



Université Saâd DAHLEB BLIDA
Faculté des Sciences Agro - Vétérinaires et Biologie
Département des Sciences Vétérinaires



Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du :

Diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème :

**ESSAI DE PRODUCTION D'EMBRYONS BOVINS
UTILISANT DES EXTRAITS HYPOPHYSAIRES EN
INJECTION QUOTIDIENNE**

Présenté par :

KELLOU Radhia & BEHIDJ Nachida

Membres du Jury :

Président :	BELABBAS	M A B
Examineur :	BENBELKACEM	M A B
Promoteur :	ADEL	M A A.

- Promotion 2010 / 2011 -

Dédicaces

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination, ces Cinq années m'ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour les quelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

Je tiens à la fin de ce travail à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la foi et de m'avoir permis d'en arriver là.

Je dédie ce modeste travail : à mes très cher et adorables parents, ma mère et mon père, pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué et pour leur dévouement hors normes. Je trouve ici l'occasion de leur exprimer ma gratitude la plus sincère ; sans eux je ne serais pas là aujourd'hui

A mon frère Chakib et ma sœur Mouna qui malgré la distance qui nous sépare ne m'ont jamais oublié et n'ont jamais cessé de m'encourager.

A mes frères : Adel et Amine pour leur aide et leur précieux conseils.

A la mémoire de ma grand mère: Zuina que j'aurai tant aimé avoir encore près de moi.

Enfin, merci au grand amour de ma vie, mon neveu Sami, tous les jours, ton sourire sur la webcam me donne l'énergie de surmonter des montagnes.

A mes amis qui m'ont soutenu et aider tout au long de ce travail : Faudil, Taha, nabil, Louiza, Imene, Dalila, Farah

A Nabil qui a su me soutenir et m'aider à rester motivée pour mon travail, qu'il trouve ici le signe de mon profond respect.

A mes camarades en particulier Chafik, Zaki et Sofiane ainsi qu'à toute notre promotion 2011

J'aimerais souligner particulièrement l'aide que nous a apporté notre cher ami Kerkouche, on a la chance d'avoir rencontré en toi, une personne extraordinaire qui nous a si gentiment aidé. Travailler et partager cette atmosphère amicale avec toi furent un plaisir.

A ma chère amie Radhia, pour les bons moments passés ensemble; encore une fois notre duo était à la hauteur ; très longue vie à notre amitié.

Enfin, je n'oublie pas l'association Ibn El Baytar ainsi que ses membres y compris les anciens, qui ont rendu ces cinq années d'études fabuleuses et inoubliables: merci à vous tous pour votre bonne humeur, votre présence tant pour les bons que pour les mauvais moments, pour toutes les activités qu'on a pu réaliser ensemble : pour nos expositions, nos journées scientifiques nos sorties pédagogiques. A tous ceux qui m'ont aidé durant mon parcours au sein de notre association.

BEHIDJ Nachida

Dédicaces

Tout ce dont nous avons besoin pour réussir dans la vie est l'ignorance et la confiance...aussi, des personnes à nos cotés pour nous guider, soutenir et sur qui compter, j'aimerai dédier, ce mémoire aux personnes qui m'ont rapporté tout ça:

- ❖ A **Dieu** Le Tout puissant, Ton amour, et Tes grâces à mon égard m'ont fortifiée dans La persévérance et dans l'ardeur au travail. Merci
- ❖ A mes très chers **parents**, j'aimerai saisir, cette occasion pour vous dédier cet humble travail en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts que vous avez fourni pour mon éducation ainsi que ma formation. Pour votre affection, compréhension et patience... Vous vous êtes dépensés sans compter pour moi et mon propre intérêt, et ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis. Les efforts que vous avez fournis jour et nuit pour mon bien être, me marqueront pour toujours et à jamais, je ne pourrais jamais exprimer assez, ma gratitude envers vous merci, je vous adore et je vous serait toujours reconnaissante....
- ❖ A ma chère **sœur**, qui a toujours été là pour moi, même quand ça n'allait pas, ta présence, tes conseils ton soutien, m'on beaucoup rapporté, tu es la meilleure de toutes les sœurs, je t'adore merci !!
- ❖ A mon cher **frère**, mon héro, merci de m'avoir sauvé la vie à la dernière minute lorsque l'imprimante voulais me lâcher, et si RATIBA était la meilleure de toutes les sœurs c'est sans aucun doute toi, le meilleur de tous les frères, je ne saurais quoi être sans vous, merci d'être toujours là à mes cotés, vraiment merci.
- ❖ A mes **oncles, tantes, cousins et cousines**, et tous mes **proches**, vous avez de près ou de loin contribué à ma formation, affectueuse reconnaissance avec toute ma tendresse. A ma **cousine WAFIA** surtout, tu as toujours été un exemple pour moi, je te dédie ce travail, ainsi que mes remerciements les plus sincères, ce que tu as fais pour moi m'a énormément touché, un très grand merci.
- ❖ A mes très chers **grands parents**, l'exemple typique du dévouement, qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, les préserver et leur accorder santé, longue vie et bonheur.
- ❖ A mes chers **amis** : à HAMZA, merci pour tes encouragements et tes conseils qui m'ont vraiment aidé je te remercierai jamais assez, que tu puisse trouver ici l'expression de ma gratitude, à HAMID,ABDOU, RABAH, SAMIR, FARAH, FERIEL, TAHA et FAUDHIL, merci pour tout, je vous dédie les amis ce travail en vous souhaitant une bonne continuation, et surtout beaucoup de réussite, aussi à DALLEL, DALILA,...mes meilleurs vœux de succès dans vos études, à YACINE, mon ami de toujours, merci pour ton soutien et tes encouragements qui m'ont été si précieux vraiment merci, à CHAFIK et ZAKI, merci d'avoir partager avec nous les moments difficiles de ce travail dans la joie et la bonne humeur, et à tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom...et enfin à tous les **étudiants** de ma promo (**promo2006/2011**), ainsi qu'à mes **enseignants**.
- ❖ A mon **ami** NABIL, tu portes si bien ce titre !! je ne pourrais jamais te remercier assez pour l'aide que tu nous a fournie, pour ta présence et ton soutien, merci d'avoir rendu ce qui aurai

pu être fatigant en un pure moment d'amusement, merci...bon courage à toi, et très bonne réussite inchAllah.

- ❖ A mon amie, mon binôme, et mon « **DUO D'ENFER** », NACHIDA, de tout les souvenirs que nous a laissé ce travail, je n'oublierai jamais, nos moments de délire ensemble !! merci pour tout, je te le dédie, que tu puisses te souvenir que des bonnes choses qui nous ai arrivé, tout en te souhaitant bonne chance pour la suite et comme tu le dis si bien, longue vie à notre DUO.
- ❖ Et enfin à nos **vaches** : LAMPIKA, REBELLIA, ROUCETTE, et LOLITA ! et **embryons** : SEIF et BAKHTA,..., les stars de notre travail, sans qui il n'aurait eu aucun sens !encore une fois, bien jouer les bêtes !

KELLOU Radhia

Remerciements

A Mr BELABBAS Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse.

Nous remercions sincèrement Mr BENBELKACEM d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour avoir examiné notre document.

Nous remercions infiniment le docteur ADEL, notre promoteur dont la disponibilité, le savoir faire et le soutien ne nous ont jamais fait défaut et qui a été à l'écoute à la moindre demande.

Qu'il trouve ici la marque de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Nous remercions aussi tous ceux qui nous ont aidé à réaliser ce travail, particulièrement docteur ZEMIRLINE, docteur BOUZID et docteur TERZAALI pour leurs soutiens, notre collègue et ami KERKOUCHE qui nous a beaucoup aidé ; nous le remercierons jamais assez.

Sincères remerciements à Mr YAHIMI pour les documents qu'il nous a gracieusement transmis et pour son aide et son soutien tout au long de notre travail.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUMES

INTRODUCTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I « Le traitement de superovulation chez la vache »

I. INTRODUCTION	01
II. CHOIX ET CRITERES DES DONNEUSES.....	01
III. LES TRAITEMENTS DE SUPEROVULATION.....	01
III.1. La GnRH.....	01
III.2. La Pregmant Mare Serum Gonadotrophin « PMSG ».....	02
III.3. La Human Menopasal Gonadotrophin « hMG ».....	02
III.4. Les extraits hypophysaires.....	02
IV. SCHEMA DES TRAITEMENTS INDUCTEURS.....	03
IV.1. Chaleur de référence.....	03
IV.2. Chaleur de superovulation.....	03
IV.3. Insémination artificielle.....	04
V. RESULTATS DES TRAITEMENTS DE SUPEROVULATION ET DES FACTEURSD'INFLUENCE.....	04
CHAPITRE II « la récolte des embryons »	
I. INTRODUCTION.....	06
II. BASES PHYSIOLOGIQUES DE LA RECOLTE D'EMBRYONS.....	06

Supéovulation.....	17
II.1.4. Matériel de l'insémination artificielle.....	17
II.1.5. Matériel de récolte.....	17
II.1.5.1. L'anesthésie épidurale.....	17
II.1.5.2. Le matériel de récolte proprement dite.....	17
II.1.5.3. Le matériel de recherche des embryons.....	18
II.2. Méthodes.....	19
II.2.1. Le suivi des chaleurs.....	19
II.2.2. Le traitement de superovulation.....	19
II.2.3. La récolte.....	21
II.2.4. La recherche des embryons.....	23
III.RESULTATS.....	23
IV. DISCUSSION.....	30
CONCLUSION	
RECOMMANDATIONS	
REFERENCES	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES PHOTOS	
LISTE DES TABLEAUX	

Listes des figures :

Partie bibliographique

Figure 1 : description des différents traitements de production d'embryon couramment utilisés, (J Saumande La production d'embryon chez les bovins, INRA Prod Anim 1995 :277)

Partie expérimentale

Figure 2 : protocole de traitement de superovulation

Figure 3 : résultat global des embryons transférables et non transférables de la vaches 1 et vache 2

Figure 4 : résultat global de la classification des embryons de la vache 1

Figure 5 : résultat global de la classification des embryons de la vache2

Figure 6 : résultat global de la classification des embryons de la vache 1 et la vache2

Liste des photos :

Partie bibliographique :

Photo 1 : Prélèvement des embryons : Julie Paquin et Jean-François Lapointe 2003

Photo 2 : Filtration des embryons : Julie Paquin et Jean-François Lapointe 2003

Photo 3 : Morula (Ferrouk et al 2007)

Photo 4 : jeune blasto (Ferrouk et al 2007)

Partie expérimentale :

Photo 5 : station expérimentale

Photo 6 : matériel de récolte d'embryons

Photo 7 : microscope inversé

Photo 8 : boîte de Petri quadrillée(1) petite boîte(2), paillettes d'embryon(3), flacon contenant le liquide récolté (mis à décanté) (4), plaque de culture cellulaire 24 puits(5)

Photo 9 : vache 1 placée dans le travail de contention

Photo 10 : prélèvement des embryons

Photo 11 : flacon contenant les liquides de récolte mis à décanter

Photo 12 : blastocyste classe 1 (vache 2)

Photo 13 : Morula classe 1 (vache 2)

Photo 14 : dégénéré (vache 2)

Photo 15 : non fécondé (vache 2)

Photo 16 : l'ensemble des embryons récoltés de la vache 1

Photo 17 : l'ensemble des embryons transférables et non transférables de la vache 2

Liste des Tableaux :

Partie bibliographique

Tableau I: Stades de développement embryonnaire normal et code international correspondant (picard, 1989)

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

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

Partie expérimentale

Tableau IV: protocole du traitement de superovulation utilisé

Tableau V : réaction des ovaires au traitement de superovulation de la vache1 et vache 2

Tableau VI: résultat global des récoltes en fonction de leur qualité chez la vache 1 et vache2

Tableau VII : résultat de la classification des embryons récoltés de la vache 1 et vache2

Tableau VIII : résultat global des embryons non fécondés et dégénérés chez la vache1 et vache2

Liste des abréviations :

BSA : bovine Sérum Albumine.

CJ : corps jaune.

Cm : centimètre.

Emb : embryons.

FCS: sérum de veau fœtal.

FSH: Follicle Stimulating Hormone.

FSH p: follicule stimulating hormone swine.

GH: Growth Hormone.

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone.

H: heur.

hCG: Human Chorionic Gonadotropin.

hMG : Human Menopausal Gonadotropin.

IA : Insémination Artificielle.

IETS: international embryo transfer society

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1.

IMV : instrument de médecine vétérinaire.

INRA : institut national de la recherche agronomique.

IV : intraveineuse.

J : jour.

LH : Luteinising Hormone.

ml : millilitre

mm : millimètre

n: numéro.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin.

Sc : sous cutané.

UNCEIA : union national des coopératives agricoles d'élevage et d'insémination artificielle.

X : dix (chiffre romain).

ZP : Zone Pellucide.

% : pourcentage

Résumé :

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. La réponse variable (0 à 40 ovulations) et peu prédictible des animaux à un traitement de superovulation constitue encore à l'heure actuelle un des facteurs limitant de la méthode. Selon certains auteurs, 70 % de la variation des réponses observées peuvent être imputées à des facteurs intrinsèques liés au statut ovarien de l'animal ou à la nature et au rythme d'injection des substances utilisées.

Dans le cadre d'un essai d'un protocole de superovulation (utilisé pour la première fois en Algérie) qui vise à la diminution du nombre d'injections traumatisantes en jouant sur le facteur de stress, qui en générale limite la réponse ovarienne à celle-ci, notre travail s'est effectué sur deux vaches de race Holstein, au niveau de la station expérimentale du département de médecine vétérinaire de Blida d'une durée de 4 mois (juin 2011, septembre 2011).

Le traitement de superovulation que nous avons appliqué, consistait en l'injection de 3ml d'hormone gonadotrope FSHp (Stimufol rapport LH/FSH = 40%) une fois par jour, durant trois jours. Une injection de 3ml de PGF2 alpha a été injectée au 3ème jour du traitement, puis les vaches ont été inséminées après observation des chaleurs de superovulation. Sur les 3 traitements de superovulation que nous avons effectués, 2 collectes ont été réalisées, donnant une moyenne d'embryons récoltés égale à 15,5 embryons (11 embryons chez la vache1 et 20embryons chez la vache2), cette moyenne est élevée par rapport à celle obtenue par le traitement classique des 8 injections biquotidiennes, le nombre d'embryon transférable obtenue était égale à 6 embryons, soit un taux d'embryons transférables égale à 38,7%.

Mots-Clés : vache, superovulation, récolte, embryon, biotechnologie, bovin.

Summary

The objective of superovulation treatment in cows is to get the maximum number of transferable embryos fertilized with a high probability of producing pregnancies. The variable response of (0 to 40 ovulations) and the unpredictability in animals to the superovulation treatment is still today one of the limiting factors of the method, according to some authors, 70% of the variation in responses observed can be attributed to intrinsic factors related to ovarian status of the animal or the nature and rate of injection of substances used. In a trial of superovulation protocol (used for the first time in our country) that aims to reduce the number of injections by playing traumatic stress, which generally limits the ovarian response, our work was done on two Holstein cows, at the experimental laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine Blida for a period of 4 months (From June 2011, to September 2011).

The superovulation treatment we applied consisted of injecting 3 ml of gonadotropic hormone FSHp (Stimufol report LH / FSH = 40%) once daily for three days. An injection of 3 ml of PGF2 alpha was injected into the 3rd day of treatment, and cows were inseminated after observing them in superovulation heat. On the three treatments of superovulation we have made, two collections were performed, giving an average equal to 15.5 of harvested embryos (11 embryos in the first cow and 20 embryos in the second cow), this average is high compared to those obtained by conventional treatment twice daily injections of 8, the number of embryos obtained was equal to six embryos, a rate of transferable embryos equal to 38.7%.

Keywords: cows, superovulation, collection, embryo biotechnology, cattle.

ملخص:

الهدف من عملية مضاعفة إنتاج البويضات لدى الأبقار هو الحصول على أكبر عدد ممكن من الأجنة المخصبة والمستعملة مع وجود احتمال كبير للحصول على الحمل. التغيير في الاستجابة (من 0 إلى 40 إياضة) وقلة تنبؤ عملية مضاعفة الإياضة لدى الحيوانات لا تزال اليوم إحدى العوامل التي تحد من طريقتها، وفقا لبعض الباحثين، يمكن أن يعود 70 % من التباين في الاستجابات إلى العوامل الداخلية المتصلة بمركز المبيض للحيوان أو إلى الطبيعة وإلى عدد الحقن المستخدمة في بروتوكول عملية مضاعفة الإياضة .

في إطار تجربة بروتوكول عملية مضاعفة الإياضة (الذي يستخدم لأول مرة في بلا دنا) و الذي يهدف إلى تقليص عدد الحقن عن طريق التأثير بالضغوطات الصادمة ، الأمر الذي يحد بشكل عام استجابة المبيض ، وقد تم عملنا على بقرتين هولشتاين ، في محطة تجريبية لكلية الطب البيطري البلدية لمدة 4 أشهر (يونيو 2011 ، سبتمبر 2011).

عملية مضاعفة الإياضة التي طبقناها، كانت عن طريق حقن بسعة 3 مل من FSH/LH (عونادوتروبيج هرمون صتيموفول) مرة واحدة يوميا لمدة ثلاثة أيام. تم حقن حقنة من 3 مل من PGF2 في يوم 3 من العلاج، تم تلقيح الأبقار بعد مراقبة الشبق.

من بين العمليات الثلاثة لمضاعفة الإياضة التي حققناها ، أجريت مجموعتين جني الأجنة ، وهوما أعطي معدل يساوي 15.5 جنين (11 جنين من البقرة 1 و 20 من البقرة 2) ، وهذا المعدل مرتفع بالمقارنة مع تلك التي حصل عليها عن طريق البروتوكول السابق: 8 حقن مرتين في اليوم ، وعدد الأجنة القابلة للتحويل التي تم الحصول عليها قدر ب : ستة أجنة ، وهي ما يعادل 38.7% .

كلمات مفاتيح : الأبقار, مضاعفة الإياضة, جني, بيوتكنولوجيا, بقرة.

Introduction :

Le rythme de reproduction normal de la vache permet de donner naissance à un seul veau par année. Or, l'utilisation des techniques de reproduction assistée augmente d'une manière considérable le rythme de reproduction des vaches à haut potentiel génétique. Les biotechnologies de la reproduction, telles l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire conventionnel et la production d'embryons par fécondation in vitro représentent des outils qui permettent une amélioration génétique plus rapide que la reproduction naturelle [1]

En fait, la superovulation est la seule technique permettant d'obtenir un grand nombre d'ovocytes muris in vivo avec une vache qui, lorsque soumis aux procédures d'insémination artificielle suivies du transfert des embryons dans l'utérus de vaches receveuses, conduisent à la naissance de plusieurs veaux par intervalle reproductif normal [2]

Malgré les améliorations du protocole de superovulations proposées et l'essai de divers types d'hormones, l'induction de la polyovulation et le rendement en embryons viables ne sont pas complètement maîtrisés [3], [4], car les réponses aux traitements sont variables et peu prédictibles et deviennent les facteurs limitants des programmes de transfert embryonnaire.

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, de plus, les résultats de KANITZ et al [5] indiquent que l'application de FSH une fois par jour peut être aussi efficace que son application deux fois par jour, aussi, [6] ont conclu à partir de leurs expériences, que le traitement avec Folltropin une fois par jour pendant 3 jours donne une réponse similaire à un régime de traitement où il est donné deux fois par jour pendant 4 jours.

Au cours de notre travail nous avons étudié la réponse des vaches à un traitement de superovulation à base d'extraits hypophysaires en réduisant le nombre d'injections.

Dans un premier temps, nous rappellerons les principaux facteurs influençant la production d'embryons chez les bovins suite au traitement de superovulation ; Dans un second temps, nous présenterons et analyserons la technique et les résultats que nous avons obtenus.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : « Le traitement de superovulation chez la vache »

1. Introduction :

La vache est une espèce mono-ovulante : le quota ovulatoire se limite, dans les conditions physiologiques, à un seul ovocyte [7]. L'amélioration génétique des vaches laitières a conduit à une spectaculaire augmentation de la production de lait et cela a été associée avec une diminution des performances de reproduction [8, 9]. 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 [10]. 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 [11]. 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 (1943)** [12].

II. Choix et critères des donneuses :

Le choix doit être fondé sur trois critères: la supériorité génétique, la capacité de reproduction et de la valeur du marché de la descendance [13]. La donneuse doit avoir des qualités génétiques exceptionnelles aussi, doit-elle prouver une capacité à transmettre ses caractères à sa descendance. La donneuse idéale doit avoir un cycle régulier, pouvoir poursuivre une gestation et mettre bas sans problème utérin. Elle devra aussi être à son pic de production ou à la phase décroissante de la lactation [14], la donneuse devra être indemne de toute maladie [15], mais surtout des maladies redoutables telles que la tuberculose ou la brucellose [16]. La donneuse doit être d'âge moyen, ayant vêlé au moins une fois avec une bonne santé générale mais surtout génitale et évidemment avec des qualités génétiques tout à fait louables [17]. La sélection des donneurs peut impliquer aussi des antécédents de succès dans le transfert d'embryon [18, 19].

III. Les traitements de superovulation :

II.1. La GnRH :

La GnRH 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 [20, 21] ou à une libération anormale [22] 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 [23, 24] ou de FSHp [25].

III.2. Pregnant Mare Serum Gonadotrophin « PMSG » :

La PMSG est extraite du sérum de jument gravide entre le 140^{ème} et le 180^{ème} jour [26], a une demi-vie d'environ 120h, chez la vache elle est donc injectée une fois suivie par PGF2 alpha 48 h plus tard [27, 28], elle a une activité FSH et LH dans un rapport variant de 1/1 à 1/5, [29]. En 1991, NIBART [30] estime qu'avec sa demi-vie, une seule injection de PMSG d'une dose de 2 000 à 2 500 UI en intramusculaire devrait être suffisante. Cependant, à cause des effets indésirables de l'hormone, notamment la sécrétion élevée d'œstradiol, une injection d'anticorps anti-PMSG en intraveineuse au moment de la première ou deuxième insémination artificielle serait nécessaire [31].

III.3. La Human Menopasal Gonadotrophin « hMG »:

L'hMG fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé [32].

III.4. Les extraits hypophysaires :

Les extraits hypophysaires d'origine porcine le plus souvent, mais aussi bovine, ou ovine, sont de plus en plus largement utilisés. Possédant une demi-vie plus courte (5 à 6h) que la PMSG, ils doivent faire l'objet d'injections répétées. La demi-vie plus courte citée par Nibart (1991) [30] explique la nécessité du maintien d'un taux sanguin suffisant par deux injections quotidiennes avec un intervalle de 12h entre les deux [31]. Dans la plupart des cas la FSH est donnée deux fois par jour pendant quatre jours [33, 34, 35]. Les doses sont administrées de manière fractionnée et décroissante en doses biquotidiennes (matin et soir) pendant 4 jours, la dose de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA chez la vache viandeuse [32]. Quarant 48 ou 72 h après l'initiation du traitement, la prostaglandine est injectée 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 [27, 28]. Mais il ya des tentatives qui ont été faites pour diminuer le nombre d'injections, Purwantara et al 1994 [6] ont conclu à partir de leurs expériences, que le traitement avec la FSHp une fois par jour pendant 3 jours donne une réponse similaire à un régime de traitement où il est donné deux fois par jour pendant 4 jours.

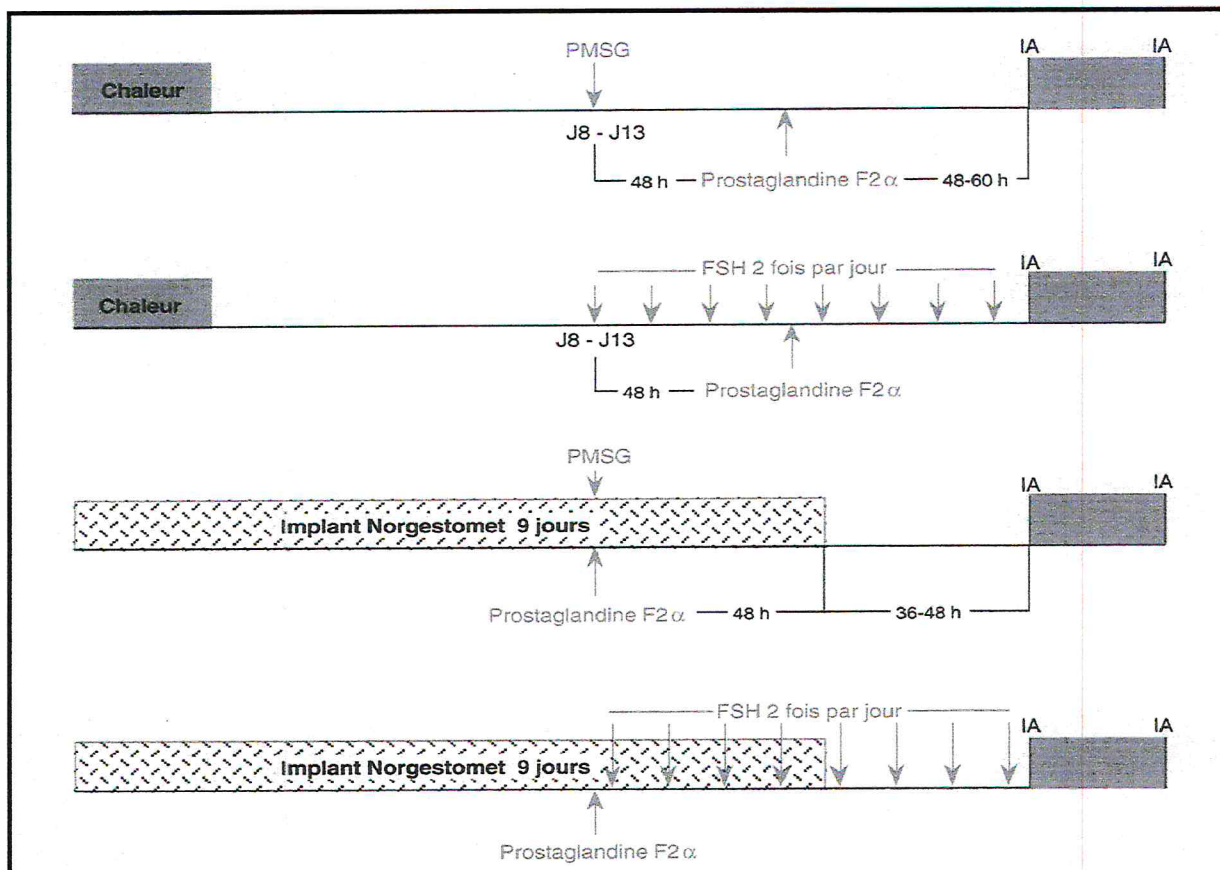


Figure 1: description des différents traitements de production d'embryon couramment utilisés [51].

IV. Schéma des traitements inducteurs :

IV.1. Chaleur de « référence » :

Le cycle œstral chez les bovins est d'une moyenne de 21 jours, d'une durée de 18 à 24 jours (dans 84% des cas). Le comportement de l'œstrus dure environ 12 à 16h. L'ovulation se produit normalement 24 à 36h après le début de l'œstrus [36]. Un traitement de superovulation peut être mis en place lors du pro-œstrus, c'est-à-dire vers le 16ème voire 17ème jour du cycle. Cependant étant donné la difficulté de prévoir le moment exact du retour en chaleur de l'animal, il est plus aisé de mettre en place le traitement de superovulation 9 à 15 jours après une chaleur dite de référence [32].

IV.2. Chaleur de « superovulation » :

Une chaleur de superovulation peut être obtenue par le retrait d'un corps jaune artificiel (l'implant ou la spirale) [37]. Ou, par l'injection de PGF2 alpha à la 3ème injection ou plus souvent à la 5ème injection de FSH, si le traitement de superovulation utilise de la

FSH. En cas d'injection répétée de PGF2 alpha, les injections sont réalisées simultanément à la 5ème et 6ème injection ou à la 7ème et 8ème injection de FSH [37].

IV.3. Insémination artificielle :

La semence récoltée au préalable est déposée dans les voies génitales d'une femelle en œstrus [31]. Le moment de l'insémination est commandé par celui de la venue des chaleurs, on utilise la *loi* du matin-soir [38]. Cette *loi* stipule qu'une vache dont l'œstrus est détecté le matin est inséminée l'après-midi, quand à celle venue en œstrus l'après midi, elle sera inséminée le lendemain matin. Chez les vaches superovulées, 2 ou 3 inséminations à 12 ou 24h d'intervalle peuvent être effectuées [39]. Cela s'explique par l'existence d'ovulations qui se succèdent dans le temps chez ces vaches. Egalement, elles permettent d'augmenter les chances de fécondation par rapport à une seule insémination [31].

V. Résultats des traitements de superovulation et les facteurs d'influence:

L'objectif d'une stimulation ovarienne est d'obtenir un maximum d'embryons transférables. La réponse variable (0 à 40 ovulations) et peu prédictible des animaux à un traitement de superovulation, constitue encore à l'heure actuelle un des facteurs limitants de la méthode. Selon certains auteurs, 70 % de la variation des réponses observées peut être imputée à des facteurs intrinsèques liés au statut ovarien de l'animal ou à la nature et au rythme d'injection des substances utilisées. Plusieurs auteurs [40, 41, 42, 43] ont rapporté, que la présence d'un follicule dominant au début du traitement de superovulation diminue sa réponse. L'ablation du follicule dominant juste avant le traitement de superovulation peut augmenter la réponse [44, 45, 46, 47]. Plusieurs auteurs [48, 49] ont trouvé que le recrutement d'un grand nombre de follicules est associée à une meilleure réponse au traitement de superovulation. **Kawamata** [50] a déterminé la relation entre le nombre de petits follicules existants avant le traitement de superovulation et la réponse à la superovulation: Un total de 55 superovulations ont été induites chez les vaches Holstein. Le nombre de petits follicules de 3-6 mm de diamètre sur les deux ovaires avant le traitement de superovulation été significativement corrélé avec le nombre de corps jaunes, après superovulation (0,440, $P < 0,001$), et avec le nombre d'embryons récupérés (0,503, $P < 0,001$) dont (0,482, $P < 0,001$) étaient transférables. La variabilité de réponse au traitement peut être due à la nature et au rythme des injections des substances utilisées, le remplacement de la PMSG par la FSH, a donné des résultats très encourageants mais pas toujours reproductibles. La FSH a permis d'obtenir en moyenne deux embryons de plus que ce qui était produit par la PMSG [51], plus

de 1 embryon pour [52], de 1.5 pour [30], et de 2 pour [53]. Selon **Nibart (1991)** [30], les extraits hypophysaires (FSH) sont plus efficaces que la PMSG puisqu'on obtient en moyenne plus d'embryons viables (5.0 contre 3.5). Les travaux de superovulation [54] sur des vaches de race Cheurfa à base d'extraits hypophysaires « FSH » a donné un nombre moyen d'embryons par vache égale à 5.0, dont un nombre moyen d'embryons transférables par vache de 2.33, soit un taux de viabilité de 46,66. **La Soca et al (1996)** [55] dans leur étude comparative entre un traitement de superovulation par PMSG et un autre avec de la FSH a donné : un taux moyen d'embryon récolté par vache égale à 2 et un taux d'embryons transférables de 0.66 lors du traitement par la PMSG, et un taux moyen d'embryon récolté par vache égale à 4.25 et un taux moyens d'embryons transférables égale à 3.25 avec des injections a 12h d'intervalle d'FSH durant 4 jours, **Monniaux et al (1983)** [52] ont obtenu un total de (6.0±6.4) embryons par la PMSG et un total de (8.6±6.7) par la FSH, **Goulding et al (1991)** [53] eux ont obtenu un total de (8.1±0.6) avec de la PMSG et un total de (12.3±0.8) avec la FSH. Cependant, le rythme d'injection d'FSH joue aussi un rôle dans la variabilité de réponses au traitement, une autre étude comparative de Superovulation chez les bovins: aspects pratiques des gonadotrophines, traitement et insemination par **Kanitz et al (2002)** [5], une comparaison entre les résultats de l'application d'FSH (Folltropin®, Vetrepharm, Canada) deux fois par jour pendant 4 jours et d'une application d'FSH une fois par jour pendant 4 jours aussi :Le traitement de superovulation a débuté chez des vaches Simmental du 8 au 13ème jour du cycle ovarien. Les animaux (groupe 1) ont reçu 8 injections de FSH (dose totale: 400 mg). Les animaux des groupes 2 et 3 ont reçu une seule injection par jour pendant quatre jours. La dose totale d'FSH était de 360 mg dans le groupe 2 et 260 mg dans le groupe 3. La PGF2 alpha a été donné 72 et 82 h après la première injection de FSH. L'insémination était faite de la même manière chez tous les animaux, les résultats ont indiqué que l'application d'FSH une fois par jour peut être aussi efficace que celle de deux fois par jour : le taux d'embryon transférable par donneuse était de 16.9 (groupe 1), 20.5 (groupe 2) et 16.0 (groupe 3), et un taux d'embryon transférable par donneuse de : 10,9 (groupe 1), 9.5 (groupe 2) et enfin de 11.1 (groupe 3).

CHAPITRE II : « La récolte des embryons »

I. Introduction :

La récolte et le transfert des embryons collectés se faisaient par voie chirurgicale. Aujourd'hui, ces opérations ont lieu par voie transcervicale et plus de la moitié des embryons collectés est congelée pour un transfert ultérieur [56].

II. Bases physiologiques de la récolte des embryons :

Quelques faits physiologiques expliquent les dates précises du cycle entre lesquelles il est possible de récupérer les embryons. En ce qui concerne la donneuse, et puisque la méthode de récolte cervicale est de règle actuellement [57], l'embryon doit être sorti de l'oviducte (J4 - J5) et encore libre dans l'utérus, donc à un stade antérieur au début de son immobilisation dans l'utérus (J13). Il ne doit non plus pas être trop gros pour ne pas être lésé au cours des diverses manipulations; or à partir de J13. On note une croissance importante du trophoblaste et l'embryon devient fragile [58].

En ce qui concerne la receveuse, l'embryon doit être remis en place dans le même segment du tractus génital que celui dans lequel on l'a prélevé, c'est-à-dire les cornes utérines [58, 59] et où il retrouvera des conditions semblables à son milieu d'origine, d'où la nécessité de la synchronie des cycles de la donneuse et de la receveuse [60].

Par ailleurs, [58] citant les travaux de [61] et ceux de [62] rappellent d'une part qu'on observe des contractions du myomètre jusqu'à J5 et d'autre part, qu'à partir de J6, une substance sécrétée par l'embryon, la trophoblatine, est nécessaire pour éviter la disparition du corps jaune, lui-même nécessaire au maintien de la gestation.

La combinaison de ces renseignements a fait que la période de la récolte a été établie entre J7 et J12 (JO = jours des chaleurs) [58]. Mais dans la pratique, les embryons sont prélevés à J7 -J8 [63]. Il s'agit dans tous les cas d'un œuf qui est récolté et transféré et non d'un embryon comme le laisse entendre le terme "transfert d'embryon".

III. Matériel et méthode :

III.1. Matériel:

Il se composera des éléments suivants :

Sondes dilatatrice : d'une longueur de 60 cm, possédant une extrémité conique de 4mm au sommet et de 7mm à la base, elle permet de préparer le cas échéant le col à la pénétration de la sonde de récolte.

Sonde de récolte : deux types sont disponibles. La première à trois voies est la sonde IMV (Cassou). Elle assure un circuit continu du milieu de collecte. Une voie permet de gonfler le ballonnet. Une autre permet d'injecter le liquide de récolte et la troisième assure la récupération du liquide injecté dans la corne. Cette sonde se compose d'un corps rigide de 56cm de long et de 6mm de diamètre. Il est muni d'un bouchon d'étanchéité postérieur et d'un ballonnet en caoutchouc à son extrémité antérieure. Le tuyau de récupération a une longueur de 160cm et un diamètre de 3mm. Il est muni à son extrémité d'une bille métallique destinée à en faciliter la progression dans la corne utérine. Il présente à son extrémité proximale des graduations qui permettent de juger du degré de pénétration dans la corne utérine. Il est percé dans sa partie terminale d'orifices. La seconde sonde est à deux voies (sonde de Han ; modèle allemand). Une voie permet de gonfler le ballonnet, tandis que la seconde permet d'injecter et de récupérer en alternance le liquide de récolte des embryons. La sonde a une longueur de 70cm et un diamètre de 6 à 7mm. Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre plus rigide et faciliter ainsi sa mise en place dans l'utérus.

Seringues : l'une de 20 ml pour gonfler le ballonnet et l'autre de 50 ml pour injecter le liquide de récolte.

Liquides de récolte : Il faut prévoir par récolte 1litre environ (250 à 500ml par corne utérine) de PBS (Phosphate Buffered Saline). Certains auteurs utilisent une solution de Bovine Sérum Albumine (BSA) à 0.4 % ou du PBS additionné de sérum de veau fœtal (FCS) à 2%. Ces liquides seront placés dans un flacon stérile et maintenu à température de 37°C.

III.2. Méthodologie:

III.2.1 Méthode chirurgicale:

Initialement, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous anesthésie générale le plus souvent au niveau de la ligne blanche en avant du pis. Une fois l'utérus extériorisé, une incision d'un cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter à deux voies (sonde de Folley). Le ballonnet était ensuite gonflé. Le liquide de récolte était injecté au moyen d'une seringue et d'une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet. Après récolte, le ballonnet était dégonflé, l'utérus suturé et on procédait de la même manière pour l'autre corne utérine.

Cette technique offrait l'avantage d'un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80%), de pouvoir juger de la réponse ovarienne au traitement de superovulation. Elle fut

pratiquement abandonnée étant donné l'infrastructure de mise en place requise mais aussi la difficulté de répéter souvent l'intervention sur le même animal [32].

III.2.2. Méthode non chirurgicale ou collecte transcervicale :

III.2.2.1. Principes de base (sonde de Cassou à trois voies):

L'animal placé dans un travail de contention pour en limiter les déplacements est éventuellement prémédité au moyen d'un tranquillisant (animaux rétifs mais risque de décubitus), Une anesthésie épidurale basse (3ml de xylocaïne à 2%) 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 [64].

Le rectum est débarrassé des matières fécales et la région vulvaire convenablement lavée et désinfectée.

La dilatation mécanique préalable du col ne s'avère habituellement nécessaire que chez la génisse. Il convient dans un premier temps d'insérer le dilateur dans un anneau cervical et de maintenir une pression constante mais contrôlée. Le plus souvent, la résistance s'efface brutalement une fois le 3^{ème} anneau franchi.

Le flacon de récupération sera placé en contrebas de l'utérus pour favoriser la récolte du liquide de perfusion.

La sonde de récolte sera préalablement rincée au moyen de sérum physiologique. Recouverte d'une chemise sanitaire, elle est introduite dans le vagin en longeant le plafond pour éviter le méat urinaire. Une fois arrivée au col, la chemise sanitaire sera rompue. Le col est alors manuellement ramené vers l'arrière et vient coiffer l'extrémité de la sonde. La progression de la sonde dans le col est assurée en prenant le col en avant de la sonde et en le manipulant de bas en haut et de gauche à droite.

Une fois le col franchi, la sonde est alors introduite dans l'une ou l'autre corne (respecter autant que faire se peut le même choix pour éviter de perfuser deux fois la même corne ...). La corne est alignée sur la sonde en la prenant par en-dessous et en la faisant progressivement glisser sur la sonde.

Le ballonnet sera placé trois travers de doigts environ en avant de la bifurcation des cornes. Parce qu'elle réduit le volume mort de liquide dans la corne, une position plus antérieure du ballonnet est de nature à améliorer la qualité de la récolte. Le gonflement du ballonnet a pour but de fixer la sonde dans la lumière de la corne et d'éviter que le liquide de perfusion ne reflue vers l'arrière. Un ballonnet trop gonflé risque d'endommager la muqueuse

utérine et d'entraîner la présence de sang dans le liquide de récolte. Le volume d'aire nécessaire sera de 10 à 12 cm³ pour une génisse et de 14 à 18 cm³ pour une vache.

Une fois le ballonnet en place, il convient de dévisser le bouchon étanche en arrière du corps de sonde pour permettre la progression du flexible. En général, la corne utérine forme un coude juste en avant du ballonnet. Il conviendra donc de la relever légèrement pour y faciliter la progression du flexible. Celui-ci sera introduit jusqu'à l'obtention d'une résistance signant la position de la bille terminale au niveau de la région utéro-tubaire soit après 30 à 40 cm chez une génisse et 40 à 50 cm chez une vache. Une fois le flexible positionné, le bouchon proximal sera revissé.

20 à 30 ml de liquide de perfusion seront injectés avant d'ouvrir la voie de retour. Normalement, le liquide commence à s'écouler instantanément. L'aide ajustera le débit d'injection de manière à maintenir en permanence 30 à 50 ml de liquide dans la corne. Une surpression risque de faire reculer le ballonnet ou de créer une lésion de l'oviducte. Inversement, si l'injection est trop lente, la corne risque de se vider et d'aspirer la muqueuse utérine contre les orifices du flexible. L'arrêt du retour est souvent observé lors du changement de seringue. Pendant la perfusion (200 ml par corne), l'opérateur agite et déplie la corne utérine tout en évitant de la manipuler pendant les phases de contractions du rectum.

Une fois la corne perfusée, on injectera dans la sonde un volume d'air suffisant pour en chasser le liquide et être ce faisant sur de récupérer l'entièreté des embryons. Il faut ensuite dévisser le bouchon d'étanchéité et ramener le flexible tout en continuant de récupérer le liquide. Une fois le flexible retiré, on obture la voie de retour et on dégonfle le ballonnet. Le corps de sonde est retiré de manière à éviter le voile intercornual avant d'introduire la sonde dans l'autre corne.

L'intervention sera complétée par l'instillation d'une solution d'antibiotiques dans l'utérus et l'injection d'une prostaglandine pour éviter le développement d'une gestation multiple qui s'accompagne fréquemment d'avortement.

III.2.2.2. Quelques difficultés pratiques:

Si l'utérus est trop plongeant, la surélévation du train antérieur de l'animal est de nature à faciliter la manipulation des cornes. Le cas échéant la traction sur un fil passé au moyen d'une aiguille courbe dans l'exocol permet de maintenir l'utérus en position plus postérieure.

Si le flexible ne sort pas du corps de sonde, c'est que la corne est peut-être insuffisamment relevée. S'il bute après 10 à 20 cm, c'est que l'extrémité de la corne n'est pas assez dépliée.

L'absence du retour de liquide ou un retour en goutte à goutte peut être imputé à une position trop antérieure du flexible, à son enroulement dans la corne ou à l'obturation de ses orifices par de la fibrine ou du mucus. Le cas échéant, il sera débouché en injectant du liquide sous pression. Si le ballonnet est trop postérieur, du liquide risque de refluer dans la corne contra latérale. Parfois l'absence du retour est du à l'éclatement du ballonnet.

III.2.2.3. Particularités de la sonde à deux voies (sonde de Han):

Plus que pour la sonde à trois voies, la mise en place de cette sonde est essentielle : il faut en effet la faire progresser le plus loin possible tout en retirant le mandrin. Une fois le ballonnet gonflé, le mandrin est complètement retiré et les voies d'injection et de récupération branchées. L'injection peut se faire par simple pesanteur ou par injection de 50 ml de PBS. Les voies d'injection et de sortie seront clampées et ouvertes en alternance jusqu'au passage dans chaque corne de 350 à 400 ml DE PBS. Le mandrin ne pouvant être réintroduit dans la sonde, une seconde est nécessaire pour la perfusion de l'autre corne. Il persiste au niveau du tuyau un volume mort dans lequel les embryons peuvent être aspirés et refoulés. Ceci explique peut-être la diminution relative du nombre d'embryons récupérés au moyen de cette sonde [32].



Photo1 : Prélèvement des embryons [65]

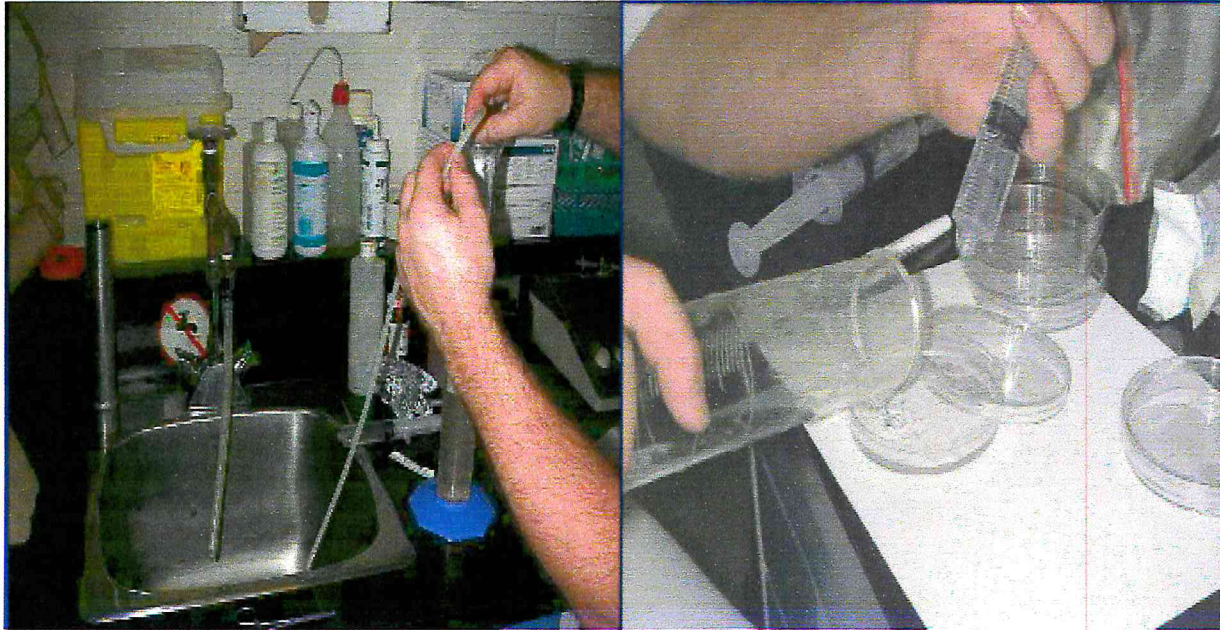


Photo2 : Filtration des embryons [65]

IV. Recherche et appréciation de la viabilité des embryons :

IV.1. Recherche des embryons :

La recherche et l'examen des embryons dans le liquide de récolte doivent se faire avec du matériel stérile dans les meilleures conditions de propreté et à température constante (20-25°C) [58]. On élimine une grande partie du liquide de collecte soit après décantation soit par filtration en utilisant un millipore de 0,74 μm de diamètre, soit encore par centrifugation [66].

Ces trois techniques ont donné respectivement 99 p. 100, 95 p.100 et 50 p. 100 des embryons récupérés [67].

Le filtrat est examiné à la loupe binoculaire (grossissement x10 pour une première recherche rapide). Les embryons sont alors pipetés et déposés dans un milieu de conservation (milieu F1 ; I.M.V, L'Aigle, France) [68].

IV.2. Appréciation de la viabilité :

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons suivent les recommandations faites par l'IETS (International Embryo Transfer society) et sont exclusivement morphologiques (intégrité de la zone pellucide, taille et homogénéité de la masse cellulaire, formation du blastocoele et du bouton embryonnaire) [69]

V. Identification du stade du développement des embryons :

Un système international de codification numérique a été établi par [70] **ELSDEN**, pour décrire le stade de développement et la qualité des embryons. Le stade de développement est désigné par un 1^{er} chiffre de 1 à 9 (Tableau I) Il est donc évident que la qualification de l'opérateur intervient pour beaucoup. Mais les embryons, surtout ceux des vaches superovulées (donc ayant ovulé sur plusieurs heures) ne suivent pas nécessairement le schéma de développement classique et il est normal de retrouver à J7, par exemple, des morula (photo3), des jeunes blastocystes (photo4) ou des blastocystes en expansion, néanmoins, ces embryons seront transférés autant que possible chez des receveuses respectivement à 6, 7 et 8 jours post-œstrus [71].

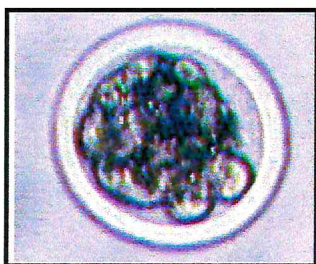


Photo3 : Morula [54]



photo 4 : jeune blastocyste [54]

Tableau I : Stades de développement embryonnaire normal et code international correspondant [71]

JOUR	EVENEMENT	MORPHOLOGIE	CODE INTERNATIONAL
0	Chaleur	Ovocyte folliculaire	
1	Ovulation	1 cellule avec cumulus	1
2		2 cellules	2
3		4,8 cellules	2
4		16,32 cellules	2
5	Passe dans l'utérus	Jeune morula	3
6		Morula compacte	4
7		Jeune blastocyste	5
8		Blastocyste	6
		Blastocyste en expansion	7
9		Eclosion	
10		Blastocyste libre	8
11		Début d'élongation	9
14		Blastocyste allongé	
20-23		Début des battements cardiaques et de l'attachement	

VI. Qualité des embryons :

VI.1. Evaluation de la qualité des embryons :

L'évaluation de la qualité des embryons se fait par 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 blastocoele, du bouton embryonnaire et du trophoblaste. [72] Tous ces critères figurent dans la blastographie publiée par [73] l'INRA-UNCEIA (tableau II) dans lequel les embryons sont observés au grossissement 200 pour évaluer leur qualité. On distingue quatre classes de qualité embryonnaire.

Tableau II : Classification des embryons selon leur qualité d'après l'INRA UNCEIA [73]

Classification	Qualité	Description
1	Excellent	- 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	- 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	- 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	- 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	- Arrêt de développement à un stade précoce. - Cellules dégénérées.

Certaines équipes rajoutent une classe 5 qui correspond aux ovocytes non fécondés [72].

VI.2. Influence de la qualité sur la réussite du transfert :

La question est ensuite de savoir si le taux de gestation est influencé par la qualité de l'embryon. Dans leur étude, [74] ont obtenu les taux de gestation suivants, pour des embryons

collectés à J7 et transférés en frais : 66 à 76 % pour des embryons de qualité 1, 62 à 69% pour des embryons de qualité 2 et 54 à 60 % pour des embryons de qualité 3. Leur protocole ne comportait cependant pas suffisamment d'embryons pour que ces différences soient significatives.

Des études portant sur des effectifs plus importants ont donné des résultats plus précis. [75] ont obtenu un taux de gestation global de 79%, mais ils n'ont transféré que des embryons de qualité 1 ou 2. Aucune différence dans la probabilité de survie d'un embryon en fonction de sa qualité n'a été mise en évidence.

Par contre, une étude réalisée par [56] portant sur 9023 transferts d'embryons frais a montré des taux de gestation significativement liés à la qualité de l'embryon (tableau III)

Tableau III: Taux de gestation et qualité d'embryons [56]

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

Les taux de gestation sont significativement différents entre eux ($p < 0,05$).

Nous voyons donc que la qualité de l'embryon semble avoir une influence sur la réussite du transfert, surtout quand on considère la différence entre des embryons de qualité 1 ou 2 et des embryons de qualité 3, comme le confirment [76]. Sur 783 transferts en frais, ils obtiennent, pour des embryons de qualité 1, 2 et 3 des taux de gestation de 45%, 44% et 27% respectivement.

Ces études présentent l'influence de la qualité de l'embryon observée au moment de la collecte.

PARTIE
EXPERIMENTALE

I. Introduction :

La stimulation ovarienne, également dénommée traitement de superovulation, fait appel à des protocoles quasi standardisés dans lesquels sont utilisées des hormones gonadotropes ou placentaires. L'effet de l'apport exogène de l'hormone (FSH) a été étudié.

Certains facteurs de variation de la réponse aux traitements de superovulation ont été mis en évidence tel que: la nature et la fréquence d'injection des hormones [77]. En ce qui concerne la fréquence des injections, elle pourrait engendrer un stress pour les animaux, pour éviter ce stress, des études ont testé l'efficacité de réduction de dose de FSH [78]; [79].

- ❖ **Objectif :** l'objectif de notre travail était d'évaluer la réponse des vaches à un traitement de superovulation à base d'extraits hypophysaires en réduisant le nombre d'injections.

II. MATERIEL ET METHODES :

II. 1 Matériel:

II.1.1. Lieu et durée de l'étude :

L'étude a été réalisée au niveau de la station expérimentale du département de médecine vétérinaire de Blida (photo5), d'une durée d'environ quatre mois : de juillet 2011 jusqu'à septembre 2011.



Photo 5 : Station expérimentale

II.1.2. Les animaux utilisés :

Les vaches prévues pour le traitement de superovulation et la collecte d'embryons, appartiennent toutes à la race Holstein, au nombre de quatre vaches, deux pie rouges et deux pie noires, d'un indice corporel qui varie entre trois et trois et demie, et dont trois étaient en lactation.

Cependant, deux des quatre vaches ont été traitées par le traitement de superovulation, quand aux deux autres, elles ont été exclues de l'étude en raison de quelques problèmes de cyclicité.

II.1.3. Hormones et matériel utilisés pour le traitement de superovulation :

- ❖ Les extraits hypophysaires, un flacon de stimufol (FSH/LH 40% dilué dans 3ml de NaCl) et de la prostaglandine Estrumate.
- ❖ Une seringue de 5ml, une pince mouchette, compresses stériles, Bétadine, des gants pour la palpation transrectale.

II.1.4. Matériel de l'insémination artificielle :

Pistolet d'insémination et son mandrin, paillettes d'insémination, BT2, gaine et chemise sanitaires.

II.1.5. Matériel de récolte : (photo 6)

II.1.5.1. L'anesthésie épidurale :

Des ciseaux, un bistouri, de l'eau et du savon pour nettoyer la région épidurale, Bétadine, seringue de 5ml, compresses stériles.

II.1.5.2. Le matériel de récolte proprement dite :

La sonde de récolte souple de type Foley à double voies pour bovin et son mandrin, des gants pour la palpation transrectale, du PBS (Phosphate Buffered Saline), deux flacons de 500ml pour la récolte du liquide de rinçage des cornes, une chemise sanitaire et des seringues de 10, 20 et 50ml.



Photo 6 :materiel de récolte d'embryons

II.1.5.3 Le matériel de recherche des embryons :

Boîtes de pétri quadrillées de 8cm de diamètre et une plus petite de 3.5cm de diamètre, un microscope inversé (photo 7), un flacon de milieu nutritif pour embryon (Embryo Holding Medium 7042302 IMV), des paillettes pour embryon, une tubulure de petit calibre en silicone pour aspirer les embryons, une plaque de culture cellulaire 24 puis.



Photo 7 : microscope inversé

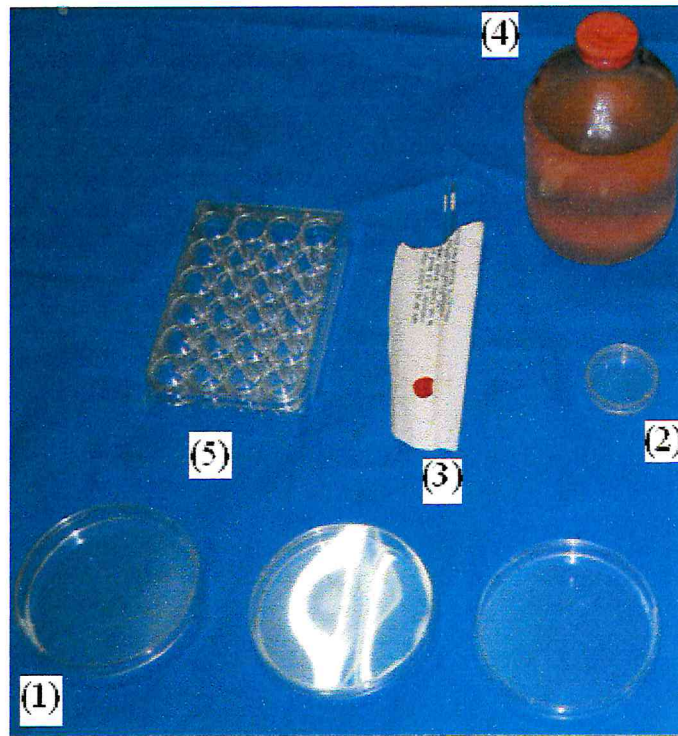


photo 8 : boîte de petrie quadrillée(1) petite boîte(2), paillettes d'embryon(3), flacon contenant le liquide récolté (mis a décanté) (4), plaque de culture cellulaire 24 puis(5)

II. 2 METHODE :

II.2.1. Le suivi des chaleurs :

Les chaleurs de référence étaient surveillées quotidiennement en faisant sortir les vaches 30minutes par jour et en surveillant leur comportement.

L'acceptation du chevauchement était considérée comme signe majeur des chaleurs.

II.2.2. Le Traitement de superovulation :

Le traitement de superovulation est réalisé à la FSH et LH porcines (Stimufol) avec le pourcentage de 40% de LH cette association est diluée avec 9 ml de NaCl isotonique, à la posologie de 3ml par injection pour chaque vache, en 3 injections intramusculaires quotidiennes.

Le traitement a commencé (entre le 10 ème et le 12ème jour) après apparition des chaleurs de référence.

A la 3ème injection de FSH, 3ml de prostaglandine (Estrumate) sont administrés par voie intramusculaire.

Les animaux qui présentaient des signes d'œstrus après le traitement de superovulation ont reçues une double insémination artificielle à J5.(tableau IV)

Les animaux ont été traités après chaleurs de référence naturelles.

Sur un effectif de quatre vaches ; deux d'entre elles ne présentaient pas de chaleur régulière ou bien, présentaient des pathologies ovariennes, elles ont étaient traités avec de la prostaglandine et de la GnRH.

Suite au non retour en chaleur de ces dernières, elles ont été écartées du programme.

Le traitement de superovulation est le suivant (figure 2) :

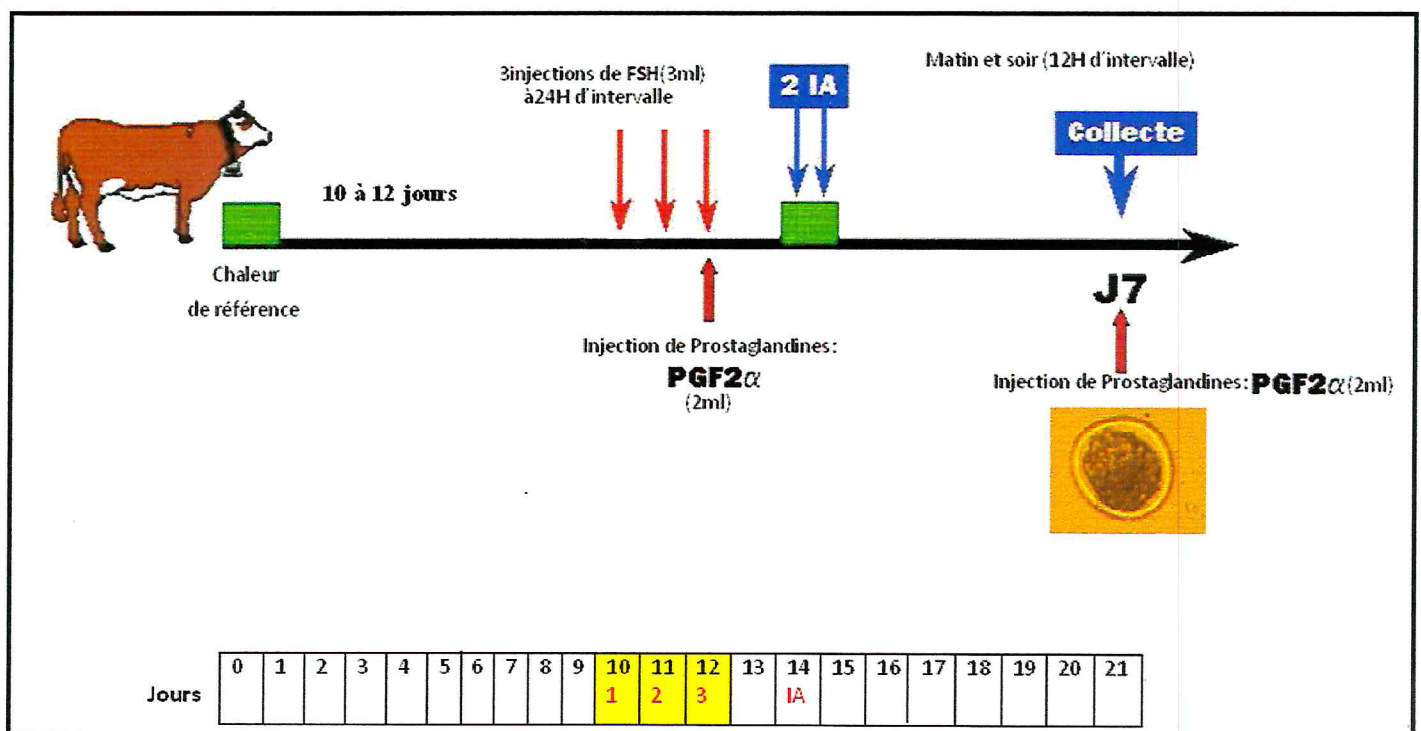


Figure2 : protocole de traitement de superovulation utilisé

Tableau IV: protocole du traitement de superovulation utilisé.

Jours	Traitements
J0 : chaleurs de référence	Pas de traitement (observation des chaleurs)
J10 : 1 ^{er} jour du traitement	1ere injection de FSH : 3ml
J11 : 2ème jour du traitement	2ème injection de FSH : 3ml
J12 : 3ème jour du traitement	-3ème injection de FSH : 3ml -Injection de PG : 2ml
J14 :5ème jour du traitement	Insémination artificielle matin et soir
J21 :7ème jour après l'insémination artificielle	-Récolte d'embryon. -Injection de PG : 2ml

II.2.3. La récolte :

La récolte est réalisée 7jours après l'insémination artificielle.

La donneuse d'embryons est systématiquement placée dans une cage de contention (le travail) (photo9), Le rectum est vidé de son contenu.

Après nettoyage et désinfection de la vulve, une anesthésie épidurale basse est réalisée à raison de 5 ml de Xylocaine à 2% afin de limiter les mouvements de l'animal lors de la manipulation des cornes, une sonde de Foley à 2 voies protégée par une chemise sanitaire est introduite dans l'une des cornes utérines de la donneuse.

Cette sonde est positionnée et maintenue en place à l'aide d'un ballonnet gonflé. Les embryons sont ensuite récoltés par lavage des cornes (photo10) (injections et récupérations successives d'un milieu de culture PBS) 250ml par vache, le liquide est récupéré dans un flacon stérile, une fois la récolte dans la 1ère corne est effectuée on réoriente délicatement la sonde vers l'autre corne après avoir remis le mandrin et on procède de la même manière.

A la fin de la récolte on administre la prostaglandine (3ml)



Photo 9: vache 1 placée dans le travail de contention

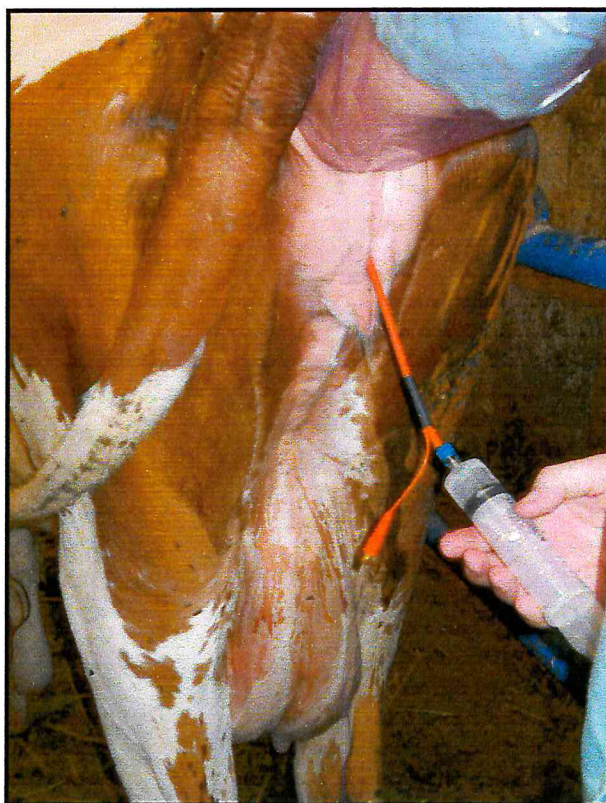


Photo 10: prélèvement des embryons

II.2.4. La recherche des embryons :

Les embryons récoltés dans le liquide de lavage sont mis à décanter pendant 20 à 30 mm (photo 11).

Le liquide surnageant est éliminé. Le fonds est mis dans des boîtes de pétri quadrillées qui sont ensuite analysées au microscope inversé.

Chaque boîte ainsi remplie est observée au faible grossissement (x4) et tous les embryons trouvés sont placés dans une boîte de pétri ronde contenant du milieu de conservation (embryo holding medium 7042302IMV)

Au fort grossissement (x10), les embryons sont plus facilement observables. Ils sont photographiés et prélevés un par un pour être placés dans une boîte de Pétri.

C'est au cours de cette phase qu'une évaluation est possible, d'après le modèle INRA. Les seuls critères dont on dispose sur le terrain sont des critères morphologiques qui permettent d'évaluer son stade de développement et sa qualité, c'est-à-dire la disposition et l'aspect des cellules qui le composent.



Photo 11 : flacon contenant le liquides de récolte mis à décanter

III. Résultats :

- Le premier traitement de superovulation effectué chez l'une des deux vaches a donné un résultat médiocre. Suite à ce résultat nous ne l'avons pas inséminée.

Tableau V : réaction des ovaires au traitement de superovulation de la vache1 et vache 2

	Nombre de récoltes	Nombre de corps jaunes	Nombre d'embryons :
Vache1	1	14	11
Vache2	1	23	20

➤ Chez la vache1 :

La palpation transrectale effectuée juste avant la 1^{ère} récolte a révélée qu'il y'avait : huit corps jaune au niveau de l'ovaire gauche et six au niveau de l'ovaire droit.

➤ Chez la vache2 :

La palpation transrectale réalisée lors de la 2^{ème} récolte a révélée a son tour qu'il y'avait : treize corps jaune au niveau de l'ovaire gauche et dix au niveau de l'ovaire droit.

Tableau VI: résultat global des récoltes en fonction de leur qualité chez la vache 1 et vache2

	Nombre total d'embryons récoltés :	Embryons transférables n(%)	Embryons non transférables n(%)
Vache1	11	4(36.36)	7(63.63)
Vache2	20	8(40)	12(60)
Total	31	12(38.7)	19(61.29)

- Sur le totale d'embryon récolté (31 embryons), nous avons eu un total d'embryons transférables égale à 12, ce qui correspond à un taux égal à 38,7%
- Chez la vache 1 nous avons eu un total d'embryon égal à 11 dont un perdu au cours de la manipulation (photo 16), dont 4 transférables et 7 non transférables.

- Chez la vache 2 nous avons eu un total d'embryons égal à 20 emb : 8 transférables et 12 non transférables (photo17). dont un embryon transférable perdu au cours de la manipulation.

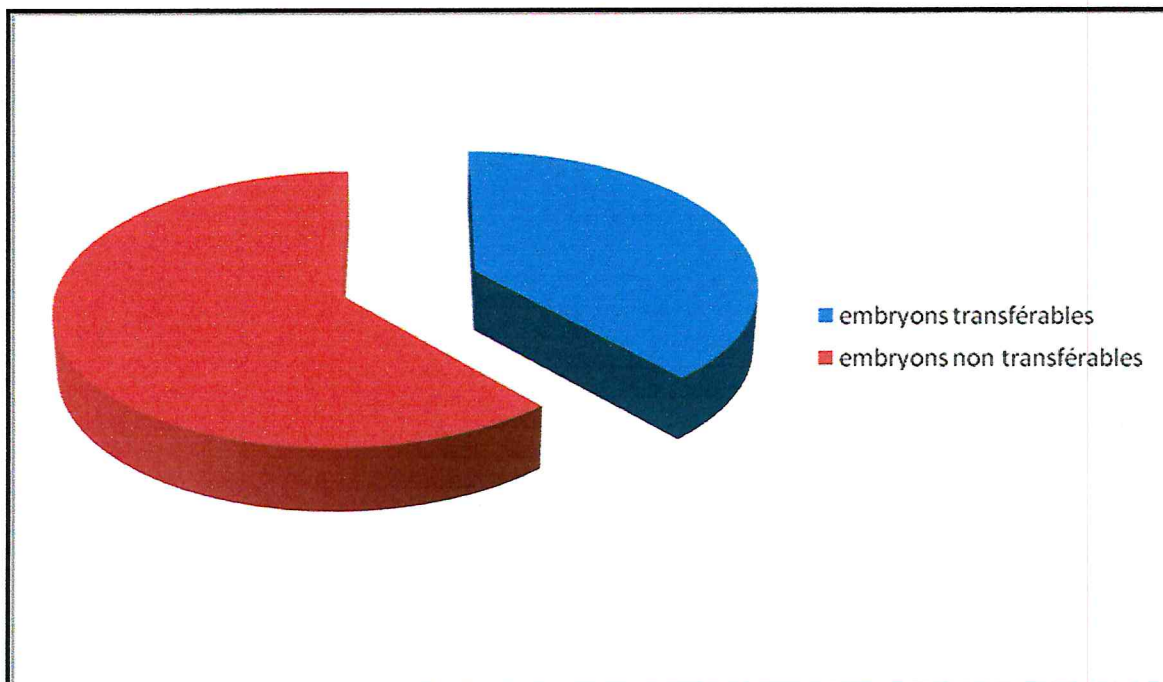


Figure 3 : résultat global des embryons transférables et non transférables de la vaches 1 et vache 2

Tableau VII : résultat de la classification des embryons récoltés de la vache 1 et vache2

	Nombre total d'embryons	Embryons classe1 n(%)	Embryons classe2 n(%)	Embryons classe3 n(%)	Embryons classe4 n(%)
Vache1	11	2(18.18)	2(18.18)	0(0)	7(63.63)
Vache2	20	6(30)	1(5)	1(5)	12(60)
Total	31	8(25.80)	3(9.67)	1(3.22)	19(61.29)

- La classification des embryons de la récolte de la vache 1 a donnée :
 - Quatre morulas (deux classe 1 et deux classe 2).
 - Deux dégénérés et cinq non fécondés (sept embryons classe 4)
- La classification des embryons de la récolte de la vache 2 a révélé :
 - Six blastocystes et deux morulas : cinq blastocystes classe 1(photo 12) et une morula classe1 (photo13), un blastocyste classe2 et une morula classe3.
 - Cinq non fécondés (photo15) et sept dégénérés classe 4 (photo14).

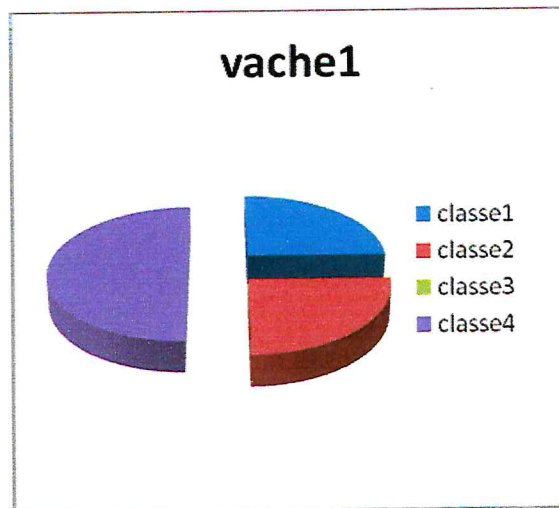


Figure 4: résultat global de la classification des embryons de la vache 1

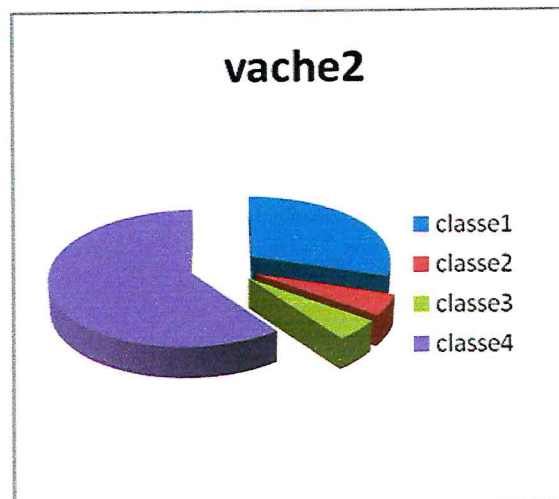


Figure 5: résultat global de la classification des embryons de la vache2

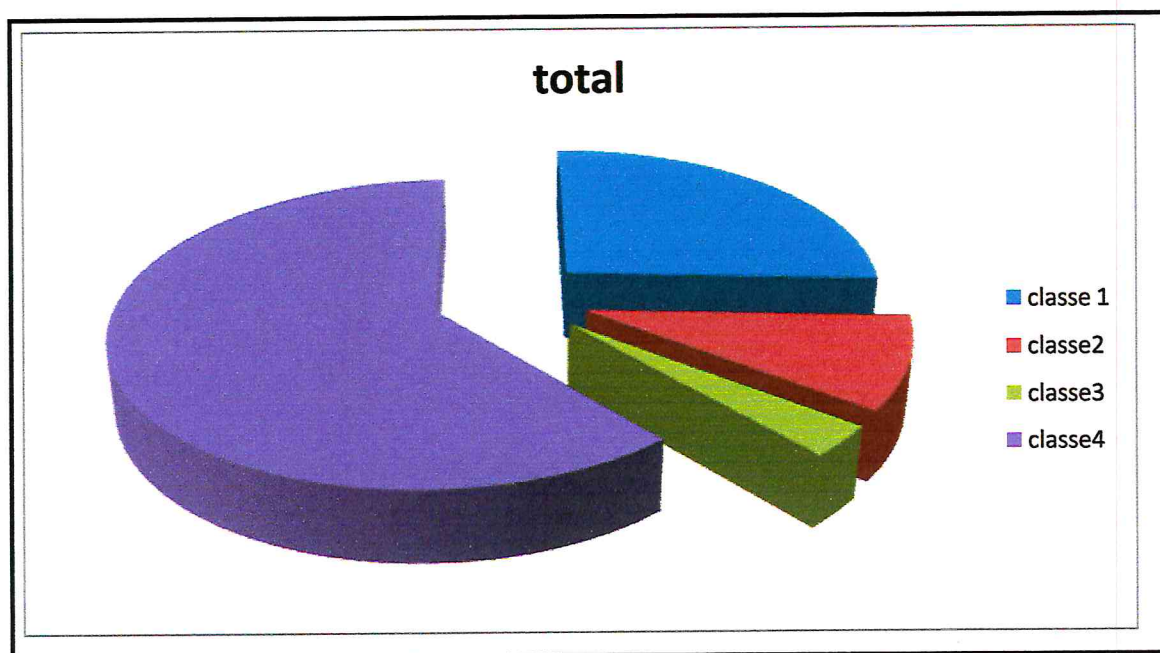


Figure 6 : résultat global de la classification des embryons de la vache 1 et la vache2

Tableau VIII : résultat global des embryons non fécondés et dégénérés chez la vache1 et vache2

	Nobre total d'embryons récoltés	Non fécondés n(%)	Dégénérés n(%)
Vache1	11	5(45.45)	2(18.18)
Vache2	20	5(20)	7(35)
Total	31	10(32.25)	9(29.03)

- Dans le nombre total d'embryon récolté : (11 chez la vache1 et 20 chez la vache2), nous avons obtenu chez les deux vaches le même nombre d'embryons non fécondés (n=5).
- Le nombre d'embryons dégénérés était de 2 chez la vache1 et de 7 chez la vache2.



Photo 12 : blastocyste classe1 (vache2)

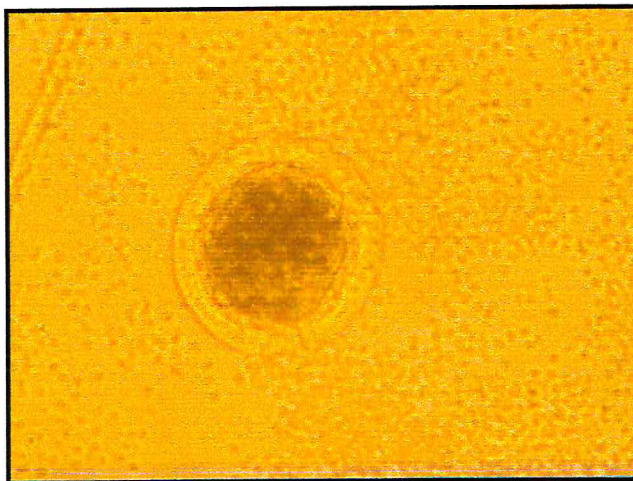


Photo 13 : Morula classe1(vache2)

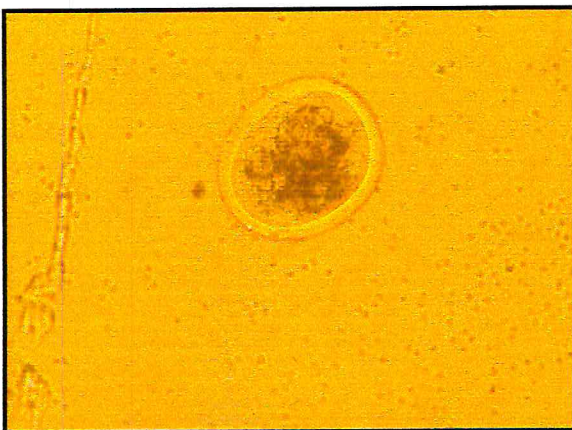


Photo 14 : dégénéré (vache2)

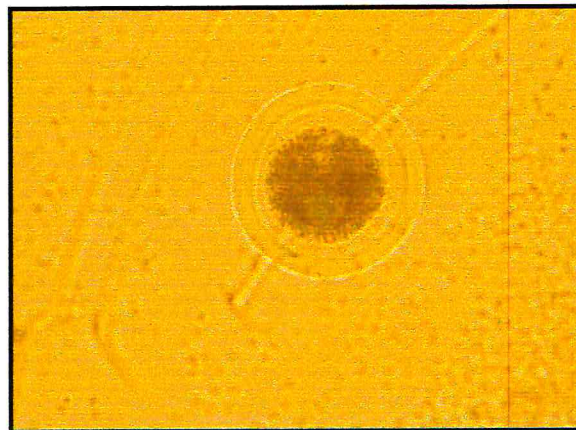


Photo 15 : non fécondé (vache2)



Photo 16 : l'ensemble des embryons récoltés de la vache 1

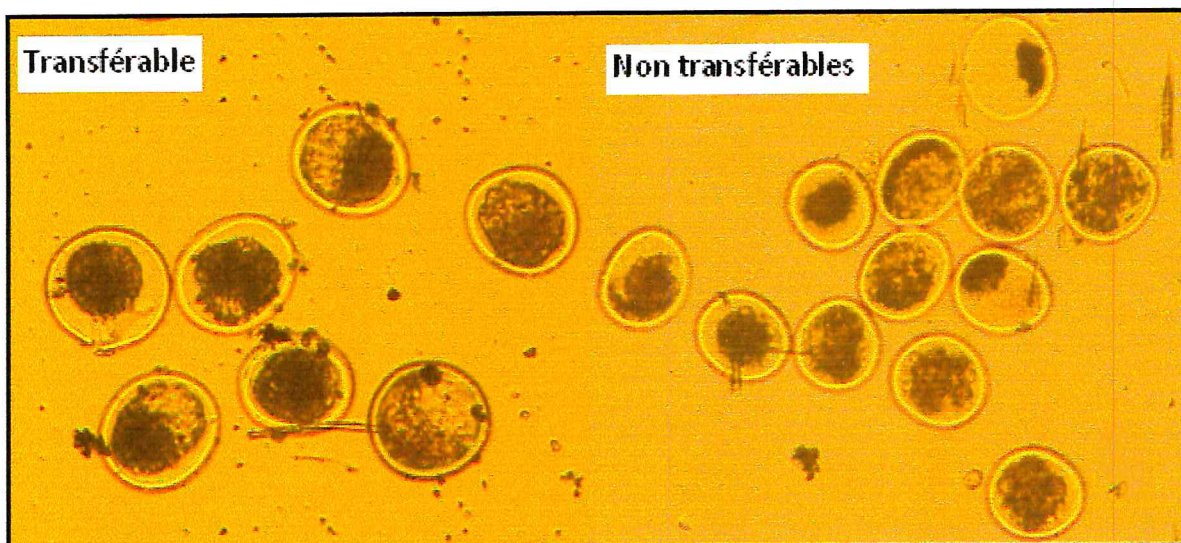


Photo 17 : l'ensemble des embryons transférables et non transférables de la vache 2

IV. Discussion :

La réaction ovarienne était satisfaisante dans l'ensemble, le nombre moyen de corps jaunes obtenu est de 18.5 cj par vache, ce résultat est nettement supérieur à celui obtenu en Algérie par **Adel** [80] et **Ferrouk et al** [54] chez la vache cheurfa, qui était respectivement de 7 cj et 5 cj en utilisant le protocole de superovulation classique.

Le nombre moyen d'embryons collecté est de 15.5, ce résultat est supérieur à celui obtenu par **ADEL** [80] et **Ferrouk et al** [54] qui est de 4.5 et 5.0 respectivement. **Kanitz et al** [5] qui a utilisé un protocole de superovulation comportant des injections quotidiennes a obtenu 16 embryons avec une dose de FSH de 260 mg et 20.5 embryons avec une dose de 360mg réparties de la même manière.

Dans notre travail le taux d'embryons transférables était de 38.7% soit une moyenne de 6 embryons par vache, ce résultat est supérieur à celui de **Adel** [80] et **Ferrouk et al** [54] qui est de 2.83 et 2.33 respectivement et proche de celui de celui de **LAURIERE** [68] qui est de 6.8 embryon par vache.

Cependant il est inférieur au résultat de **Kanitz et al** [5] qui a obtenu 10,9 embryons avec le protocole classique (8 injections) et 11,1 et 9,5 respectivement pour des dose de 260 et 360 mg de FSH réparties en doses quotidiennes.

Par contre il est nettement supérieur au résultat de **Dong-Soo FILS et al** [81], qui a utilisé le même protocole que le notre (3 injections) et a obtenu une moyenne de 3 embryons, le même auteur a obtenu une moyenne de 7,2 embryons avec une injection unique de FSH.

Pour le cas de la première opération de superovulation qui à donné lieu à une mauvaise réaction, nous pouvons supposer que cela puisse être due au stress (il diminue l'expression des chaleurs, altère la qualité des ovocytes et le développement embryonnaire), et l'absence d'expression des chaleurs due à la présence du veau avec la vache. Une autre cause importante de la faible efficacité de la superovulation est le désordre du développement pré-ovulatoire **Loos et al** [82]; **Durocher et al** [83] ; Ce facteur est encore mal compris mais l'une des possibilités est qu'une partie de follicule en croissance qui est stimulée par FSH comprend les follicules en début d'atrésie. L'autre possibilité est l'intervalle entre la lutéolyse et

l'apparition du pic de LH chez le bovin stimulé par la FSH en comparant avec le bovin non stimulé **CHU THI KIEU' OANH** [84]

Nous avons noté dans nos résultats, un nombre moyen important d'embryons non fécondés (5) et dégénérés (4.5), d'après **Takagi et al** [85] et **Yang et al** [77], cette qualité est non prévisible et est dû à la variation liée à la réponse de l'ovaire, au taux de fécondation et au développement embryonnaire.

Conclusion :

Du fait de la courte demi-vie de la FSH et LH, 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,

L'incertitude de prévision et la forte variabilité de la réponse ovarienne aux traitements de Superovulation malgré les essais de différentes hormones ou d'astuces thérapeutiques rendent difficile l'affirmation de la supériorité d'un traitement sur l'autre. Cependant, la prise en considération du nombre moyen d'embryons récoltés dans notre expérimentation, montre que le protocole à injections quotidiennes de FSH testé pour la première fois en Algérie ayant pour objectif d'évaluer la réponse des vaches à un traitement de superovulation à base d'extraits hypophysaires en réduisant le nombre d'injections. , semble donner de bons résultats, à condition d'être expérimentée à large échelle.

Recommandations :

- Refaire l'expérience sur un cheptel plus important et le séparer en deux lots afin de tester les deux protocoles : le notre (à 3injections quotidiennes) et le classique (à 8injections biquotidiennes) et les comparer par la suite.
- Privilégier le travail sur des vaches moins agressives afin de limiter le facteur stress.
- Attendre plusieurs cycles avant de commencer le traitement afin de détecter les femelles a cycle irrégulier.
- Prévoir le matériel adéquat : loupe binoculaire, cahétaire pour le transfert des embryons, filtre des embryons.
- Utiliser l'échographe.
- Prévoir des receveuses afin d'étudier la viabilité des embryons transférés.
- Prévoir un biocongélateur d'embryons.
- Essayer d'éliminer les facteurs limitant tel que : l'alimentation, mode d'élevage.
- Former l'éleveur pour qu'il puisse être capable de détecter correctement les chaleurs qui sont une étape très importante de ce travail.

Des travaux devraient donc être repris sur ces bases afin de déterminer les conditions optimales pour obtenir la meilleure réponse possible des vaches.

REFERENCES

- 1- **DORIS PELLERIN** : 2003 symposium sur les bovin laitier évaluation technico économique de la fécondation in vitro (conférence) université Laval soit-Foy Québec
- 2- **THI-KIEU-OANH CHU** : these2009 : analyse globale et quantitative de la réponse génique à la superovulation dans les ovocytes bovins. Faculté des études supérieures de l'Université Laval. Québec dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences Animales
- 3- **MAPLETOFT R.J., BO G.A., PIERSON R.A.**, 1994. Recruitment of follicles for superovulation. *Compend. Contin. Educ.* 16, 127-141
- 4 -**ROBERGE S., RIEGER D., RAWLINGS N.C.**, 1995. Perioovulatory LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers. *Theriogenol* 44, 59-7
- 5- **KANITZ WILHELM , FRANK BECKERA, FALK SCHNEIDERA, ELLEN KANITZB, CLAUS LEIDINGC, HANS-PETER NOHNERC, RALF PÖHLANDA** :2002 Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination, *Reprod. Nutr. Dev.* 42. 587–599
- 6- **PURWANTARA B., SCHMIDT M., CALLESEN H., GREVE T.**, 1994 Follicular development and embryo recovery following 3 versus 8 FSH injections in heifers, *Acta Vet. Scand.* 35. 89–92.
- 7 -**MICAELLA ELISABETH GERMAIN**, 2009, La double ovulation chez la vache 97 : 11.
- 8- **WALL, E., BROTHERSTONE, S., WOOLLIAMS, J.A., BANOS, G., COFFEY, M.P.** 2003. Genetic evaluation of fertility using direct and correlated traits. *J. Dairy Sci.* 86 : 4093–4102.

- 9- WASHBURN, S.P., SILVIA, W.J., BROWN, C.H., MCDANIEL, B.T., MCALLISTER, A.J. 2002. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. J. Dairy Sci. 85 : 244-251
- 10- MINERY S, 2007, La fertilité dans les objectifs de sélection internationaux, Bulletin technique de l'insémination Animale, 126 :23-26.
- 11- R.J MAPLETOFT IVIS. 2006 (Ed.) International Veterinary information service, Ithaca NY 17 NOV; Ro104.1106 Transfert d'embryons bovins.
- 12- CASIDA, L. E., R. K. MEYER, W. H. MCSHAN AND W. WISNICKY. 1943. Effects of pituitary gonadotrophins on the ovaries and induction of superfecundity in cattle. Am. J. Vet. Res. 4:76).
- 13- MAPLETOFT R.J. 1985 Embryo Transfer in the cow: General procedure. Revici tech off int Epiz;4:843-858.
- 14- LAMOTHE, P. 1989 Le Choix de la donneuse. Généralités et aspects économiques. In "Mieux maîtriser la reproduction des mammifères domestiques par le transfert d'embryons". Session théorique, Sommet de la francophonie, Dakar, 2-11 mai : 17-28.
- 15- DIOP, P.E.H. 1989 Application de la technologie du transfert d'embryons dans le contexte de l'élevage africain. Séminaire régional sur le système de production du lait et de la viande au Sahel. Dakar, 22-26 mai 343-359
- 16 -NIBART, M. ; BOUYSSOU, B. ; FRORIN, B. 1979 La Transplantation embryonnaire chez les bovins. Elev. Et Insém., (172) : 3-8
- 17- ROKHAYATOU FALL, 1992 contraintes du transfert d'embryons en milieu villageois

- 18 -**KELLER DS, TEEPKE G.** 1990; The effect of variability in responses to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. *J Dairy Sci* 73:549-554.
- 19 -**MOOR RM, KRUIP THAM, GREEN D.** Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology* 1984, 211:103-116.
- 20 -**SAUMANDE J.** 1980. Concentrations of luteinizing hormone, estradiol-17 β and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrinol.* 84: 425-437.
- 21- **BEVERS M.M. & DIELEMAN S.J.** 1987. Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, estradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 15: 37-52.
- 22 -**GREVE, T., BOUSQUET, D., KING, W.A. & BETTERIDGE. K.J.** 1984. In-vitro fertilization and cleavage of in-vivo matured bovine oocytes. *Theriogenology* 22,151-165
- 23 -**GUAY P, BEDOYA M,** 1981. Effects of GnRH on blood serum hormone concentrations, ovulation rates and embryo production in lactating cows treated with PMSG. *Can J Comp Med* 45:351-356
- 24 - **TAKAHASHI Y, KANAGAWA H,** 1984. Effects of LHRH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF $_2$ alpha. *Jpn J Vet Res* 32:183-189
- 25- **WUBISHET A, GRAVES CN, SPAHR SL, KESLER DJ, FAVERO RJ,** 1986. Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows. *Theriogenology* 25:423-427

26 -DERIVAUX, J., 1971 Reproduction chez les animaux domestiques. Ed. DEROUAUX, Liège, 1, 156 pages

27 -ALKEMADE SJ, MURPHY BD, MAPLETOFT RJ. 1993. Superovulation in the cow; Effects of biologicolactivity of gonadotrophins. InProc Ann Mtg AM Embryo Assoc Portland Main.

28-MAPLETOFT RJ, STEWARD KB, ADAMS GP. 2002. Recent advances in the superovulation of cattle. *Reprod Nutr Dev*; 42: 1-11.

29 -SAUMANDE J.,1987. Superovulation in cattle : last improvements and prospects. 3rd Meeting European Embryo Transfer Association, Lyon 4-5 septembre, 97-141.

30 -NIBART, M. 1991, Le Transfert embryonnaire et les bissections et sexage. *Rec. Méd. vét*, 167(3/4) biotechnologies appliquées: 261-291.

31 -ROKHAYATOU FALL, 1992 contraintes du transfert d'embryons en milieu villageois page 16 20

32- CH HANZEN: 2011. Production d'embryons in vivo 39:5.

33 Diaz T., Pancarci S.M., Drost M., Schmitt E.J., Ambrose J.D., Fredriksson W.E., Thatcher W.W., Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses, *J. Dairy Sci.* 84 (2001) 88-99

34- GONG J.G., ARMSTRONG D.G., BAXTER G., HOGG C.O., GARNSWORTHY P.C., WEBB R., 2002 The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers, *Theriogenology* 57 1591-1602.

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

Anim. Reprod. Sci. 46 1-14.

36- KASTELIC JP. 2001.Computerized heat detection. *Advances in Dairy Technology*; 13:393-402.

37- PONSART ET HUMBLLOT 2002.In *Livre des prostaglandines*

38- DIOP, P.E.H. 1987.Insémination artificielle et fécondation chez des taures superovulées. Mémoire Maîtrise : Sciences Faculté des Etudes Supérieures, Univ. Montréal :

39- HEYMAN, Y. RENARD, J .P, OZIL, J .P; DU MESNIE DU BUISSON, F. 1978.Cervical embryo transfert at different stage in cattle. In : "*Controle of reproduction in cow*", La Haye : Nijhoff, : 330-335.

40- GUILBAULT L.A., GRASSO F., LUSSIER J.G., ROUILLIER P., MATTON P. 1991, Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle, *J. Reprod. Fertil.* 91 . 81–89.

41- HUHTINEN M., RAININO V., ALATO J., BREDBACKA P., MAKI-TANILA A., 1992. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in the superovulated cow, *Theriogenology* 37 457–463.

42- MURPHY M.G., BOLAND M.P., ROCHE J.F., 1998. The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers, *Theriogenology* 49 557–569.

43- WEHRMAN M.E., FIKE K.E., KOJIMAN F.N., BERGFELD E.G., CUPP A.S., MARISCAL V., SANCHEZ, T., KINDER J.E., 1996 Development of persistent ovarian follicles during synchronization of estrus influences the superovulatory response to FSH treatment in cattle, *Theriogenology* 45 593–610.

- 44- BROGLIATTI G.M., SALAMONE D.F., ADAMS G.P., 1997 Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves, *Theriogenology* 47 1253–1264.
- 45- 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 C.S., LEE H.J., YOON J.T., 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows, *Theriogenology* 55. 937–945.
- 46- KOHRAM H., BOUSQUET D., DUROCHER J., GUILBAULT L.A., 1998. Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial, *Theriogenology* 49 1165–1174.
- 47- SHAW D.W., GOOD T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle, *Theriogenology* 53 1521–1528.
- 48- BUNGARTZ L., NIEMANN H., 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination, *J. Reprod. Fertil.* 101 583–591.
- 49- ROMERO A., ALBERT J., BRINK Z., SEIDEL G.E. JR., 1991 Number of small follicles in ovaries affect superovulatory response in holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states, *Theriogenology* 35 915–929.
- 50- KAWAMATA M., 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows, *J. Vet. Med. Sci.* 56 965–967.
- 51- INRA J Saummande 1995. Physiologie de la reproduction des mammifères domestiques et la production d'embryons chez les bovins

- 52- MONNIAUX D, CHUPIN D & SAUMANDE J** 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19 55-81.
- 53- GOULDING, M. D., CHALEPAKIS, G., DEUTSCH, U., ERSELIUS, J. R. AND GRUSS, P.** 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10, 1135-1147)
- 54-FERROUK MUSTAPHA, GHARBI ISMAIL, ADEL DJALLAL, LAFRI MOHAMED, TOUATI KAMEL, KAIDI RACHID AND DJAMEL GUETARNI** 2008 Production and transfer of embryos in Algerian "Cheurfa" bovine breed *African Journal of Agricultural Research* Vol. 3 (4), pp. 320-323
- 55- LA SOCA P.E.H. DIOP, M.A. SOW, KH. SENGHOR, M.SY, M.N. DIOUF, TH. BAZARUSANGA** 1996. Transfert d'embryons dans une unité laitière au Sénégal, *Reproduction et production laitière*, 316:290
- 56- HASLER J. F.** 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle - *Theriogenology* - 56 (9), 1401-15
- 57-BETTERIDGE, 8. BETTERIDGE (K.J.)**.- An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fert.*, 1981, 51 : 1-13.
- 58-NIBART (M.), BOUYSSOU (B.)**. 1981- Le transfert embryonnaire chez les bovins. *Rec. Méd. vét.*, 157 (1) : 71-87.
- 59 - BONNEAU (M.)**. 1981– Perspectives d'embryons dans les entretiens de Bourgelat, pp. 353-358. résultant des manipulations espèces animales. Premiers Ed. Point Vétérinaire, Alfort
- 60- DERIVAUX (J.), ECTORS (F.)**.- 1980, *Physiologie de la gestation et obstétrique vétérinaire*. Ed. du Point vétérinaire, Maisons-Alfort, 273 p.

61-BRAND (A.), GUNNICK (J.W.), DROST (M.), AARTS (M.H.), DE EHS (C.H.W.).-
1975, Non surgical embryo transfer in cattle. II. Bacteriological aspect. In Seminar on egg transfer in cattle in the E.E.C. programme of coordination in research on beef production, pp: 57-72.

62-NORTHEY DL & FRENCH LR 1980.effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates of the lifespan of the bovine corpus luteum.J.Anim .Sci, 50 :298 302

63- LAMOTHE (P.). 1989.Le transfert de l'embryon. In "Mieux maîtriser la reproduction des espèces domestiques par le transfert d'embryons".Sommet de la Francophonie - Journées Scientifiques, 211 mai, Dakar, pp 89-95.

64- 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.

65-JULIE PAQUIN ET JEAN- FRANÇOIS LAPOINTE: 2003 université de montreal, faculté de medecine vétérinaire (FMV) TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LA VACHE

66- DENIS (J.P.), VALENZA (J.).- 1972. Extériorisation des potentialités du zébu Gobra. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., , 25 (2) : 245

67-U.N.C.E.I.A.- 1984 Services techniques. Compte rendu Xe Congr. Intern. Reprod. Anim. et I.A

68-PIERE OLIVIER LAURIERE 2002: these ETUDE DES FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ LA VACHE CHAROLAISE EN CLIENTELE. faculté de médecine de Créteil.49 /98 **** page verifier page 49 totla : 98

69-ROBERTSON I., NELSON R.E. 1998. Certification and identification of the embryo. – In: Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd ed., Savoy : I.E.T.S., 103-134.

70- ELSDEN (R.P.)- 1980,Bovine embryo transfer. Proc. Soc. Theriogenology, OMANA, NEBRASKA,

71- PICARD (L.)- 1989.Selection d'embryons. In "Mieux maîtriser la reproduction des espèces domestiques par le transfert d'embryons". Sommet de la Francophonie - Journées Scientifiques, 211 mai, Dakar, pp. 56-72.

72- Jean-Sébastien LAIZEAU :2003. These 395 FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ LA VACHE LAITIERE DE RACE MONTBELIARDE

73-INRA-UNCEIA (1990). Blastographie. *Elev. Insem.* **235**, 39 pages

74- FARIN P.W., SLENNING B.D., BRITT J.H. 1999. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro - *Theriogenology* -52 , 659-670

75- FARIN P. W., FARIN C. E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development - *Biol Reprod* - 52 (3), 676-82

76- LINDNER ET AL,1983. Calving outcome following transfer of embryos produced in vitro in different conditions

77-YANG, S., HE, X., HILDEBRABDT, T.B., JEWGENOW, K., GOERITZ, F., TANG, X., ZHOU, Q., W.JI, 2007. Effects of rhFSH dose on ovarian follicular response, oocyte recovery and embryo development in rhesus monkeys. *Theriogenology* 67, 1194-1201

78-GOODHAND, K.L., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J., 2000. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH .. *Anim Reprod Sci* 63, 145-158.

79-CHAUBAL, S.A., FERRE, L.B., MOLINA, J.A., FABER, D.C., BOLS, P.EJ., REZAMAND, P., TIAN, X., YANG, .X., 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU IVP system. *Theriogenology* 67, 719-728.

80-ADEL 2003 : mémoire de magister : étude comparatives de deux extraits hypophysaires dans la production d'embryon chez le bovin 2003, 99

81-DONG-SOO FILS ET ALL, 2007 : Dong-Soo FILS 1), Chang Yong-CHOE 1) , Sang-Rae CHO 1) Sun-Ho Choi 1, Hyun-Jong KIM 1) et les mauvais Hwa Kim Journal de la reproduction et le développement, vol. 53, no 6, 2007, 19045 L'effet de la dose réduite et le nombre de traitements de la FSH sur la réponse superovulation dans le CIDR-traités autochtones coréens Vaches.

82-LOOS, F.A.M.D., M.M. BEVERS, S.J. DIELEMAN, KRUIP, T.A.M., 1991. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology* 35, 537-546

83-DUROCHER, J., MORIN, N., BLONDIN, P., 2006. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response. and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology* 65, 102-115.

84- CHU THI KIEU' OANH : 2009 Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences Animales pour l'obtention du grade de maîtrise e en sciences (m.sc.): analyse globale et quantitative de la réponse génique à la superovulation dans les ovocytes bovins

85-TAKAGI M., KIM I.H., IZADYAR F., HYTTEL P., BEVERS M.M., DIELEMAN S.J., HENDRIKSEN P.J., VOS P.L. 2001, Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH, *Reproduction* 121 941-951.

Listes des figures :

Partie bibliographique

Figure 1 : description des différents traitements de production d'embryon couramment utilisés, (J Saumande La production d'embryon chez les bovins, INRA Prod Anim 1995 :277)

Partie expérimentale

Figure 2 : protocole de traitement de superovulation

Figure 3 : résultat global des embryons transférables et non transférables de la vaches 1 et vache 2

Figure 4 : résultat global de la classification des embryons de la vache 1

Figure 5 : résultat global de la classification des embryons de la vache2

Figure 6 : résultat global de la classification des embryons de la vache 1 et la vache2

Liste des photos :

Partie bibliographique :

Photo 1 : Prélèvement des embryons : Julie Paquin et Jean-François Lapointe 2003

Photo 2 : Filtration des embryons : Julie Paquin et Jean-François Lapointe 2003

Photo 3 : Morula (Ferrouk et al 2007)

Photo 4 : jeune blasto (Ferrouk et al 2007)

Partie expérimentale :

Photo 5 : station expérimentale

Photo 6 : matériel de récolte d'embryons

Photo 7 : microscope inversé

Photo 8 : boîte de Petri quadrillée(1) petite boîte(2), paillettes d'embryon(3), flacon contenant le liquide récolté (mis à décanter) (4), plaque de culture cellulaire 24 puits(5)

Photo 9 : vache 1 placée dans le travail de contention

Photo 10 : prélèvement des embryons

Photo 11 : flacon contenant les liquides de récolte mis à décanter

Photo 12 : blastocyste classe 1 (vache 2)

Photo 13 : Morula classe 1 (vache 2)

Photo 14 : dégénéré (vache 2)

Photo 15 : non fécondé (vache 2)

Photo 16 : l'ensemble des embryons récoltés de la vache 1

Photo 17 : l'ensemble des embryons transférables et non transférables de la vache 2

Liste des Tableaux :

Partie bibliographique

Tableau I: Stades de développement embryonnaire normal et code international correspondant (picard, 1989)

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

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

Partie expérimentale

Tableau IV: protocole du traitement de superovulation utilisé

Tableau V : réaction des ovaires au traitement de superovulation de la vache1 et vache 2

Tableau VI: résultat global des récoltes en fonction de leur qualité chez la vache 1 et vache2

Tableau VII : résultat de la classification des embryons récoltés de la vache 1 et vache2

Tableau VIII : résultat global des embryons non fécondés et dégénérés chez la vache1 et vache2



Université Saâd DAHLEB BLIDA
Faculté des Sciences Agro - Vétérinaires et Biologie
Département des Sciences Vétérinaires



Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du :

Diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème :

**ESSAI DE PRODUCTION D'EMBRYONS BOVINS
UTILISANT DES EXTRAITS HYPOPHYSAIRES EN
INJECTION QUOTIDIENNE**

Présenté par :

KELLOU Radhia & BEHIDJ Nachida

Membres du Jury :

Président :	BELABBAS	M A B
Examineur :	BENBELKACEM	M A B
Promoteur :	ADEL	M A A.

- Promotion 2010 / 2011 -