiol exerce également une rétroaction sur l'hypothalamus, en augmentant la fréquence des pulses de GnRH. Cette poussée de GnRH va créer un pic de LH qui déclenche l'ovulation.

CHAPITRE I : NOTIONS SUR LA REPRODUCTION

I.7.2 La progestérone

Elle est sécrétée par le corps jaune, elle exerce un rétrocontrôle négatif tant sur l'hypothalamus que sur l'hypophyse, ce qui entraîne une diminution du taux de LH interdisant ainsi l'ovulation. SAUVEROCHE, WAGNER, 1993.

I.7.3 Les prostaglandines :

Elles sont sécrétées au niveau de l'appareil génital femelle et retrouvées au niveau de l'ovaire et de la paroi utérine, la PGF2alpha est synthétisée par l'utérus à la fin de la phase lutéale et passe par l'artère utérine qui a des rapports étroits avec l'artère ovarienne.

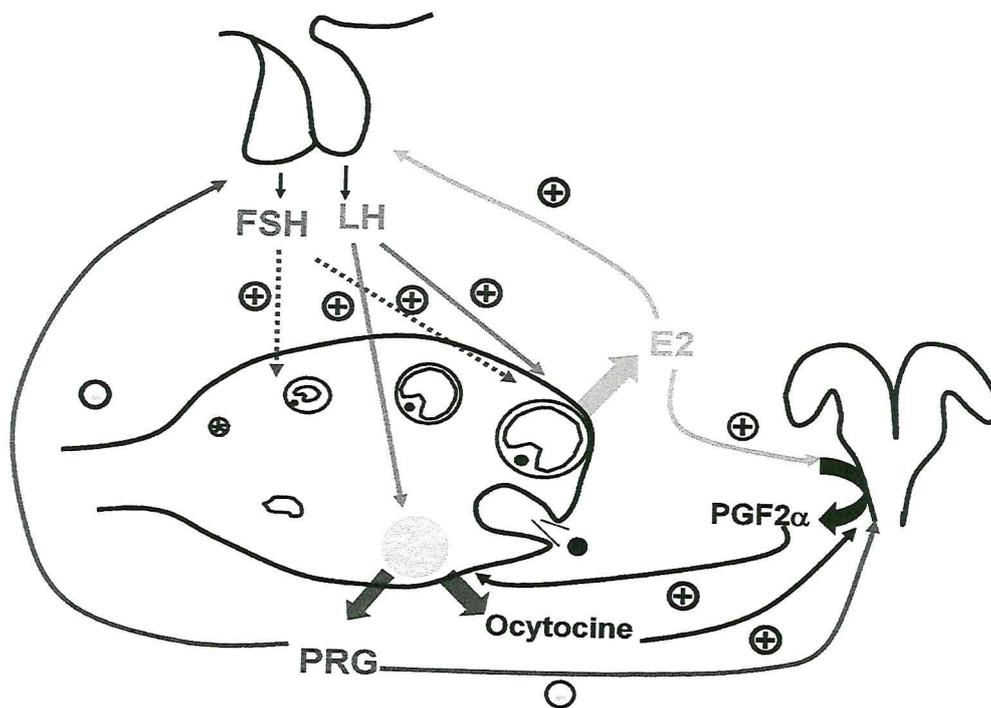


Figure N°01 : la régulation hormonale du cycle chez la vache.

Chapitre II
LA SUPEROVULATION

CHAPITRE II : LA SUPEROVULATION

II. 1 Définition

Le transfert embryonnaire est une méthode de reproduction artificielle qui consiste à prélever, après fécondation, le ou les embryons dans l'appareil génital d'une femelle dite donneuse, pour le ou les transplanter dans l'appareil génital d'une ou plusieurs femelles, dites receveuses, dans lequel le ou les embryons vont se développer jusqu'à la naissance.

II. 2 Choix de la donneuse

Le choix de la donneuse conditionne beaucoup la réussite du transfert embryonnaire. Outre les potentialités zootechniques, la future donneuse devra être en parfaite santé.

II. 2. 1 Critère zootechnique

L'intérêt fondamental du transfert d'embryons est d'ordre génétique. L'amélioration génétique se concrétise par la sélection des sujets dont la performance tant pour le type que pour la production est considérée comme supérieure. En plus, la donneuse devra être susceptible de transmettre ses caractères à ses descendants.

II. 2. 2 L'âge

LAMOTHE, 1987 signale que plus la donneuse avance en âge, plus la réponse à la superovulation est erratique et il conseille une tranche d'âge entre 5 et 10 ans. Le même auteur remarque que du fait de l'apport d'hormones exogènes, la donneuse de plus de 10 ans présente des manifestations secondaires à la superovulation, notamment des infections: mammites, arthrites pour l'essentiel.

II. 2. 3 L'état sanitaire

L'état sanitaire de la donneuse conditionne certainement en grande partie non seulement le nombre d'embryons récupérés, mais aussi la qualité des embryons. Ainsi le pourcentage d'embryons viables passe de 81% pour 15 donneuses en bon état général et sans problème de reproduction, à 37% pour 27 donneuses réformées pour des motifs de subfertilité et/ou dont l'état général était très médiocre.

Sur le plan général, la donneuse devra être indemne de toute maladie susceptible d'être transmise à l'embryon il s'agit essentiellement de la tuberculose et surtout de la brucellose. Il est évident que la liste de ces maladies est variable d'une région à l'autre compte tenu de l'épidémiologie même des maladies. (NIBART et al, 1991).

CHAPITRE II : LA SUPEROVULATION

La donneuse est donc une vache qui n'est ni trop jeune, ni trop âgée, avec un bon état général et un appareil génital en parfait état de santé; et ses performances sont susceptibles d'intérêt.

II. 3 Les Hormones utilisées

Deux groupes d'hormones gonadotropes sont essentiellement utilisées :

- les gonadotropines hypophysaires dont l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) ;
- la gonadotropine sérique de jument gravide(PMSG).

La PMSG (Pregnant Mare SerumGonadotropine) de nature glycoprotéique est sécrétée au niveau des cupules endométriales et extraite du sérum de jument gravide notamment entre 40 et 150 Jours de gestation. Elle présente une double activité (FSH et LH) avec toutefois une activité FSH plus marquée. NIBART M. (1991).

La FSH (FollicleStimulating Hormone) est également de nature glycoprotéique, mais sécrétée par le lobe antérieur de l'hypophyse des mammifères et dont l'hypophyse de mouton et de porc constitue une source importante d'après les travaux de COURRIER et Coll. cités par DERIVAUX. Actuellement, la FSH provenant d'extraits purifiés d'hypophyse de porcs (FSH-P) est la plus utilisée. NIBART M. (1991).

II. 4 Le traitement de la superovulation :

La plupart du temps, la stimulation de l'ovaire débute en phase lutéale, entre le 8ème et le 12ème jour du cycle (J0=œstrus), ceci afin de se situer au moment du démarrage d'une vague de croissance folliculaire. L'utilisation d'implant de progestagènes permet de réaliser des superovulations sur des vaches sans avoir besoin de repérer les chaleurs de référence. Une « surcharge » est alors injectée le jour de la pose de l'implant. Cette surcharge est constituée de norgestomet et d'oestradiol.

Le traitement utilisé dans la quasi-totalité des superovulations est basé sur l'utilisation de FSH-p (FSH d'origine porcine) répartie en 8 injections en doses décroissantes à 12 heures d'intervalle. Une injection de cloprosténol (0,5 à 1 mg par voie intra-musculaire) est réalisée à la 5ème injection de FSH-p. L'utilisation de PMSG dans le cadre de la superovulation n'est qu'exceptionnelle en France et nécessitait l'utilisation d'anticorps anti-PMSG le jour de l'insémination, à cause de la longue demie-vie de la PMSG.

CHAPITRE II : LA SUPEROVULATION

En dépit des améliorations obtenues grâce à l'utilisation systématique de préparations de FSH purifiées (augmentation du nombre d'embryons produits et diminution de la variabilité des réponses) au lieu de PMSG, la variabilité de la réponse au traitement de superovulation reste le facteur le plus limitant des programmes de superovulation (Humblot et al, 1994).

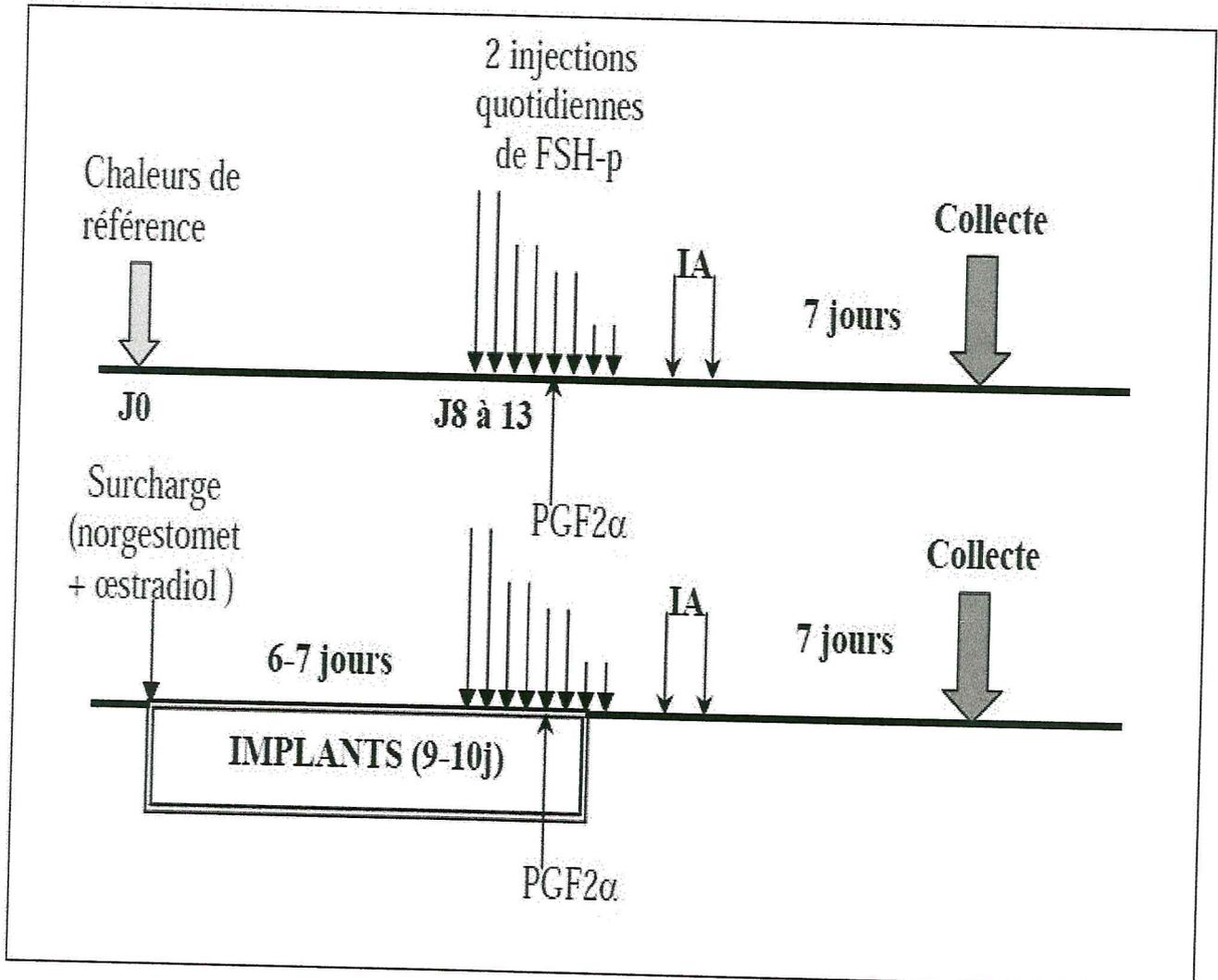


Figure N°02 : Schéma de traitement de superovulation par FSH-p (en phase lutéale d'un cycle naturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes). (Humblot et al, 1994).

Chapitre III

LA RECOLTE DES EMBRYONS

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

III. 1 La Récolte

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

Après nettoyage et désinfection de la vulve, une sonde est introduite dans l'utérus. Il existe des différentes sondes et ont chacune leurs partisans, selon l'habitude de l'opérateur (sonde de Han ou sonde IMV). On utilise une chemise sanitaire sur la sonde avant son entrée dans le col de l'utérus. Un ballonnet gonflable permet de fixer la sonde dans la corne utérine et d'éviter le reflux du liquide utilisé pour la récolte dans le vagin. Les cornes utérines sont ensuite rincées à l'aide de tampon phosphate PBS. Une anesthésie épidurale basse est parfois réalisée afin de limiter les mouvements de l'animal lors de la manipulation des cornes et pour assurer la sécurité du personnel de collecte (Mapletoft et al, 1998).

III. 2 Examen des embryons

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

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons sont exclusivement morphologiques. A J6, l'embryon est au stade morula compactée, à J7 au stade blastocyste. La sortie de la zone pellucide se fait à J9. Les ovulations n'étant pas toutes synchrones, plusieurs stades embryonnaires peuvent être observés au cours d'une même récolte. L'observation de l'intégrité de la zone pellucide, la taille et l'homogénéité de la masse cellulaire incluse dans celle-ci, la formation du blastocœle, du bouton embryonnaire et du trophoblaste permet de juger de la viabilité de l'embryon. Tous ces critères figurent dans la blastographie publiée par l'INRA-UNCEIA (1990).

Certaines équipes rajoutent une classe 5 qui correspond aux ovocytes non fécondés.

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

Classification	Qualité	Description
1	Excellent	<ul style="list-style-type: none"> - Embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable. - Blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact.
	Bon	<ul style="list-style-type: none"> - Embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, - ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique, - ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace périvitellin.
2	Moyen	<ul style="list-style-type: none"> - Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomères sphériques au stade morula) ou des défauts bien précis comme : - nombreuses cellules échappées dans l'espace périvitellin, des vésicules, des cellules dégénérées, blastomères de taille variable. - Aspect plus clair ou plus sombre que normal
3	Médiocre	<ul style="list-style-type: none"> - Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes, des vésicules grosses et nombreuses ; - Mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable.
4	Mort ou dégénéré	<ul style="list-style-type: none"> - Arrêt de développement à un stade précoce. - Cellules dégénérées.

Tableau N°01 : Classification des embryons selon leur qualité (INRA-UNCEIA, 1990)

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

III. 3 : LES FACTEURS DE VARIATIONS DES RESULTATS DE RECOLTE DES EMBRYONS.

III. 3. 1 : Influence de la donneuse des embryons

III. 3. 1. 1 : Facteurs génétiques

III.3. 1. 1. 1 : La race

Dans une étude rétrospective portant sur 1596 collectes, **DONALDSON (1984a)** a obtenu des écarts considérables entre les races : le nombre total d'embryons collectés varie significativement entre 6,0 et 16,2 selon la race, le nombre d'embryons transférables de 2,8 à 6,6, le pourcentage d'embryons transférables de 35% à 68% et le taux de gestation par collecte de 37% à 75%.

A plusieurs reprises, la race Simmental apparaît en tête du classement pour le nombre moyen d'embryons transférables par collecte : 6,6 } 6,3 pour **DONALDSON (1984a)**, 7,4 pour **BREUEL et al (1991)**. Deux hypothèses sont avancées par **BREUEL et al (1991)** pour expliquer la supériorité de cette race : le taux de naissances gémellaires (entre 5 et 10 %) y serait plus élevé que dans les autres races à viande (environ 0,4 %) d'où une éventuelle prédisposition de cette race à la superovulation ; la seconde hypothèse est une plus grande sensibilité de cette race aux gonadotrophines et donc aux traitements de superovulation.

D'une façon plus générale, il semblerait que les races à viande répondent mieux aux traitements de superovulation que les races laitières : **SHARPIN et al (2000)**, dans une étude portant sur 269 collectes, ont obtenu plus d'embryons transférables chez les vaches à viande par rapport aux vaches laitières (respectivement 6,9 *versus* 5,3 ; $p < 0,05$).

III. 3. 1. 2 Facteurs physiologiques

III. 3. 1. 2. 1 L'âge et la parité

Les différentes études relatives à l'effet de l'âge de la donneuse sur la production d'embryons mettent en évidence deux tendances d'intérêt majeur. Tout d'abord, la production d'embryons est supérieure chez les vaches par rapport aux génisses (**HASLER et al, 1981, 1983 ; DETTERER et al, 1997 ; MENARD et MARTINEZ, 1997**). Les vaches produiraient en moyenne 1 à 2,5 embryons transférables de plus que les génisses. Cependant, après avoir atteint un pic pendant la 2ème lactation, le nombre d'embryons transférables par collecte diminue de façon significative ($p < 0,05$) lorsque la parité augmente. On observe donc une baisse du nombre d'embryons transférables par collecte à partir de la 3ème lactation (**GOVIGNON et al, 2000**). Pour **HASLER et al (1981)**, le nombre moyen d'embryons transférables par collecte diminue à partir de l'âge de 7 ans (soit à partir de la 5ème lactation).

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

Concernant l'effet de l'âge des génisses à la première collecte, d'après **NIBART, GUSTAFSSON et JANSEN (1992)**, ont montré que le pourcentage d'embryons viables est inférieur pour les génisses de moins de 16 mois à celui obtenu chez les génisses de plus de 16 mois (respectivement 39 % *versus* 78 %, $p < 0,001$) ; le pourcentage de femelles collectées après traitement est également inférieur pour les génisses de moins de 16 mois (respectivement 51 % *versus* 84 %, $p < 0,01$) ; les auteurs concluent que plutôt que l'âge lui-même, il semblerait que ce soit l'âge à la puberté en relation avec l'alimentation et le nombre de cycles sexuels avant la superovulation qui soient importants.

III. 3. 1. 2. 2 La lactation et le niveau de production laitière

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

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

III. 3. 1. 2. 3 L'intervalle vêlage – collecte

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

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

III. 3. 1. 3 Facteurs sanitaires

III. 3. 1. 3. 1 Infertilité et production d'embryons

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

III. 3. 1. 3. 2 Influence d'une infection par le virus BVD

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

III. 3. 2 INFLUENCE DU MALE

III. 3. 2. 1 Effet direct du taureau

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

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

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

III. 3. 2. 2 Effet du protocole d'insémination

Plusieurs protocoles d'insémination ont été comparés pour optimiser la production d'embryons.

Ils diffèrent selon :

- le nombre d'inséminations : 1 insémination *versus* 2 inséminations (**LACAZE et al, 1991 ; SLIMANE et al, 1995 ; HUPKA et al, 2000**),
- le moment des inséminations par rapport au début des chaleurs et par rapport au pic de Luteinizing Hormone (LH) (**SLIMANE et al, 1995**).
- le nombre de taureaux utilisés : 2 inséminations avec le même taureau *versus* 2 inséminations avec 2 taureaux différents (**HUPKA et al, 2000**).
- le type de semence : fraîche *versus* congelée (**GOULDING et al, 1994**).

SLIMANE et al (1995) ont ainsi montré que le nombre total d'embryons et le nombre d'embryons viables sont significativement supérieurs dans un protocole avec 2 inséminations par rapport à celui ne prévoyant qu'une seule insémination,

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la première insémination est pratiquée plus de 6 heures après le pic de LH.

III. 3. 3 INFLUENCE DU TRAITEMENT

III. 3. 3. 1 Les hormones utilisées

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

III. 3. 3. 1. 1 Choix de l'hormone de superovulation

De nombreuses études comparant l'efficacité de la PMSG à celle de la FSH ont été réalisées dans le passé. Dans un premier temps, les résultats obtenus avec la FSH étaient très encourageants mais pas toujours reproductibles. Cette variabilité dans les résultats peut s'expliquer par la diversité des protocoles de superovulation (dose administrée, rythme des injections) et par une grande variabilité du rapport FSH/LH des préparations commerciales.

Selon les études, l'utilisation de la FSH permet d'obtenir 1 à 2 embryons viables de plus que la PMSG (1 pour **MONNIAUX et al, 1983** ; 1,5 pour **NIBART 1991** ; 2 pour **GOULDING et al, 1991**). Outre un plus grand nombre d'embryons, la FSH présente d'autres avantages par rapport à la PMSG : le pourcentage de vaches sans réponse est plus faible (8% *versus* 21% d'après **NIBART, 1991**) et le pourcentage de vaches produisant plus de 3 embryons viables est plus élevé (50% *versus*

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

28%, $p < 0,05$ selon **MONNIAUX et al, 1983**). Ainsi, il est aujourd'hui généralement admis que l'efficacité de la FSH en terme de production d'embryons viables est supérieure à celle de la PMSG, même si la variabilité des réponses est toujours aussi importante.

La différence d'efficacité entre les deux gonadotrophines s'expliquerait, d'après **SAUMANDE (1995)**, par un effet sur la qualité des embryons, le nombre d'ovulations étant identique. Pour **BOLAND et al (1991)**, l'utilisation de la PMSG serait associée à un nombre élevé de follicules anovulatoires du fait de sa longue demi-vie.

III. 3. 3. 1. 2 Association PMSG/anti-PMSG

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

Cependant, les résultats concernant l'utilisation d'un sérum anti-PMSG, injecté par voie intraveineuse au moment des chaleurs, sont contradictoires. Pour **SAUMANDE et al (1984)**, quand un sérum anti-PMSG est injecté lors des chaleurs à des animaux stimulés par la PMSG, le nombre d'embryons viables obtenu est identique à celui obtenu avec de la FSH du commerce ; ce traitement présenterait deux avantages par rapport à la FSH : un coût moins élevé et une mise en œuvre plus simple (2 injections au lieu de 8). Cependant, ce point de vue n'est pas partagé par tous : aucun effet bénéfique de l'utilisation de l'anti-PMSG n'a été mis en évidence ni par **BOLAND et al (1991)** ni par **GOULDING et al (1996)**.

III. 3. 3. 2 Le protocole

III. 3. 3. 2. 1 Rythme d'injection

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

- 2 injections par voie Intramusculaire (IM), pendant 4 jours, fractionnement en doses égales ou décroissantes

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

DUFOUR et al (1990) n'ont pas observé de différence significative dans le nombre d'ovulations selon le fractionnement des doses en parties égales (9,4 ovulations ; n=6) ou inégales et décroissantes (8,6 ovulations ; n=18) sur 8 injections.

- 2 injections par voie IM et par jour pendant 4 jours versus 1 seule injection par voie Sous-cutanée (SC) de la même dose totale.

Pour **MAPLETOFT et al (1992)**, l'efficacité des deux protocoles est la même : dans une étude portant sur 48 génisses de race à viande, aucune différence significative dans le nombre d'embryons viables n'a été observée entre les deux protocoles.

Cependant, l'efficacité du protocole à une seule injection par voie SC est fonction de l'état d'engraissement des donneuses et du site d'injection (**BO et al, 1994**) : pour des vaches maigres (note d'état corporel égale à 1 ou 2), une seule injection par voie SC dans le cou est moins efficace qu'une seule injection par voie SC en arrière de l'épaule ou que 2 injections par voie IM et par jour pendant 4 jours. Pour des donneuses en bon état corporel (note d'état égale à 3 ou 4), l'efficacité des deux protocoles est comparable, quel que soit le site d'injection (dans le cou ou en arrière de l'épaule).

- 2 injections par jour pendant 4 ou 5 jours versus 1 injection par jour pendant 3 jours

LOONEY et al (1981) n'ont pas observé de différence significative en ce qui concerne le nombre d'ovocytes fécondés entre 2 injections par jour pendant 5 jours (3,1 ovocytes fécondés ; n=12) et 1 injection par jour pendant 3 jours (3,3 ovocytes fécondés ; n=12) ; pour ces deux traitements, la dose totale était la même : 50 mg de FSH porcine (Burns Biotec) Pour **DONALDSON (1990)**, 75 unités de FSH (SUPEROV ND) en une injection par jour pendant 3 jours (n = 58) ou en 2 injections par jour pendant 4 jours à doses égales (n = 373) produisent le même nombre moyen d'embryons transférables (respectivement 5,3 } 5,3 *versus* 5,5 } 5,5).

III. 3. 3. 2 Site d'injection

La réponse ovulatoire et le pourcentage de vaches présentant un œstrus ont été significativement plus élevés ($p < 0,05$) chez les vaches Holstein ayant reçu une dose de 400 mg de FSH porcine (Folltropine ND) diluée dans 20 ml de solution saline en une seule injection par voie SC derrière l'épaule (n = 17) par rapport à celles ayant reçu la même dose par voie SC dans la région du cou (n = 17) (**HOCKLEY et al, 1992**). Cependant, cette étude ne tient pas compte de l'état d'engraissement des vaches : en effet, nous avons vu précédemment que lorsque les vaches sont maigres, une injection de 400 mg de FSH porcine (Folltropine ND) par voie SC dans le cou est moins efficace que la même dose injectée par voie SC en arrière de l'épaule (**BO et al, 1994**).

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

III. 3. 3. 2. 3 Cycle naturel ou maîtrisé

Pour des raisons pratiques, les traitements de stimulation ovarienne sont parfois associés à un traitement de synchronisation des chaleurs à base de progestagènes, sous forme d'implants ou de spirales.

- Cas des donneuses cyclées :

L'intérêt de la combinaison d'un implant ou d'une spirale vaginale de progestagènes à un traitement de superovulation (par de la FSH ou de la PMSG) est la possibilité d'initier le traitement à n'importe quel moment du cycle ovarien et donc de s'affranchir d'une surveillance des chaleurs (ALMEIDA, 1987). Cependant, bien que cette combinaison présente un aspect pratique, elle ne permet pas toujours d'obtenir une production maximale d'embryons (ALBERIO et al, 1994). Globalement, le nombre total d'embryons collectés après un traitement associant une spirale de progestagènes à de la FSH est significativement inférieur à celui obtenu avec de la FSH seule ; aucun effet significatif n'est observé sur le nombre d'embryons transférables.

- Cas des femelles en anoestrus :

Pour DUFFY et al (1994), la combinaison progestagènes (spirale PRID ND) – FSH peut être utilisée avec succès chez des donneuses non vues en chaleurs avant le traitement de superovulation. Chez ces femelles (n = 23), le nombre d'embryons collectés, le nombre d'embryons de qualité 1 ou 2 et le nombre d'embryons de qualité 3 sont comparables à ceux obtenus sur un lot de femelles (n = 55) vues en chaleurs avant l'initiation du traitement de superovulation avec la FSH seule (respectivement 9,9 , 2,7 et 2,1 *versus* 11,0 , 2,9 et 1,9).

Ainsi, l'association d'un traitement de stimulation ovarienne à un traitement par des progestagènes (spirale ou implant) présente l'avantage de pouvoir être mise en oeuvre même en l'absence d'informations sur les cycles des animaux traités et, surtout, de diminuer la fréquence des non-réponses. On améliore donc la production totale d'embryons en diminuant la fréquence des animaux qui ne produisent aucun bon embryon (SAUMANDE, 1995).

III. 3. 3. 2. 4 Influence de la répétition des traitements

En général, la répétition des traitements se traduit par une diminution de la production d'embryons. L'augmentation du rang de collecte a pour effet une baisse significative ($p < 0,05$) du nombre d'embryons transférables (DE RUIGH et al, 1995 ; GOVIGNON et al, 2000 ; PONSART et al, 2001). HUPKA et al (2000) constatent une augmentation significative du nombre d'ovocytes non fécondés ($p = 0,0035$) et du nombre d'embryons dégénérés ($p = 0,004$). Par contre, pour GOVIGNON et al (2000), la répétition des collectes n'a pas d'effet sur le nombre d'embryons

CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

dégénérés et l'augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés n'est significative ($p < 0,05$) qu'à partir de la 4^{ème} collecte.

L'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer la diminution de la réponse ovarienne associée à la répétition des traitements est celle d'une auto-immunisation contre les hormones de stimulation ovarienne, PMSG et FSH (DONALDSON et PERRY, 1983 ; NIBART, 1991).

III. 3. 3. 2. 5 Influence du jour du cycle auquel débute le traitement

Le jour du cycle œstral auquel débute le traitement de superovulation est responsable de grandes variations dans les résultats de collecte d'embryons. LINDSELL et al (1986) ont obtenu de meilleurs résultats pour le nombre d'embryons collectés et une tendance pour le nombre d'embryons transférables en commençant le traitement à j9 ($n = 10$) par rapport à j3 ($n = 11$), j6 ($n = 11$) et j12 ($n = 10$). De façon similaire, GOULDING et al (1990) observent une réponse ovarienne significativement plus faible quand le traitement est commencé le deuxième jour du cycle par rapport au dixième jour du cycle.

PARTIE
EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Introduction

L'amélioration génétique et la reproduction bovine prennent une longue période, c'est pour cette raison que la technique de superovulation et de transfert embryonnaire a été pratiquée dans les programmes de sélection.

Chez la vache, la réponse au traitement de superovulation est très variable. Il est en effet possible d'obtenir de 0 à 50 embryons (KAFI, McGOWAN, 1997). Le taux d'embryons transférables après collecte dépasse rarement 60 %, et 10 à 20 % des donneuses ne répondent pas aux traitements de stimulation ovarienne (NIBART, 1991). Actuellement les chercheurs essaient de diminuer les doses de FSH/LH pour induire la superovulation chez les bovins.

II. Objectif

Notre objectif dans ce travail est de maîtriser les différentes étapes de la production d'embryons dans l'espèce bovine, en utilisant des extraits hypophysaires dans un protocole classique de superovulation.

PARTIE EXPERIMENTALE

III. Matériel :

III.1 : lieu et durée d'expérimentation :

L'étude a été effectuée au niveau de la ferme de la station expérimentale de l'université de Blida qui renferme 25 têtes bovines dont 15 vaches et génisses, et 05 taureaux et 05 tourillons. L'étude s'est étalée dans la période allant de novembre 2013 jusqu'à mai 2014. (Figure N°01)

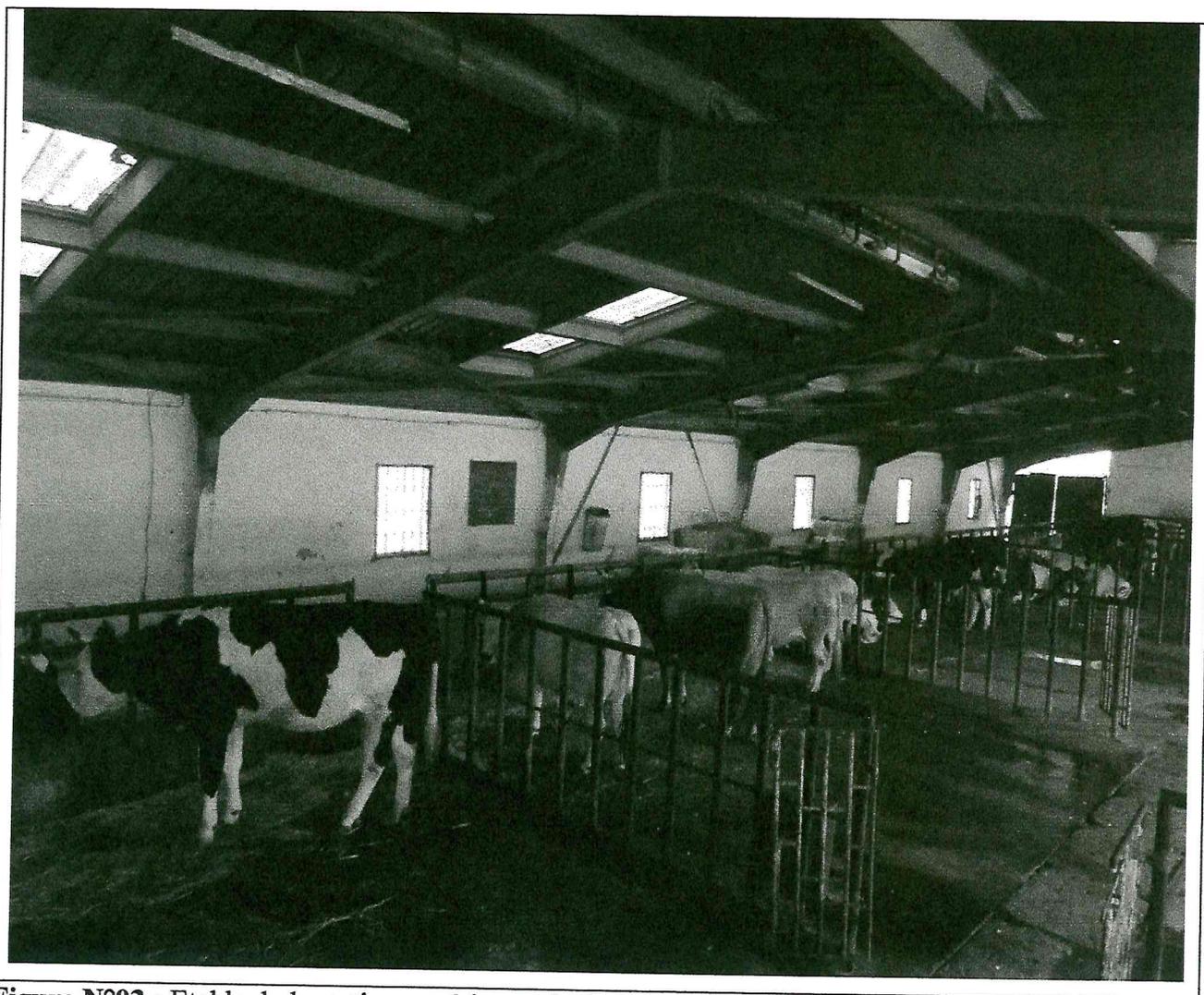


Figure N°03 : Etable de la station expérimentale de l'université de Blida 1.

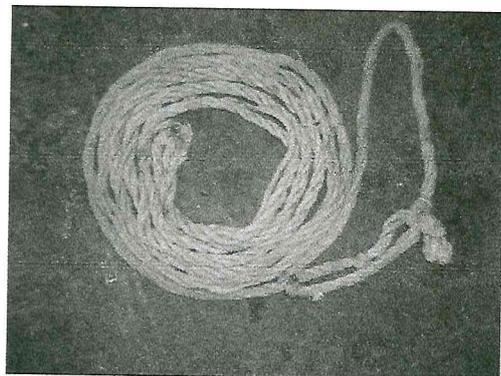
III.2 : animaux utilisés :

Les animaux utilisés sont : une génisse de race Holstein pie-noire âgée de 3 ans d'un état d'embonpoint de 3,5, et une vache de même race pie-rouge âgée de 5 ans d'un état d'embonpoint de 3. Les vaches ont été sélectionnées sur des critères zootechniques et sanitaires, et aucune lésion apparente sur le tractus génital avec une cyclicité régulière. Au cours de cette étude les vaches étaient en stabulation entravée sous un régime alimentaire composé de foin et de concentré.

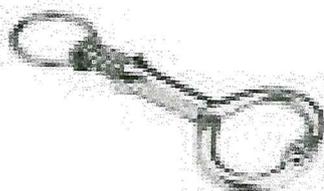
PARTIE EXPERIMENTALE

III.3 : Matériel de contention :

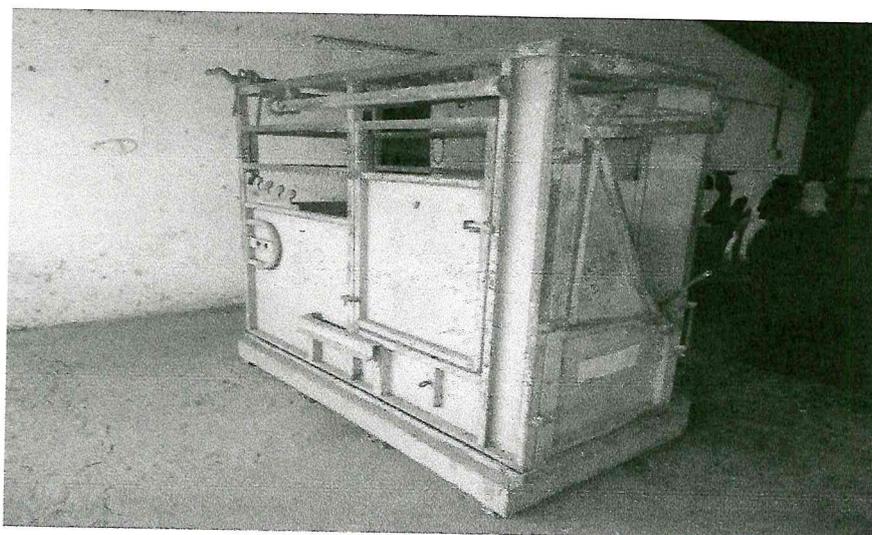
Une corde, une pince mouchette, et un travail de contention. (Figure N°04)



-A.



-B.



-C.

Figure N°04 : matériel de contention : A : une corde, B : une pince mouchette, C : Un Travail de contention.

III.4 : Matériel de traitement : qui comporte ;

Les aiguilles, les seringues. (Figure N°05)

Les hormones et les antibiotiques : qui sont ;

- STIMUFOL (lyophilisat injectable de follitropine et lutropineporcine) ; flacon de lyophilisat et flacon de 10ml de solvant,
 - 500 μ g porcine Follicle Stimulating Hormone (pFSH).
 - 100 μ g porcine Luteinizing Hormone (pLH).

PARTIE EXPERIMENTALE

- avec un rapport FSH/LH de 20%.
- prostaglandine : otiprostion 5mg (PROSTAVET).
- ATB antibiotique; ClamoxylLA; à 15g d'Amoxicilline, en flacon de 100ml.



-A.

-B.

-C.



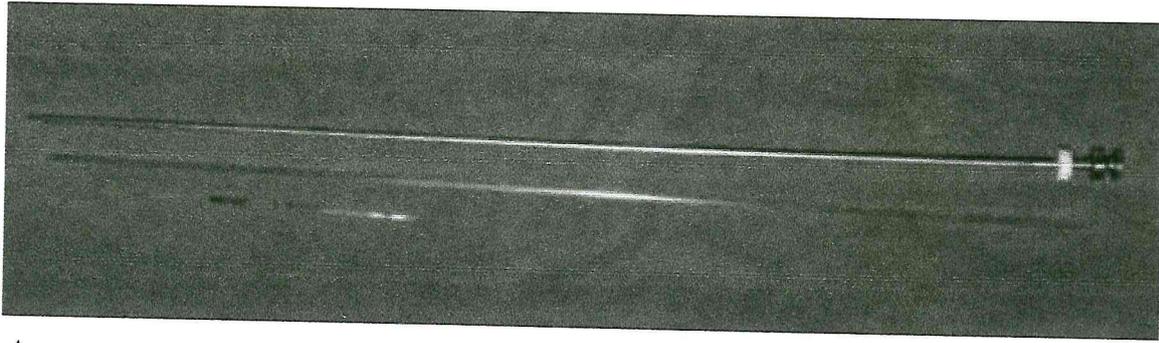
-D.

Figure N°05 : matériel de traitement. A : Prostaglandine, B : STIMUFOL, C : ATB, D : Seringues et Aiguilles.

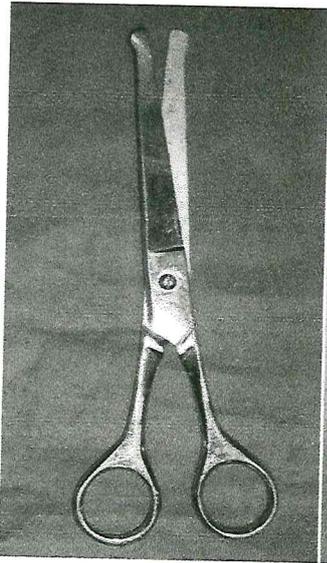
III.4 : Matériel d'insémination artificielle

Une gaine et une chemise sanitaire, paillettes d'insémination, un BT (ET-17), un pistolet d'insémination, des ciseaux, des gants polyéthylènes. (Figure N°06)

PARTIE EXPERIMENTALE



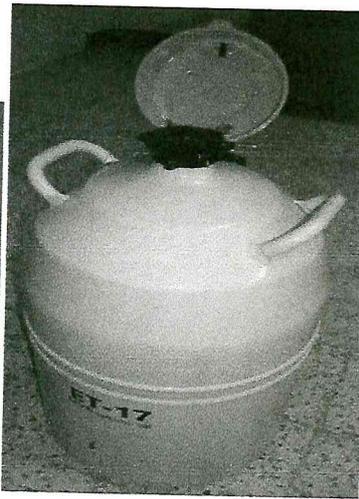
-A.



-B.



-C.

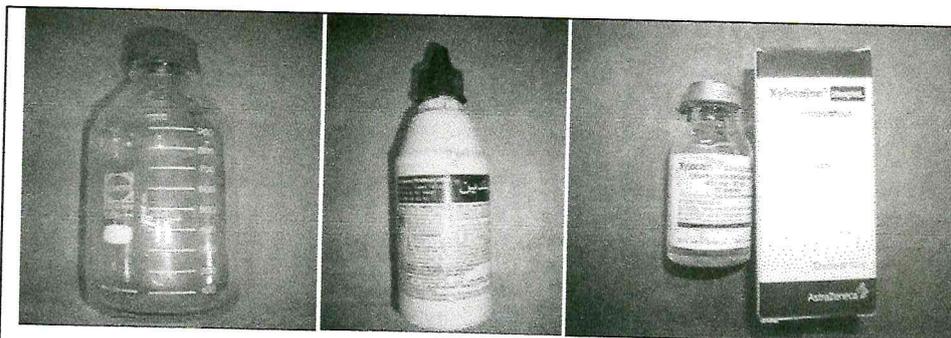


-D.

Figure N°06 : matériel d'insémination artificielle. A : Pistolet, Gaine, et Paillette, B : ciseaux, C : gants polyéthylènes, D : BT ET-17.

III.6 : Matériel de récolte

La Bétadine, la xylocaïne (Chlorhydrate de lidocaïne 400mg-20ml 20mg/ml), sonde de récolte à deux voies de type Foley, un mandrin métallique ; 02 flacons de 1 litre, 02 seringues de 50cc, milieu PBS (Phosphate buffered saline). (Figure N°07)

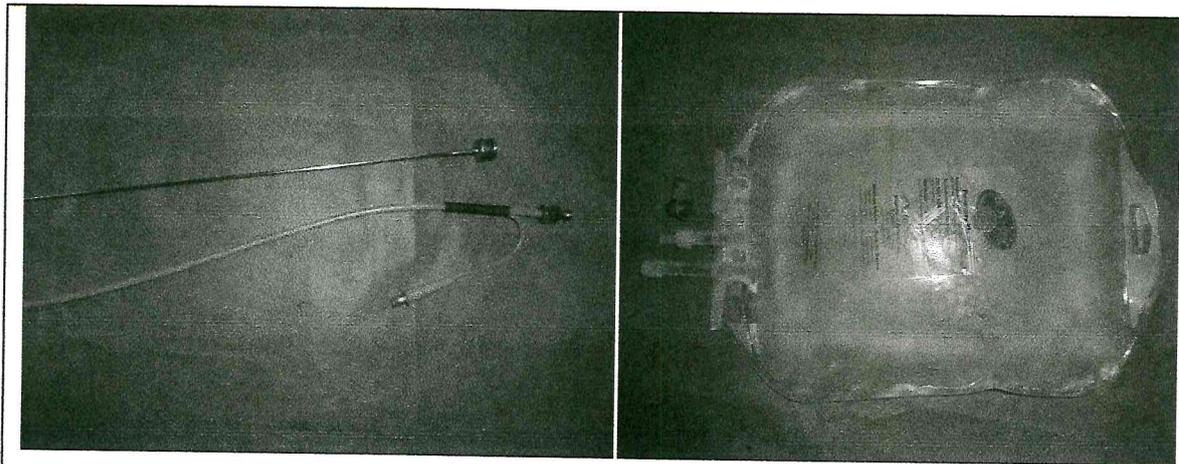


-A.

-B.

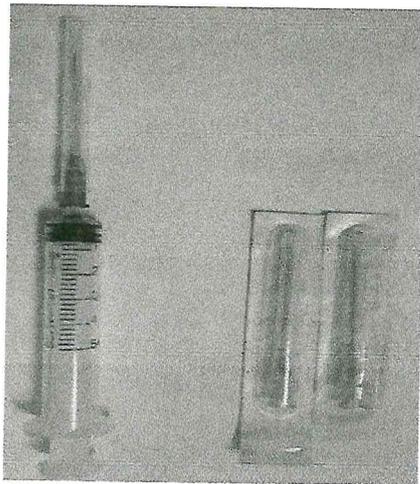
-C.

PARTIE EXPERIMENTALE



-D.

-E.

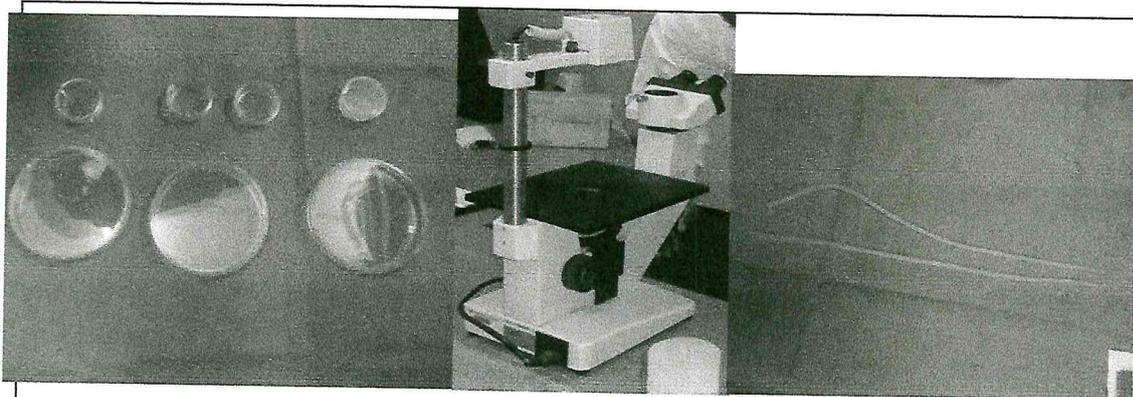


-F.

Figure n°07 : matériel de récolte. A : Flacon, B : Xylocaïne, C : Bétadine, D : sonde de récolte et mandrin métallique, E : milieu PBS, F : Seringues et Aiguilles.

III.7 : Matériel de recherche

Des boîtes de pétri quadrillées, une tubulure en plastique, un microscope optique inversé.
(Figure N°08)



-A

-B

-C

Figure N°08 : matériel de recherche des embryons. A : boîtes de pétri, B:MI, C: tubulure.

PARTIE EXPERIMENTALE

IV : Méthodes :

IV.1 : Suivi des chaleurs :

Le suivi de la cyclicité des vaches a été fait par des observations quotidiennes fréquentes, afin de persuader les signes de chaleurs, qui sont les suivants avec leur score selon **F van Eerdenburg, 2003**. (Annexe N°01)

IV.2 : Protocole de superovulation, insémination artificielle, et récolte :

Le traitement de superovulation comportant 08 injections à 12heures d'intervalle, a débuté entre le 10^{ème} et le 11^{ème} jour post chaleur de référence, avec présence d'un corps jaune sur l'un des ovaires détecté par palpation transrectale des ovaires.

L'injection du Stimufol a été faite en intra-musculaire au niveau de l'encolure, et celle du Prostavet en intra-musculaire au niveau de muscle fessier, après désinfection de lieu d'injection.

Tableau N°02 : protocole du traitement de la superovulation.

JOURS	TRAITEMENT
J0	chaleur de référence.
J10	Injection de Stimufol (100µg) Matin/Soir.
J11	Injection de Stimufol (75µg) Matin/Soir.
J12	Injection de Stimufol (50µg) Matin/Soir + PGF2α.
J13	Injection de Stimufol (25µg) Matin/Soir.
J14	Insémination Artificielle Matin/Soir.
J21	La récolte.

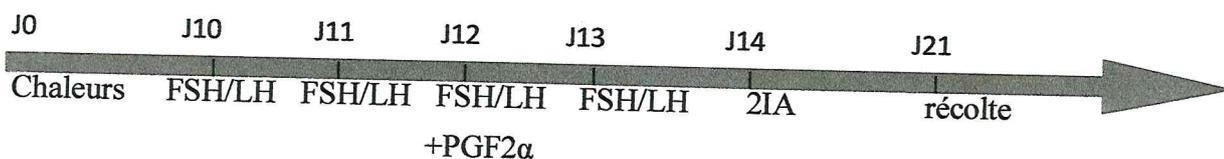


Figure N°09: Protocole du traitement de superovulation.

PARTIE EXPERIMENTALE

La récolte :

La récolte est réalisée le 7^{ème} jour post-insémination :

- Mettre la vache dans un travail de contention.
- Tranquillisation épidurale haute par injection de 05ml de la Xylocaïne.
- Nettoyage et désinfection de la région périnéale.
- Introduction de la sonde de récolte.
- Positionnement du ballonnet 3 doigts en avant de la bifurcation.
- Fixation de la sonde par gonflement (10 ml génisse et 15 ml vache).
- Rinçage des cornes (droite puis gauche) avec un volume total de 500 ml de PBS.
- Dégonflement du ballonnet.
- Retrait de la sonde.
- Instillation d'une solution d'antibiotiques.
- Injecter 02 ml de prostaglandine en intramusculaire.

Le liquide de récolte est récupéré dans deux flacons de 01 Litre, et acheminé vers le laboratoire pour l'observation microscopique. Après 15 minutes de décomptassions, le surnageant est éliminé et le culot est observé.

Le culot est réparti sur deux boîtes de pétri pour chaque flacon (04 boîtes en totalité), ensuite observé sous microscope inversé.

Par palpation transrectale, on a palpé 12, 10 et 02 corps jaune, dans la première et la deuxième et la troisième respectivement. Et à la récolte 10, 05, 00 ovocytes non fécondés respectivement, qui sont classés dans la classe 05 ovocytes non fécondés.

PARTIE EXPERIMENTALE

V. Résultats

V. 1 Résultats de la cyclicité

Les résultats de suivi des chaleurs sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau N°03 : résultats du suivi des chaleurs.

Numéro de vache	1 ^{ère} chaleur	2 ^{ème} chaleur	3 ^{ème} chaleur
09503	24/12/2013	13/01/2014	03/02/2014
09503	02/03/2014	23/03/2014	12/04/2014
08004	13/03/2014	04/04/2014	26/04/2014

On constate que les deux vaches sont cycliques, et présentent leurs chaleurs dans des délais réguliers, en moyenne toutes les 21 j.

V. 2 Résultats de la réponse des vaches au traitement de superovulation

V. 2. 1 Résultats des chaleurs de la superovulation

Les délais d'apparition des chaleurs de la superovulation, par rapport à l'injection de la PGF2 α , sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau N°04: résultats des chaleurs de la superovulation.

Numéro de vache	Chaleurs de la superovulation	
	Avant 48H de l'injection de PGF2 α	Après 48H de l'injection de PGF2 α
09503	—	+
09503	—	+
08004	—	+

On constate que les vaches manifestent leurs chaleurs toujours après 48H de l'injection de la PGF2 α , (environs 60H post-PGF2 α).

PARTIE EXPERIMENTALE

V. 2. 2 Résultats de traitement de la superovulation :

Les résultats de traitement de la superovulation sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau N°05 : résultats de la superovulation.

Numéro de vache	Nombre de Corps Jaune		Kyste folliculaire
	Ovaire gauche	Ovaire droit	
09503	10	12	+
09503	10	11	-
08004	2	2	-

On constate que les vaches ont répondues au traitement de superovulation, par présence de plus d'un corps jaune sur l'ovaire.

V. 2. 3 Résultats de la récolte

Les résultats de la récolte des embryons sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau N°06 : résultats de la récolte embryonnaire.

Numéro de vache	Embryons récoltés	Embryons transférables	Ovocytes non fécondés	Rapport embryons transférables/récoltés
09503	00	00	10	00
09503	00	00	05	00
08004	00	00	00	00

On constate que le traitement n'a pas donné des embryons, mais seulement des ovocytes non fécondés.

PARTIE EXPERIMENTALE

V. 2. 4 Résultats du classement des embryons

Les résultats du classement des embryons sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau N°07 : résultats de classification des structures récoltées.

Numéro de vache	Classe 1 (excellent)	Classe 1 (bon)	Classe 2 (moyen)	Classe 3 (médiocre)	Classe 4 (dégénéré)	Classe 5 ovocyte non fécondé
09503	00	00	00	00	00	10
09503	00	00	00	00		05
08004	00	00	00	00	00	00

On constate que tout les embryons trouvés sont de classe 5, ovocytes non fécondés.

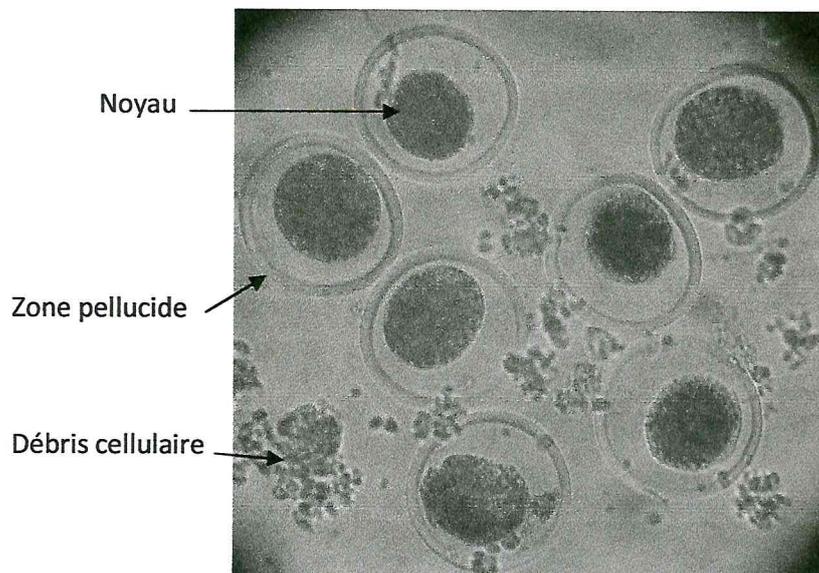


Figure N°10 : ovocytes non fécondés sous un microscope inversé.

PARTIE EXPERIMENTALE

Discussion

Dans notre cheptel les chaleurs de superovulation sont apparues en moyenne 60 heures après injection de prostaglandine, ce que ne concorde pas avec les résultats de **YADAN et al (1986)** et **DIOP et al (1987)** qui ont obtenu un intervalle de 41 heures, et de **FOOTE et al (1989)** avec une moyenne de 51 heures. L'allongement de cet intervalle peut être expliqué par :

- Les maladies métaboliques sub-cliniques qui affectent la reproduction des vaches selon **DJALLEL. A. K., (2004)**.
- Un régime alimentaire inadéquat, une carence, ou des déséquilibres spécifiques d'éléments nutritifs selon **SMITH et al, (1994)**.

La réaction ovarienne des femelles traitées est satisfaisante, avec une moyenne de corps jaune de 15,66 CJ/femelle, comparables aux résultats de **CHUPIN (1989)**, qui est de 14,7 corps jaunes, et celles de **LUCAS-HAHN et NIEMANN (1991)**, avec un nombre moyen de $12,6 \pm 1,1$.

Aucun embryon utilisable n'a été récolté dans notre expérimentation, toutes les structures récoltées sont des ovocytes non fécondés. Ce résultat peut être expliqué par :

- Allongement du délai PGF2 α -chaleurs; en effet **DALTON et al, (2000)**, rapporte un taux de non fécondé de 8/10 de la totalité des embryons, si les chaleurs de superovulation se manifestent après 48 heures de l'injection de prostaglandines.
- Si on considère que la durée de vie des spermatozoïdes congelés est de 12 à 24 heures d'après **CONCANNON, McCANN, TEMPLE, (1989)**, les spermatozoïdes ne seront plus viables au moment des ovulations qui se produisent, 22 à 26 heures après le pic de LH chez des animaux superovulés, selon **KAFI et McGOWAN (1997)**.

Selon **ANZAR et al, (2003)**, d'autres facteurs peuvent influencer la fertilité telle que la qualité de la semence et la technique d'IA.

PARTIE EXPERIMENTALE

CONCLUSION

L'amélioration de la biotechnologie liée à la production des embryons nécessite une bonne conduite d'élevage, une alimentation bien équilibrée, une détection des chaleurs, et un bon suivi de la cyclicité des vaches.

La superovulation est soumise à plusieurs facteurs qui influencent sur la réponse des vaches au traitement, dont les résultats sont soit des embryons de mauvaise qualité, soit des ovocytes non fécondés, ou carrément des récoltes nulles.

Néanmoins, ce travail nous a permis d'étudier la réaction des vaches à un traitement de superovulation à base d'extraits hypophysaires.

Nos résultats sont loin des résultats actuels des secteurs spécialisés dans ce domaine, nous avons la chance de maîtriser les notions de bases, la méthode, ainsi la technique de cette biotechnologie.

Enfin il faut penser à des conventions entre les éleveurs et le CNIAAG, pour préserver les races de toutes espèces d'animaux de rentes, et diminuer ou arrêter les échanges étrangères (importation des embryons congelés) et participer dans l'amélioration de l'économie nationale pour le lancement dans ce domaine.

RECOMMANDATIONS

Au cours de notre travail, nous avons arrivé à sortir quelques recommandations :

- Donner le maximum des informations sur le protocole de superovulation, et les facteurs de variation au praticien, afin de limiter des erreurs.
- Fournir une bonne ration alimentaire, équilibrée aux vaches.
- Travailler sur des vaches cycliques, moins agressives, pour diminuer le stress qui est un facteur limitant pour la réussite de traitement de superovulation.
- Faire une bonne sélection les vaches, on se base sur des critères zootechniques et sanitaires.
- Appliquer les mesures d'hygiène du bâtiment d'élevage.
- Pratiquer une bonne insémination artificielle au moment le plus opportun et à l'endroit le plus approprié du tractus génital de la femelle.

LISTE DES REFERENCES

1. **ALBERIO R., CABODEVILA J., IOVANNITTI B., TOQUATI S., 1994:** Superovulation performed on cyclic cows during progesterone treatment. –In: proceeding 10th AETE meeting, Lyon, 9-10 September 1994: 142.

2. **ALMAIDA A.P, 1987:** Superovulation in cattle: a combined treatment using synchromate B with either PMSG or FSH. –*Theriogenology*, **27**: 329-335.

3. **ANZAR M. ; FAROQ U. ; MIRZA M.A. ; SHAHAB M. ; AHMED N., 2003:** Factors affecting the efficiency of artificial insemination in cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. *Pakistan veterinary journal*, **23** (3): 106-113.

4. **AURICH CHR., HAHN J, 1993:** Male effects on in vivo and in vitro production of bovine embryos. -In: proceedings 9th AETE meeting, Lyon, 10-11 september 1993: 117-124.

5. **BO G.A., HOCKLEY D., NASSER L.F., MAPLETOFT R.J. (1994).** Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology*. **42**, 963-975.

6. **BOLAND M.P., GOULDING D., ROCHE J.F, 1991:** Alternative gonadotrophins for superovulation **35**: 5-17.

7. **BREUEL K.F., BAKER R.D., BUTCHER R.L., TOWNSEND E.C., INSKEEP E.K., DAILEY R.A., LERNER S.P. (1991).** Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*. **36**, 241-255.

8. **CONCANNON P.W., McCANN J.P., TEMPLE M., 1989:** Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod. Fertil. Suppl.* 1989, **39**, 3-25.

LISTE DES REFERENCES

9. DALTON J.C., NADIR S., BAME J.H., NOFTSINGER M., SAACKE R.G. (2000). The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim. Sci.* **78**, 2081-2085.
10. DARROW M D., LINDNER G.M., GOEMANN G.G (1982): Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows.-*Theriogenology*, **17**: 84.
11. DE RUIGH L., PEARSON R.E., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW J.A.M, 1995: Are "permanent donor cows" permanent donor cows? -In: Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995: 158.
12. DESCOTEAUX L., VAILLANCOURT D., (1998): article publié sur <http://www.medvet.umontreal.ca/>.
13. DONALDSON, 1984a: Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. - *Theriogenology*, **21** : 1013-1018.
14. DJALAL A. K., 2004 : Impact de la cétose sur la reproduction chez la Jersiaise en élevage intensif: cas de la ferme de Wayembam dans la zone périurbaine de Dakar. *Mém. DEA: Méd. Vét.* : Dakar; 3.
15. DRION P.V., BECKERS J.F., ECTORS F.J., HANZEN C., HOUTAIN J.Y., LONERGAN P. (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atresie. *Le point Vétérinaire*. **28**, numéros spécial, 881-891.
16. GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P. (1994). Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen. *J. Repro. Fertil.* **100**, 505-510.
17. GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P. (1991). Superovulation in heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle

LISTE DES REFERENCES

- stimulating hormones during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology*.**36**, 949-958.
- 18.HAHN J. (1992).** Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*.**38**, 269-275.
- 19.HASLER J.F., McCAULEY A.D., SCERMERHORN E.C., FOOTE R.H., 1983:** Superovulatory responses of Holstein cows. – *Theriogenology*, 19 : 83-99.
- 20.HOCKLEY D.K., BO G.A., PALASZ A.T., DEL CAMPO M.R., MAPLETOFT R.J.(1992).** Superovulation with a single subcutaneous injection of follitropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*.**37**, 224.
- 21.HUPKA S., MEINECHE-TILLMANN S., DETTERER J., MEINECKE.B., 2000:** Variables influencing embryo collection results in superovulated German Holstein cattle. –In: Proceedings 16th AETE meeting, Santander, 08-09 September 2000: 166.
- 22.INRA-UNCEIA (1990).** Blastographie. *Elev. Insem.* **235**, 39 pages.
- 23.KAFI M., McGOWAN M.R. (1997).** Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Ani.Reprod. Sci.* **48**, 137-157.
- 24.LAMOTHE, 1987 :** Le choix de la donneuse généralités et aspect économique. In : "Mieux maîtriser la reproduction des espèces domestiques par le transfert d'embryons". Sommet de la Francophonie Journées Scientifiques, 2-11 mai 1989, Dakar, pp : 17-28).
- 25.LUCAS-HAHN A., NIEMANN H., 1991:** Aspects of bovine embryo production in vivo and in vitro. - In: Proceedings 7th AETE meeting, Cambridge, 14-15 septembre 1991 : 63-75.

LISTE DES REFERENCES

26. MANCIAUX L., PONSART C., GRISOUARD D., HUMBLLOT P. (2000). Sources of variation in embryo production following superovulation in the monbeliard breed.
27. MAPLETOFT R.J., STOOKEY J.M. (1998). Chapter 4: General sanitary procedures and welfare considerations associated with in-vivo production of embryos. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd edition. 55-66.
28. NIBART M. (1991). Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage. *Rec. Med. Vet.* **167**, 261-290.
29. PONSART C., GOVIGNON A., ROHOU A., MANCIAUX L., DELCROIX P., GRISOUARD D., HUMBLLOT P. (2001). Effects of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the prim holstein and montbeliarde breeds. *Theriogenology*. **55**, 369.
30. PEREZ O., BOEDIONO A., FERGUSON E., AIRHART C., RICHARD R., GODKE R. (2001). Ovocyte and embryo production from FSH-treated postpartum beef cows shortly after calving. - *Theriogenology*, **55**: 516.
31. PONSART C., GOVIGNON A., ROHOU A., MANCIAUX L., DELCROIX P., GRISOUARD D., HUMBLLOT P. (2001). Effects of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the prim holstein and montbeliarde breeds. *Theriogenology*. **55**, 369.
32. SAUVEROCHE, B. ; WAGNER, H.G. Physiologie de la reproduction des bovins trypanotolérants : Synthèse des connaissances actuelles. Rome: F.A.O. (Etude F.A.O. Production et Santé Animales; 112), 1993 - 149 p.

LISTE DES REFERENCES

33.SAUMAND. J, 1995: La production d'embryons chez les bovins: quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? –INRA Prod. Anim., 8(4) : 275-283.

34.SLIMANE W., NIBART. M., THUARD.J.M., KEITA.J.B., HUMBLLOT. P, 1995: effect of controlling the moment of AI with a field LH kit on the number and quality of embryos collected from superovulated cows. –In: Proceedings 11th AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995: 240.

35.SHARPIN R.K.C., GREANEY K.B., ROGERSON A.R. 2000: Application of Ovagen in superovulation of dairy and beef cows in USA. – In : Proceedings 16th AETE meeting, Santander, 08-09 septembre 2000 : 208.

36.SMITH M., R.D.; POMERANTZ A.J; BEAI W.Z.; MC CANN J.P. PILBEANE., 1984: Insemination of Holstein Heifers at a present time after oestrous cyclesynchronisation using progesterone and prostaglandin. Journal of animalscience, 58 (4): 792-800.

37.THIBIER M., NIBART M., 1995: The sexing of bovineembryos in the field. Theriogenology, 43, 71-80.

ANNEXE

ANNEXE N°01

Hiérarchisation des signes d'œstrus : établissement d'un score (from F van Eerdenburg FMV Utrecht)

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