



551THV-1

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب_البليدة
Université Saad DAHLEB_BLIDA

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme du docteur vétérinaire
Thème ;

* Etude de la réaction des vaches
à un traitement de
Super_ovulation à base de la FSH*

Présenté par : MAMI Mohamed

Le jury :

Président :	Dr. YAHIMI Abdelkrim	M.A.A
Examineur :	Dr. GUERBI Ismail	M.A.A
Promoteur :	Dr. ADEL Djallel	M.A.A

Année universitaire 2011/2012

Remerciements :

Au nom du dieu clément et miséricordieux

Avant tout, je remercie Allah qui a illuminé mon chemin et qui m'a armé du courage et de la patience pour achever mes études.

A monsieur KAIDI qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement monsieur YAHIMI & monsieur GUERBI d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour avoir examiné mon document.

Je remercie monsieur ADEL Djallel qui m'a encadré durant la préparation de ce projet.
Avec tous mes enseignants au prés desquels j'ai trouvé conseils et encouragements tout au long de mon cursus.

Je remercie aussi tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail, particulièrement docteur BENADDA Khaled, docteur MAMI Mohamed, et docteur BELAGOUN Amel pour leurs soutiens tout au long de mon travail.

Je remercie chaleureusement :

Tout le personnel de la station expérimentale, agents de sécurise, techniciens, magasiniers, ouvriers qui m'ont jamais refusé leurs services.

Table des matières.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des photos.....	iv
Liste des tableaux.....	v
Resumes.....	vi
Introduction générale.....	vii

La partie bibliographique

Chapitre 01 : Physiologie ovarienne et développement embryonnaire précoce chez la vache laitière	1
1. L'activité ovarienne chez la vache laitière.....	1
1.1. La folliculogenèse	1
1.2. Le cycle œstral.....	1
1.2.1. Les propriétés du cycle œstral chez la vache.....	1
1.2.1.1. L'œstrus	2
1.2.1.2. Le metœstrus.....	2
1.2.1.3. Le dicestrus.....	2
1.2.1.4. Le proœstrus	2
1.2.2. La phase non gonado-dépendante	2
1.2.3. La phase gonado-dépendante	3
1.2.4. La phase folliculaire et la phase lutéale.....	3
1.2.5. Les vagues folliculaires	4
1.2.5.1. Le recrutement.....	4
1.2.5.2. La sélection.....	5
1.2.5.3. La dominance.....	5
1.2.5.4. L'atrésie folliculaire.....	6
1.2.6. L'ovulation	6
1.2.7. La mise en place du corps jaune.....	6
1.3. Le mécanisme de régulation au cours du cycle.....	7
1.4. Les hormones de la reproduction	8
1.4.1. Les hormones ovariennes	8
1.4.2. Les hormones gonadotropes	9
1.4.3. L'hormone hypothalamique	10
1.5. La prostaglandine F2 alpha	10
2. Développement de l'embryon bovin.....	11
Chapitre 02 : Superovulation, Récolte, congélation, & Transfert Embryonnaire chez la vache laitière.....	13
1.1. La superovulation.....	13
1.2. Les Protocoles de Superovulation.....	14
1.2.1. Traitement I: Protocol de GnRH	15
1.2.2. Traitement II: Protocol d'Œstradiol-17β/ Progestérone.....	15
1.2.3. Traitement III: Protocol de Gonadotrophines.....	16
2.1. La Récolte Embryonnaire.....	17
2.2. Evaluation et processus des embryons	17
3.1. La congélation de l'embryon.....	18

3.2. Les procédures de congélation-dégel	20
3.3. Le transfert direct	21
3.4. La vitrification.....	21
4.1. Le Transfert Embryonnaire	22
4.2. Le bénéfice du Transfert Embryonnaire.....	23
4.3. Technologies des procédures du Transfert Embryonnaire.....	23
4.3.1. La gestion des donneuses	23
4.3.1.1. La sélection des donneuses.....	23
4.3.1.2. La santé de l'animal donneur.....	24
4.3.1.3. L' Alimentation de l'animal donneur	24
4.3.1.4. Le cycle œstral de la donneuse	24
4.3.2. La gestion des receveuses.....	24
4.3.2.1. La sélection des receveuses	24
4.3.2.2. La santé de l'Animal Receveur.....	25
4.3.3. La gestion des donneuses et des receveuses : La detection de l'œstrus ..	25

La partie experimentale

1. Introduction.....	26
2. Matériel	26
2.1. Le lieu, la durée, et les animaux utilisés.....	26
2.2. Le matériel et le médicament utilisés	27
2.2.1. Matériel de contention.....	27
2.2.2. Matériel de suivi des chaleurs	27
2.2.3. Matériel de traitement.....	27
2.2.4. Matériel d'insémination.....	28
2.2.5. Matériel de récolte.....	29
2.2.6. Matériel de recherche des embryons	30
3. Méthode.....	31
3.1. Suivi des chaleurs.....	31
3.2. Le traitement de superovulation, l'insémination, et la récolte	31
4. Résultats.....	33
4.1. La réponse à la superovlation.....	33
4.2. La récolte des embryons.....	34
5. Discussion	37
6. Conclusion.....	39
Recommandation.....	viii
References.....	ix
Annexes.....	x

Liste des abréviations

µm: micromètre

ARN: acide ribonucléique

CIDR: Controlled internal drug releasing device

CJ: corps jaune

E₂: œstradiol

eCG: equine chorionique gonadotrophine

FCS: serum de veau fœtal

FSH: Follicle Stimulating Hormone ou follitropine

g: gramme

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone ou gonadolibérine

hCG: human chorionique gonadotrophine

IA: insemination artificielle

IGF-1 : Insulinlike Growth Factor 1

J: jour

LH: Luteinizing Hormone ou lutropine

M: mole

ml, mL: millilitre

Mm : millimètre

ng: nano gramme

°C: degré Celsius

Liste des abréviations

P₄: progesterone

PBS: phosphate buffered saline

pFSH: porcine Follicle Stimulating Hormone ou follitropine porcine

PGE₂ : prostaglandine E₂

PGF₂: prostaglandine F₂

PGF₂α: prostaglandine F₂α

SOTE: superovulation et transfert embryonnaire

UI: unite Internationale

La partie bibliographique :

<u>Figure 01 :</u> Représentation schématique des besoins en facteurs de croissance et en gonadotrophines, à différents stades de développement du follicule ovarien chez la vache.	3
<u>Figure 02 :</u> Les vagues folliculaires au cours du cycle œstral de la vache.	6
<u>Figure 03 :</u> Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel.	8
<u>Figure 04 :</u> Deux paires d'ovaires bovins superstimulés. Enlevés 7 jours après ovulation.	17
<u>Figure 05 :</u> Un embryon bovin avec environ 16 cellules, comme il va apparaître dans l'utérus d'une vache environ 4 jour après ovulation.	17

La partie expérimentale :

<u>Figure 01 :</u> Matériel de Contention.	27
<u>Figure 02 :</u> Matériel de Suivi des chaleurs.	27
<u>Figure 03 :</u> Matériel du Traitement.	28
<u>Figure 04 :</u> Matériel de l'Insémination.	28
<u>Figure 05 :</u> Matériel de Récolte.	29
<u>Figure 06 :</u> Matériel de Recherche des embryons.	30
<u>Figure 07 :</u> Le schéma des traitements effectués.	32
<u>Figure 08 :</u> Le résultat global de la récolte de la vache 08002.	36
<u>Figure 09 :</u> Classification des embryons transférables de la vache 08002.	37
<u>Figure 10 :</u> Classification des structures non transférables de la vache 08002.	38

Liste des photos

<u>Photo 01</u> ; Le cheptel experimental.	26
<u>Photo 02</u> ; La vaches 08001 prête d'être collectée.	33
<u>Photo 03</u> ; La vache 08001 reçoit une anesthésie épidurale juste avant la collecte.	33
<u>Photo 04</u> ; Dr ADEL entraine de collecter la vache 08001.	33
<u>Photo 05</u> ; Les ovules non fécondés issus de la vaches 08001.	x

La partie bibliographique :

Table 1 : Stades de développent embryonnaire ; reconnu par la société international du transfert embryonnaire18

Table 2 : Les grades de qualité embryonnaire ; reconnu par la société internationale du transfert embryonnaire18

La partie expérimentale :

Tableau 01 : Les dates d'apparition des chaleurs.31

Tableau 02 : La réponse ovarienne à la superovulation des vaches.34

Tableau 03 : La réponse de la vache 08002 au traitement de superovulation.35

Tableau 04 : Le résultat global de la récolte de la vache 08002.35

Tableau 05 : Classification des embryons transférables de la vache 08002.36

Tableau 06 : Classification des structures non transférables de la vache 08002.37

ملخص :

كان الهدف من هذه الدراسة، اختبار نتيجة تخفيض عدد حقن علاج مضاعفة الإباضة بهرمون ختريي يحفز الجريب (pFSH)، على الاستجابة عند بقرات ذات الأصل Holstein. كان ذلك بالمحطة التجريبية بكلية الفلاحة و البيطرة_جامعة البليدة.

ثلاث بقرات خضعت لعلاج مضاعفة الإباضة بتخفيض عدد الحقن.

تلقت البقرات العلاج في وقت محدد (بين اليوم التاسع و اليوم الثاني عشر) من دورة الشبق، أعطيت البقرات ثلاث حقن يومية ثابتة المقدار عن طريق العضلة (50 مغ من الهرمون لكل بقرة)، في اليوم الثالث و تزامنا مع الحقنة الثالثة أعطيت كذلك البقرات حقنة Prostaglandine F₂α مقدار (5 مغ) عن طريق العضلة أيضا.

لقحت البقرات اصطناعيا مرتين على التوالي 48 و 60 ساعة بعد الحقنة الأخيرة.

استخرجت الأجنة بين اليوم السادس و اليوم الثامن بعد التلقيح، عدد كل من الأجسام الصفراء (25 . 13) و الجريبات (5 . 0) الظاهرة قبيل عملية استخراج الأجنة قدرت يدويا باللمس عن طريق المستقيم، العدد الكلي للأجنة (11) ؛ عدد الأجنة القابلة للنقل (06)، قدر عدد الأجنة الميتة (05) و عدد البويضات غير الملقحة (04) و قسمت الأجنة بعد الملاحظة تحت المجهر.

تشير نتيجة هذه الدراسة إلى أن تخفيض عدد كل من الأيام (3 عكس 4)، و عدد الحقن (3 عكس 8) لإحداث إباضة مضاعفة عند الأبقار أعطانا و إن كان مردوداً.

Abstract :

The objective of this study was to investigate the effect of reducing the injection's number of porcine follicle stimulating hormone (pFSH) treatment on superovulatory response in Holstein cows present on the experimental station of the agro-veterinary faculty, Blida's university.

Three cows underwent a superovulatory treatment by reducing the injections' number.

Cows, at precise stage of the estrous cycle (between the 10th and the 12th day), received a gonadotropin treatment. A total dose of 50 mg of pFSH (20 % of LH) was devised in three daily intramuscular constant injections. A prostaglandin F₂α (PGF₂α ; 5 mg) was given in intramuscular with the 3rd injection of pFSH.

The cows were artificially inseminated twice, at 48 and 60 hours after prostaglandin F₂α injection.

The average number of corpora lutea (13.25) and large follicles (0.5) present at the time embryo recovery, as detected manually by rectal palpation. The embryos were recovered 6 or 8 days after the insemination, then they were observed under a microscope in order to classify later. The number of embryos (11), transferable embryos (06), degenerate embryos (05), and unfertilized ova (04) was estimated.

These data indicate that a reduced number of days (3 versus 4) and number of injections (3 versus 8) of pFSH for bovine superovulation we give as an embryo yield.

Key words :

Cows, Superovulation, injection's number, porcine Follicle Stimulating Hormone (pFSH), embryo recovery, embryos.

Résumé :

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet de la réduction du nombre d'injections d'un traitement de superovulation par la pFSH sur la réponse superovulatoire chez des vaches de races Holstein au niveau de la station expérimentale de la faculté agro vétérinaire et biologie de l'université de Blida.

Trois vaches ont subi un traitement de superovulation en réduisant le nombre d'injections.

Les vaches, dans un moment précis du cycle œstral (entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour), ont reçu une dose totale de 50 mg de la pFSH (avec un rapport de 20 % de LH) divisée en trois injections quotidiennes et constantes en intramusculaire. Une prostaglandine F₂α (PGF₂α ; 5 mg) a été administrée encore en intramusculaire au même temps avec la troisième injection de la pFSH.

Les vaches ont été inséminées artificiellement deux fois, 48 et 60 heures après l'injection de la PGF₂α.

Le nombre moyen des corps jaunes (13.25) et des follicules (0.5) présents juste avant la collecte a été estimé manuellement par palpation transrectale. Les embryons ont été récoltés 6 ou 8 jours après l'insémination, puis ils ont été observés sous un microscope pour les classer ensuite. Le nombre des embryons récoltés (11), des embryons transférables (06), des embryons dégénérés (05) et des ovules non fécondés (04) a été estimé.

Le résultat de cette étude indique que la réduction du nombre des jours (3 versus 4) et du nombre d'injections (3 versus 8) de la pFSH pour la superovulation bovine nous donne comme même un rendement embryonnaire.

Mots clés :

Vaches, Superovulation, Nombre d'injections, Follicule stimulation hormone porcine (pFSH), Récolte, Embryons.

Introduction générale :

Les traitements de superovulation consistent en l'administration des gonadotrophines et des agents lutéolytiques. Deux types de gonadotrophines ont été utilisées pour induire la superovulation bovine : La FSH et la eCG. À cause de sa longue demi-vie biologique, une injection unique de la eCG (2500 UI) est suffisante pour induire une stimulation ovarienne continue, des follicules non ovulatoires, et un profil endocrinien anormal qui en résultent la diminution de la qualité embryonnaire (Mikél et al., 1982, Lopes et al., 2001). Au contraire, due à sa courte demi-vie biologique (5 heures ou moins), la FSH est usuellement utilisée en multiples injections ; 8 à 10 fois en biquotidien pendant 4 à 5 jours à une dose totale de 28 à 50 mg (Looney et al., 1981, Mapletoft et al., 2002). Quelques études précédentes sur la superovulation utilisant la FSH ont donné plus d'embryons transférables comparées à la eCG (Lopes et al., 2001, Monniaux et al., 1983, Elsdén et al., 1978). Quoique les multiples injections de la FSH qui demandent plus de main-d'œuvre, plus de frais, et stressantes pour les animaux donneurs peuvent produire plus d'embryons viables.

Pour éviter la gêne due aux multiples injections de la FSH, diverses études ont essayé de diminuer le nombre d'injections de la FSH. L'efficacité de la superovulation en utilisant une injection unique comparée avec des injections multiples de la FSH est controversée et produit des résultats moins efficaces selon Kelly et al. (1997) et Callejas et al. (2002), ou similaires selon Bo et al. (1994) et Sugano et Shinogi, (1999), néanmoins, la production des embryons transférables a été réduite. Autres études ont réduit le nombre des injections sans qu'il y ait eu de diminution du rendement des embryons sont justifiées. Dans cette étude l'objectif est de vérifier l'effet du nombre d'injections de la FSH sur la réponse superovulatoire.

La partie

bibliographique ;

Chapitre 01 : Physiologie ovarienne et développement embryonnaire précoce chez la vache laitière :

1. L'activité ovarienne chez la vache laitière :

1.1. La folliculogénèse :

La folliculogénèse désigne l'ensemble du développement du follicule, depuis le moment où il quitte le pool de follicules primordiaux, jusqu'à l'ovulation ou l'atresie (**Picard-Hagen et al., 2008a**). Au cours de cette phase, seuls 80 follicules primordiaux par jour (soit 10 % des follicules primordiaux) quittent la réserve folliculaire pour continuer leur croissance pendant 5 mois (**Picard-Hagen et al., 2008, Chastan-Maillard et al., 2003**).

La première étape de la croissance folliculaire est constituée de la croissance concomitante du follicule et de l'ovocyte qu'il renferme et de la différenciation du follicule. Le follicule primordial mesurant 40 µm de diamètre, se transforme en follicule primaire mesurant 60 à 80 µm de diamètre, contenant un ovocyte entouré d'une zone pellucide constituée d'une couche régulière de cellules cubiques, puis en follicule secondaire, d'une taille de 200 à 400 µm et entouré d'une zone pellucide bien différenciée, et de deux ou trois couches de cellules cubique formant la granulosa. Vient ensuite le stade du follicule tertiaire, dit cavitaire ou antral, d'une taille de 3 à 4 mm, caractérisé par l'apparition d'une cavité appelée antrum. On dénombre 25 à 50 follicules antraux de manière constante chez la vache. Le stade suivant, stade du follicule mûr, follicule de De Graaf, ou follicule pré-ovulatoire constitue la dernière phase du développement folliculaire. Le follicule mûr mesure une taille maximale de 25 mm de diamètre chez la vache, est gonflé de liquide et fait saillie à la surface de l'ovaire (**Hanzen et al., 2000**).

La fin de la phase de croissance folliculaire est la phase de maturation. Elle concerne surtout l'ovocyte. Suite au pic de LH pré-ovulatoire, et lorsque l'ovocyte a atteint 80% de sa taille finale, ont lieu la maturation nucléaire et la reprise de la méiose avec émission du premier globule polaire dans l'espace péri-vitellin. L'ovocyte I se transforme alors en ovocyte II. Les maturations cytoplasmique et membranaire lui permettent ensuite d'être fécondable (**Hanzen et al., 2000**).

1.2. Le cycle œstral :

Le cycle œstral correspond à l'ensemble des modifications ovarienne, génitales et comportementales, qui se succèdent du début d'un œstrus (période d'expression du comportement sexuel, appelée aussi « chaleurs ») au début de l'œstrus suivant (**Bonnes et al., 2005**).

1.2.1. Les propriétés du cycle œstral chez la vache :

La vache est une espèce polyœstrienne continue à ovulation spontanée. Les cycles se succèdent tant qu'une gestation n'a pas lieu et ceci quelle que soit la période de l'année (**Derivaux 1971**). La durée du cycle œstral est de 21 jours en moyenne. Elle est la plupart du temps comprise entre 17 et 25 jours (**Stevenson 2007**). 85% des femelles ont une durée de

cycle comprise entre 18 et 24 jours (**Bruyas 1991**). La durée du cycle œstral est en général plus courte de un à deux jours chez les génisses par rapport aux vaches (**Nebel 2003; Stevenson 2007**).

Le cycle œstral est classiquement divisé en deux phases (phases folliculaire et lutéale) ou quatre phases distinctes (**Ball et Peters 2004; Stevenson 2007**) :

1.2.1.1. L'œstrus (J0) :

Cette phase est caractérisée par la réceptivité sexuelle de la vache qui accepte le chevauchement par un taureau ou une autre vache du troupeau. Pendant l'œstrus, le follicule continue sa croissance et se prépare à ovuler (**Stevenson 2007**).

1.2.1.2. Le metœstrus (J1 à J3) :

Le follicule finit sa maturation puis l'ovulation a lieu. Il y a formation du jeune corps jaune qui commence à sécréter de la progestérone (**Stevenson 2007**).

1.2.1.3. Le dioœstrus (J4 à J18) :

Le corps jaune sécrète alors des concentrations significatives de progestérone. Le dioœstrus se termine lorsque la lutéolyse débute (**Stevenson 2007**).

1.2.1.4. Le proœstrus (J19 à J21) :

Cette phase de préparation à l'œstrus est caractérisée par la chute du taux de progestérone et par l'émergence d'un nouveau follicule dominant (**Stevenson 2007**).

L'œstrus est donc une période relativement courte par rapport à la durée du cycle œstral ce qui en rend la détection difficile. La durée de l'œstrus classiquement admise est de 12 à 18 heures mais de grandes variations d'expression et de durée sont possibles en fonction des individus (**Stevenson 2007**).

1.2.2. La phase non gonado-dépendante :

La croissance folliculaire débute par l'activation d'un groupe de follicules primordiaux. Les follicules de petites tailles (inférieur à 3 à 4 mm de diamètre) sont capables de se développer en absence d'hormone gonadotropes (**Picard-Hagen et al., 2008**).

Le développement et l'atréxie des plus petits follicules en croissance sont peu dépendants des variations des hormones considérées au cours d'un cycle, en raison de leurs faibles besoins en ces hormones.

La croissance folliculaire pendant cette période se traduit par l'augmentation de la taille de l'ovocyte, par la prolifération des cellules de la thèque et de la granulosa.

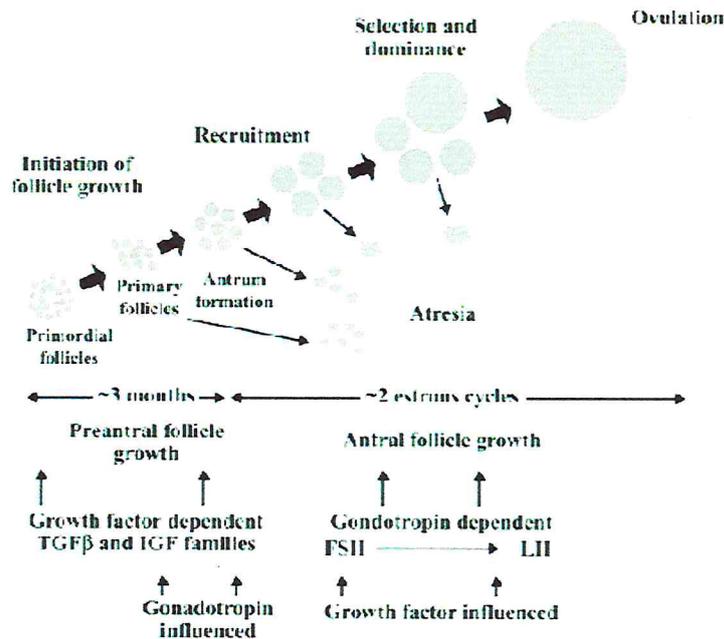


Figure 1 : Représentation schématique des besoins en facteurs de croissance et en gonadotrophines, à différents stades de développement du follicule ovarien chez la vache.
Source : Webb et al. (2004).

1.2.3. La phase gonado-dépendante :

La phase de croissance terminale, qui conduit le follicule antral à l'ovulation, est plus courte que la précédente. La croissance folliculaire est accélérée, c'est la raison pour laquelle on parle de vagues folliculaires. Cette seconde phase se caractérise par la différenciation des cellules de la thèque et de la granulosa, responsables de la synthèse des stéroïdes. Cette phase finale est également essentielle pour que l'ovocyte acquière sa capacité à être fécondé (phase de maturation).

La croissance folliculaire est le résultat d'interactions complexes entre les hormones gonadotropes d'origine hypophysaire, des substances polypeptidiques présentes dans le follicule et des facteurs de croissance (Huyart, 2004). Parmi les facteurs de croissance figure l'IGF-1. C'est un puissant inducteur de la prolifération des cellules de la granulosa chez le bovin. Il est par conséquent un puissant stimulant de la croissance folliculaire. Il agit en amplifiant l'effet des gonadotrophines sur le follicule (Monget et al., 2002).

1.2.4. La phase folliculaire et la phase lutéale :

Chaque cycle est composé de deux phases : la phase folliculaire et la phase lutéale.

La phase folliculaire, commençant lors de la lutéolyse (destruction du corps jaune), aboutit à l'ovulation. Le premier jour d'expression du comportement des chaleurs suit la lutéolyse et précède l'ovulation. Il est considéré comme le premier jour du cycle œstral.

L'ovulation correspond à la rupture de la paroi du follicule dominant au niveau du stigma et l'émission d'un ovocyte fécondable (après maturation). Elle se produit suite à une augmentation de la vascularisation ovarienne et à des phénomènes de dissociation des fibres de collagène de la thèque, nécrose et contraction des fibres musculaires lisses de la thèque

interne (Mialot et al., 2001). Ces phénomènes sont médiés par l'intermédiaire de facteurs de l'inflammation et des prostaglandines PGE2 et PGF2 (Fieni et al., 1995, Thibault et Levasseur, 1991).

Très peu de follicules primordiaux arrivent au stade d'ovulation : 99,9% subissent l'atrésie au cours des différentes étapes de la croissance folliculaire (Chastant-Maillard, 2003).

Suite à l'ovulation, le follicule rompu se vascularise rapidement pour se transformer en corps jaune, marquant le début de la phase lutéale. Celui-ci est formé de petites cellules, issues de la thèque interne, et des grandes cellules, issues de la granulosa. Le corps jaune croît pendant 9 jours jusqu'à la taille de 20 mm de diamètre, se maintient à cette taille puis régresse en quelques jours à partir du 16^{ème} ou 17^{ème} jour du cycle (en l'absence de gestation) (Picard-Hagen et al., 2008).

1.2.5. Les vagues folliculaires :

Les derniers stades de la croissance folliculaire sont caractérisés par l'émergence coordonnée de groupes de plusieurs follicules antraux. Ce phénomène est appelé vague folliculaire.

La majorité des vaches présente de 2 à 3 vagues folliculaires durant un cycle (Binelli et al., 2001), le follicule ovulatoire provenant de la dernière. La durée d'une vague est comprise entre 7 et 10 jours selon le nombre de vagues dans un cycle (Picard-Hagen et al., 2008). L'émergence des vagues est observée à J1 et J9 à 10 du cycle pour les cycles à 2 vagues, alors qu'elle se fait à J1, J8 à 9 et J16 pour les cycles à 3 vagues (Ennuyer, 2000, cité par Huyart, 2004). Les différences du nombre de vagues par cycle expliquent la variation de la longueur du cycle, de 18 à 21 jours pour des cycles à 2 vagues, de 21 à 25 jours pour des cycles à 3 vagues (Picard-Hagen et al., 2008).

Le phénomène de vagues folliculaires, depuis la croissance folliculaire d'un groupe de follicules sous l'influence des gonadotrophines jusqu'à l'émergence d'un seul follicule ovulatoire, est communément décrit par les concepts de recrutement, sélection et dominance.

1.2.5.1. Le recrutement :

Le recrutement correspond à l'entrée en croissance terminale de plusieurs follicules de diamètre supérieur ou égal à 4 mm chez la vache (Drion et al., 1996). Le follicule est alors gonado-dépendant, c'est-à-dire qu'il a dépassé le stade auquel la plupart des follicules deviennent atrétiques. Cette étape ne concerne qu'un groupe d'une quinzaine de follicules.

Les follicules sont recrutés selon un mécanisme aléatoire parmi ceux ayant atteint la bonne taille à ce moment. Tous les follicules recrutés sont aptes à ovuler (Driancourt et al., 1991). Le recrutement est provoqué par une montée transitoire du niveau de FSH de 1 à 2 jours (Ponsart, 2003). La FSH se fixe sur les récepteurs des cellules de la granulosa, stimule l'aromatation des androgènes produits par les cellules thécales en œstrogènes et induit la formation de récepteurs à LH. En synergie avec la FSH, les œstrogènes sécrétés provoquent la croissance des follicules et le développement de leur cavité antrale (Ennuyer, 2000, cité par Huyart, 2004).

1.2.5.2. La sélection :

La croissance des follicules pendant la phase de recrutement s'accompagne d'une élévation de la production folliculaire d'œstradiol et d'inhibine. L'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif, se traduisant par une augmentation de la fréquence des pulses de LH ; alors qu'il exerce également concomitamment un rétrocontrôle négatif sur la production de FSH (Picard-Hagen et al., 2008).

La sélection est l'émergence parmi les follicules recrutés du follicule ovulatoire. Elle est le résultat de la diminution de la concentration de FSH due à la croissance du groupe de follicules recrutés, à un niveau inférieur à celui induisant le recrutement. Lorsqu'un follicule a acquis un nombre suffisant de récepteurs à LH pour lui permettre de survivre à de faibles taux de FSH, il sécrète de grandes quantités d'œstrogènes et continue à croître en raison de l'augmentation de sa propre sensibilité à la FSH et à la LH. Il croit également avec la production de facteurs de croissance locaux, en particulier l'IGF-1. 2 à 3 follicules parmi les 15 sont alors sélectionnés. Le follicule dominant sera celui qui acquiert le plus précocement des récepteurs à la LH.

Pour les follicules non sélectionnés, la sécrétion insuffisante de FSH ne permet plus leur croissance. Lorsque la concentration de FSH atteint un niveau inférieur à celle ayant provoqué le recrutement, les follicules rentrent en atrophie, à l'exception du ou des follicules sélectionnés. L'atrophie ou involution folliculaire constitue le devenir de la majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères (Drion et al., 1996).

L'administration de FSH exogène s'oppose à ce processus. Un tel traitement est donc utile pour induire la croissance d'une quantité de follicules plus importante, et c'est notamment le cas pour les traitements de superovulation.

1.2.5.3. La dominance :

La dominance est l'étape ultime dans le processus de croissance folliculaire. Elle est associée à l'amorce de la régression des autres follicules recrutés et au blocage du recrutement de nouveaux follicules (Driancourt et al., 1991). Seul un follicule va acquérir les moyens de se développer dans un milieu pauvre en FSH. Il provoque l'atrophie des autres follicules 2 à 4 jours après le début de la vague folliculaire (Huyart, 2004).

A cette période, le follicule est caractérisé par une taille plus importante pouvant atteindre jusqu'à 15 mm avant ovulation. Les récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa se multiplient.

La LH assure la maturation du follicule dominant, dont l'avenir dépend de la fréquence des décharges de LH, régulée par la GnRH. Lorsqu'un corps jaune (CJ) est présent, la fréquence d'une décharge de LH toutes les 3 à 4 heures provoque l'atrophie du follicule dominant (et par suite, l'absence d'ovulation et d'œstrus). Une nouvelle vague folliculaire a lieu, également précédée d'une augmentation transitoire de FSH. Lorsque la fréquence est d'un pic par heure, l'ovulation peut avoir lieu. Cette fréquence n'est atteinte que lors de la levée de l'inhibition de la progestérone sur la production de GnRH, à la suite de la lutéolyse. Le devenir du follicule dépend finalement de la présence ou non d'un corps jaune.

1.2.5.4. L'atrésie folliculaire :

L'atrésie folliculaire désigne le processus biologique de dégénérescence subi par une grande majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères (Drion et al., 1996), les follicules dégénérés disparaissant alors dans le stroma ovarien (Picard-Hagen et al., 2008). 99 % des follicules qui entrent en croissance dégèrent (Monniaux et al., 1999). L'atrésie est sous le contrôle d'un mécanisme de mort cellulaire programmée, appelé apoptose. Pour les stades antraux, l'atrésie est souvent entraînée lors de la sélection, par une réduction de la FSH, secondaire aux sécrétions d'œstradiol et d'inhibine par le follicule dominant (Huyart, 2004). Seul le follicule de la dernière vague échappe à l'atrésie.

1.2.6. L'ovulation :

L'ovulation dépend du développement d'un follicule dominant, produisant suffisamment d'œstradiol pour induire un pic de LH (Ferguson, 2005). Le follicule dominant émerge en réponse à une augmentation de la teneur plasmatique en LH, ainsi qu'à une hausse de la fréquence des pulses de LH.

L'ovulation correspond à la libération d'un ou plusieurs ovocytes fécondables après rupture du ou des follicules pré-ovulatoires. Elle survient suite à l'émission du second globule polaire. L'expulsion de l'ovocyte est suivie d'une reprise de la méiose. La seconde division n'a lieu que si l'ovocyte est fécondé. En l'absence de fécondation, ce dernier dégère.

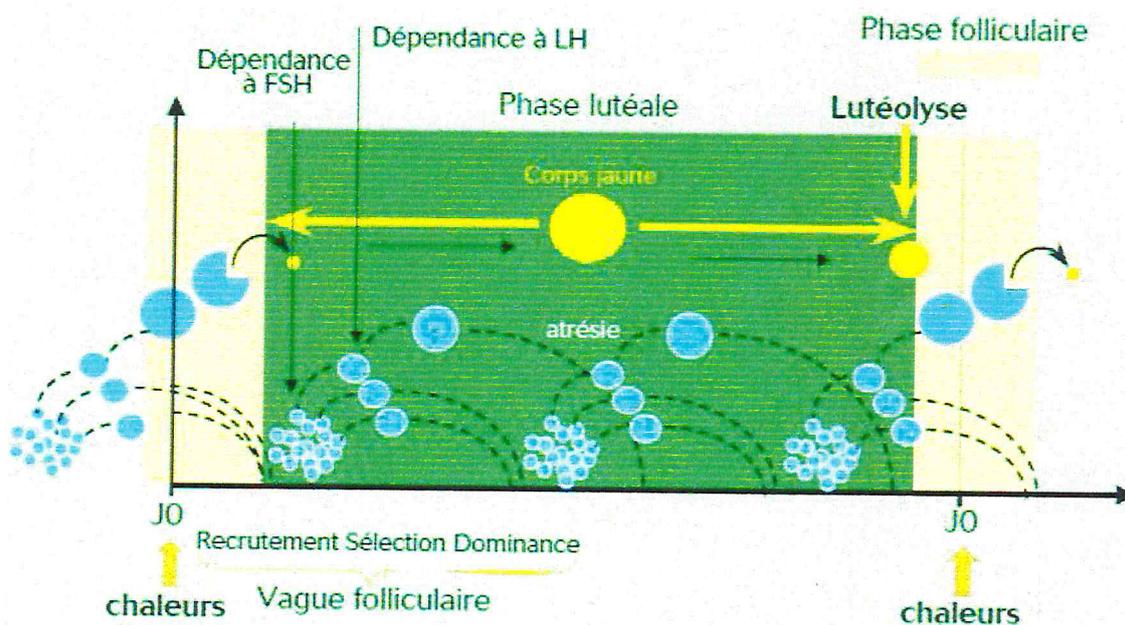


Figure 2 : Les vagues folliculaires au cours du cycle œstral de la vache (Chastant-Maillard., 2005)

1.2.7. La mise en place du corps jaune :

La mise en place progressive d'un corps jaune fonctionnel dans les 5 à 6 jours qui suivent l'ovulation repose sur d'importants remaniements morphologiques. Cela s'accompagne d'une augmentation importante de la progestéronémie, associée à une augmentation du diamètre du

corps jaune. La croissance du corps jaune se poursuit dans les jours suivants : les niveaux de progestérone sont les plus hauts entre le 10 et le 14^{ème} jour. En l'absence de fécondation, environ 16 à 17 jours après l'ovulation, le corps jaune régresse sur le plan morphologique et fonctionnel. La régression fonctionnelle est un phénomène rapide alors que les changements morphologiques sont plus longs.

La sécrétion de progestérone est bien corrélée à la taille du corps jaune. Cette dernière est dépendante de la taille du follicule qui a ovulé (Vasconcelos et al., 2001, cités par Picard Hagen et al., 2008). Augmenter la taille des follicules pourrait donc permettre d'augmenter la production de progestérone.

Le bon déroulement de la croissance folliculaire conditionne la qualité du corps jaune et donc le maintien de la gestation.

1.3. Le mécanisme de régulation au cours du cycle :

La régulation du cycle œstral implique de nombreux acteurs interagissant entre eux, notamment des hormones, dont nous allons citer brièvement l'origine et le rôle, avant de détailler plus précisément chaque phase du cycle dans les paragraphes suivants.

La gonadolibérine (GnRH) est libérée de manière pulsatile par l'hypothalamus, et agit sur l'hypophyse en induisant la libération de follitropine ou hormone folliculostimulante (FSH), et de lutropine ou hormone lutéinisante (LH). La FSH stimule la croissance folliculaire. La LH est, comme la GnRH, libérée de manière pulsatile, et agit sur la fin de la croissance folliculaire, l'ovulation et la formation du corps jaune.

Les follicules de grande taille produisent des œstrogènes, qui exercent un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus, stimulant la libération de FSH et au-delà d'un certain seuil, de LH. L'inhibine est également produite par les follicules. Accompagnée d'une forte sécrétion d'œstrogènes en phases de sélection et dominance, elle exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, inhibant la libération de FSH. Le corps jaune produit de la progestérone, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus, inhibant la croissance folliculaire. La prostaglandine F2 α (PGF2 α) est produite par l'utérus et provoque la régression du corps jaune (Picard-Hagen et al., 2005). La figure 3 représente schématiquement l'action des différentes hormones précédemment citées.

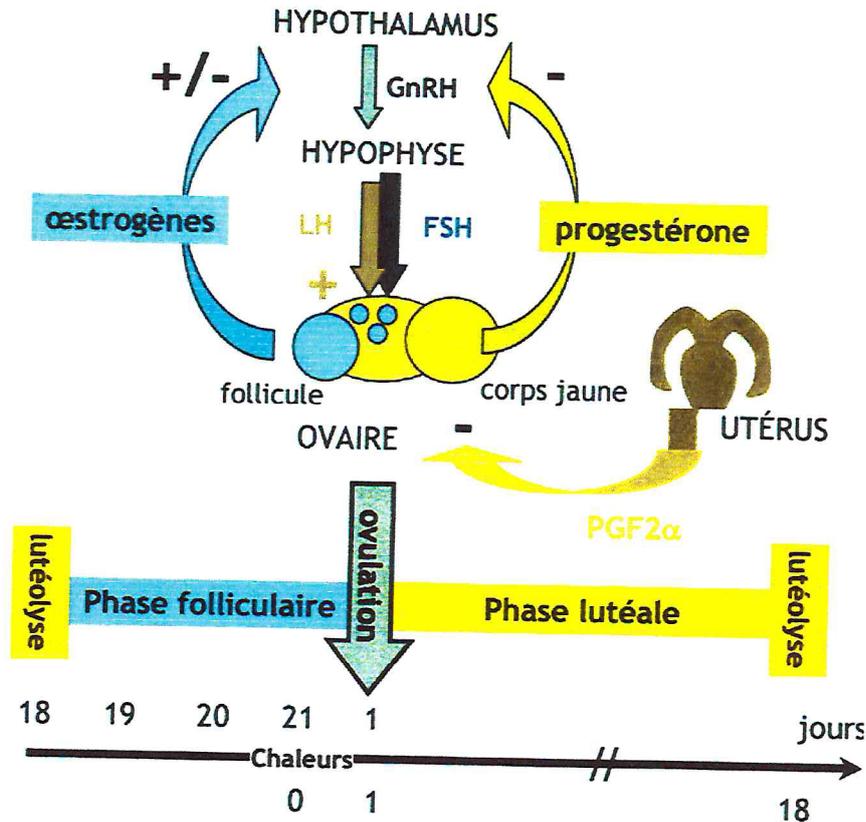


Figure 3 : Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel.
Source : UNCEIA Groupe Fertilité Femelle (2006).

1.4. Les hormones de la reproduction:
1.4.1. Les hormones ovariennes :

Les hormones ovariennes femelles sont des hormones stéroïdes, c'est-à-dire issues du cholestérol : les œstrogènes et la progestérone. Leur sécrétion est en corrélation étroite avec la phase du cycle (Derivaux 1971).

Chez la vache, les œstrogènes forment un groupe de substance de constitution chimique variée dont les principaux représentants sont l'œstrone et l'œstradiol 17 β. Les œstrogènes sont sécrétés par les cellules de la thèque interne et de la granulosa du ou des follicules en maturation. L'œstrogénémie est donc très faible en phase lutéale (3 à 4 pg/mL) puis augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic 24 heures avant l'ovulation (15 à 20 pg/mL). Les œstrogènes, en particulier l'œstradiol 17 β, induisent alors les comportements d'œstrus par leur action sur l'hypothalamus en l'absence relative de progestérone (Bruyas 1991).

Lors de la période lutéale, les cellules formant le corps jaune sécrètent essentiellement de la Progestérone. La progestéronémie est ainsi très faible lors de la phase folliculaire (0,5 à 1ng/mL) puis s'élève progressivement les jours suivants jusqu'à atteindre un plateau lorsque le corps jaune est formé (6 à 7 ng/mL). Ce plateau se maintient jusqu'à la lutéolyse. La progestéronémie est donc le reflet précis du fonctionnement du corps jaune (Allrich 1994).

1.4.2. Les hormones gonadotropes :

Les hormones gonadotropes sont sécrétées par l'hypophyse et sont au nombre de 2 :

_ La FSH (Follicle Stimulating Hormone) ou follitropine.

_ La LH (Luteinizing Hormone) ou lutropine.

Ces 2 hormones sont synthétisées par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, stockées dans des vésicules cytoplasmiques puis relarguées dans la circulation générale par exocytose. Selon le rythme de relargage, elles sont animées d'une sécrétion de base à caractère pulsatile dite « tonique » de faible fréquence, puis 24 heures avant l'ovulation, d'une décharge importante de courte durée dite décharge « cyclique » ou décharge ovulante, à caractère pulsatile mais de haute fréquence (Fieni et al., 1995).

Les activités biologiques de la LH et de la FSH sont fortement liées, les deux hormones agissant simultanément ou l'une d'elle préparant le terrain pour l'action de l'autre.

_ La FSH provoque, en synergie avec une sécrétion basale de LH, le recrutement des follicules, assure le démarrage de leur croissance et stimule la sécrétion d'œstrogènes folliculaires. En effet, au cours de la maturation folliculaire, les cellules de la granulosa acquièrent des récepteurs spécifiques à la FSH. Les follicules deviennent alors gonadodépendants lorsque leur taille est de 5 à 6 mm. Chez la vache, on n'observe pas d'augmentation de sécrétion de la FSH lors de la période de recrutement. Il semble donc que l'amplification de l'action de la FSH soit due à des facteurs locaux comme l'IGF1 (Insulinlike Growth Factor 1) qui s'accumule dans le liquide folliculaire (Pin 1999).

Au niveau des cellules de la granulosa, la FSH possède 2 rôles biologiques :

_ Elle stimule l'aromatisation des androgènes (delta 4-androstènedione et testostérone), provenant des cellules de la thèque interne, en œstrogènes (œstrone et œstradiol respectivement). Les œstrogènes en synergie avec la FSH stimulent la multiplication des cellules de la granulosa et participent donc à la croissance du follicule et au développement de la cavité antrale.

_ Elle induit l'apparition de récepteurs à la LH sur les membranes cellulaires.

_ La LH dont l'action a été préparée par la FSH (via les récepteurs à LH) possède elle aussi plusieurs rôles :

_ Elle assure la fin de croissance et la maturation folliculaire lorsque la taille du follicule dépasse 8-10 mm (par stimulation de la synthèse d'œstrogènes)

_ Elle provoque l'ovulation grâce au pic préovulatoire.

_ Elle assure la reprise de la méiose de l'ovocyte, la formation du corps jaune et la sécrétion de progestérone par les cellules lutéales.

La LH est par ailleurs responsable du phénomène de dominance. En effet, son action sur les récepteurs des cellules de la granulosa provoque une réduction de l'aromatisation des androgènes en œstrogènes (par diminution de l'activité de la 17 à 20 lyase et de la 17 α hydroxylase) et induit la synthèse de progestérone par les cellules de la granulosa (progestérone qui possède aussi un effet inhibiteur sur la production d'œstradiol 17 β) (Chastant-Maillard et al., 2005).

1.4.3. L'hormone hypothalamique :

Il existe une seule hormone hypothalamique responsable de la sécrétion de FSH et de LH : la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) ou gonadolibérine (Fieni et al., 1995).

Cette hormone est un décapeptide synthétisé dans les corps des neurones hypothalamiques puis transportée par voie axonique jusqu'aux capillaires du système porte hypothalamohypophysaire. Elle rejoint ainsi les cellules adénohypophysaires où elle se fixe sur des récepteurs membranaires spécifiques (Fieni et al., 1995).

La sécrétion de GnRH est aussi pulsatile mais l'origine de cette pulsatilité est discutée.

L'hypothèse de 2 centres hypothalamiques, le centre « tonique » et le centre « cyclique » est remise en cause. En effet, les neurones sécréteurs de GnRH sont répartis uniformément dans l'hypothalamus médiobasal. Ils sont tous animés du même type de sécrétion pulsatile qui, lorsqu'elle n'est pas synchronisée entre l'ensemble des neurones, est responsable de la décharge basale (ou décharge tonique). Mais lorsque l'activité pulsatile de tous les neurones se synchronise, elle aboutit à une décharge pulsatile de grande fréquence et de grande amplitude. Cette synchronisation est due à un grand nombre de facteurs, dont les rôles ne sont pas encore déterminés, tels que :

_ Certains neurones en connexion étroite avec les neurones à GnRH : des neurones à dopamine, sérotonine, opiacés et noradrénaline. Une sécrétion pulsatile de noradrénaline synchrone de celle de GnRH a ainsi été mise en évidence.

_ Des stimuli sensoriels notamment lumineux. La photopériode est ainsi le synchronisateur le plus puissant chez les petits ruminants et ceci grâce à la synthèse de mélatonine par la glande pinéale ou épiphyse. Cette hormone est en effet sécrétée uniquement la nuit et constitue donc le signal hormonal traduisant la durée du jour. Dans l'espèce bovine, il a été mis en évidence une corrélation positive entre longueur du jour et fertilité (Fieni et al., 1995).

Par ailleurs, d'autres phénomènes externes interfèrent avec la sécrétion hypothalamique. Le stimulus nerveux de la tétée ou celui de la traite par exemple provoquent en début de postpartum une inhibition de la sécrétion de GnRH (Fieni et al., 1995).

La GnRH agit sur la sécrétion de FSH et de LH de deux manières :

_ Elle entraîne une libération rapide et transitoire des deux gonadotrophines. Cependant, la sécrétion de FSH n'est pas exclusivement dépendante de la GnRH et, lors de l'immunoneutralisation passive de GnRH, seule la pulsatilité de la LH est supprimée. La GnRH ne serait donc nécessaire que pour maintenir un taux plasmatique élevé de FSH.

_ Elle stimule à long terme leur sécrétion. Cette action est due à la fixation de la GnRH sur des récepteurs membranaires glycoprotéiques des cellules de l'hypophyse.

1.5. La prostaglandine F2 alpha :

Il existe un grand nombre de prostaglandines mais c'est la prostaglandine F2 alpha qui entre dans la régulation du cycle sexuel chez la vache. Cette « hormone » est sécrétée par l'utérus à la fin de la phase lutéale lorsque l'animal n'est pas « gestant » et provoque la lyse du corps jaune. Elle induit donc l'arrêt de sécrétion de progestérone (BRUYAS 1991).

2. Développement de l'embryon bovin :

L'ovogenèse est le processus de développement d'un ovocyte ou d'un œuf par accumulation des populations d'ARN maternel et des protéines (Teleford & Schultz, 1990; De Sousa et al., 1998). Les follicules renferment des ovocytes qui sont bloqués au stade diploptène de la prophase I de la méiose (De Sousa et al., 1998). La décharge pré ovulatoire de la LH et la libération de l'ovocyte par le follicule vont permettre de reprendre la méiose (Avery et al., 1998; De Sousa et al., 1998). Le début de la croissance folliculaire est caractérisée par la rupture de la vésicule entraînant le processus de la méiose de métaphase I à métaphase II (Shea, 1981; Avery et al., 1998). Une fois le premier globule polaire expulsé, les ovocytes vont rester dans un stade statique jusqu'à la fécondation (Shea, 1981; Avery et al., 1998). La taille du follicule détermine sa compétence et sa capacité à reprendre la méiose (Avery et al., 1998), chez les bovins laitiers elle se situe autour de 110 µm de diamètre pour l'ovocyte et 2 mm pour le follicule (Avery et al., 1998). La folliculogenèse est caractérisée par une augmentation du diamètre du gamète vers à peu près 30 µm dans le follicule primordial jusqu'à 120 µm dans le follicule tertiaire (De Sousa et al., 1998). La fécondation est caractérisée par la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte (Teleford & Schultz, 1990). L'embryogenèse est définie comme une croissance de l'ovocyte fécondé (Teleford & Schultz, 1990).

La taille moyenne de l'embryon bovin est entre 150 et 190 µm avec une épaisseur de 12 à 15 µm pour la zone pellucide (Lindner & Wright, 1983). Les trois premiers cycles cellulaires se développent avec un type constant de synthèse protéique (Crosby et al., 1988; Teleford & Schultz, 1990). Jusqu'au stade blastocyste, l'embryon n'est pas d'une grande taille; toutefois, les cellules se multiplient de deux à 16 cellules par clivage (Lindner & Wright, 1983). Le stade de deux cellules a la forme d'un axe de divisions qui sont arrangées dans des angles droits des unes par rapport aux autres (Hamilton & Laing, 1946). Un embryon à quatre cellules contient des blastomères qui sont arrangées en paires qui se ressemblent à la figure de croix (Hamilton & Laing, 1946). Les embryons à huit cellules sont arrangées sous forme de sphères en moule, uniformes en taille, et les blastomères sont étroitement groupées (Hamilton & Laing, 1946). Le spermatozoïde peut aussi encore être visible dans la zone pellucide (Hamilton & Laing, 1946). Une morula, embryon de 5 jours, est constituée de 16 à 32 cellules (Shea, 1981; Lindner & Wright, 1983) se présentant sous la forme d'une sphère (Lindner & Wright, 1983). Les embryons de 16 cellules ont des blastomères placées centralement ayant ses propres noyaux, et qui sont entourées d'autres cellules (Hamilton & Laing, 1946). Les blastomères sont aisément identifiables. La masse cellulaire de l'embryon occupe 60 à 70% de l'espace péri vitellin (Hamilton & Laing, 1946; Lindner & Wright, 1983). La morula est compactée au 6^{ème} jour et elle est caractérisée par des blastomères étroitement collées les unes aux autres formant ainsi une masse compacte (Shea, 1981; Lindner & Wright, 1983). Au 7^{ème} jour l'embryon se développe en un jeune blastocyste (Lindner & Wright, 1983). Les embryons jeunes blastocystes ont une couche extérieure de trophoblaste prononcée avec une masse cellulaire innée proéminente et compacte (Hamilton & Laing, 1946; Chang, 1952; Shea, 1981; Lindner & Wright, 1983). Tandis que le blastocœle s'allonge, les cellules innées se déplaceront vers un côté de l'embryon (Shea, 1981). La taille d'un jeune blastocyste est environ 172 µm de diamètre

(Chang, 1952). Le jeune blastocyste va se développer en un blastocyste, qui est caractérisé par une différenciation prononcée du trophoblaste extérieur et de l'étranglement de la masse cellulaire innée compacte (Chang, 1952; Lindner & Wright, 1983). Les cellules allongées et aplaties se présentent sous forme de cellules trophoblastiques (Chang, 1952; Shea, 1981), elles sont réparties en tranches fines le long de la zone pellucide (Hamilton & Laing, 1946). Au 8^{ème} jour l'embryon se développe en un blastocyste, ou il commence à augmenter de taille (1.2 à 1.5 fois sa taille originale) (Lindner & Wright, 1983). Les cellules embryonnaires au 10^{ème} jour, commencent à se différencier on a donc des cellules endodermes, des cellules ectodermes, des cellules mésodermes, et la zone pellucide a disparu (Chang, 1952). Les embryons sont collectés au 7^{ème} jour suivant l'œstrus quand l'embryon devrait être considéré comme une morula tardive ou jeune blastocyste (Shea, 1981). Selon des résultats d'une étude faite par Shea en 1982, 57% des embryons collectés au 7^{ème} jour sont des jeunes blastocystes tandis que les 36% autres sont des morulas tardives. Les résultats de Shea aussi montrent qu'il y a un taux de gestation de 58% suite à 366 transferts au 7^{ème} jour (1981). On obtient des morulas en collectant des embryons au 5^{ème} jour. La détermination du nombre et de la morphologie de cellules à ce stade sont difficiles (Shea, 1981). Si les embryons sont collectés au 9^{ème} jour, l'embryon sera probablement "sorti" de la zone pellucide (Shea, 1981). La zone pellucide se caractérise par sa capacité d'identifier les embryons ; Et cette zone une fois éclos, l'embryon peut être difficilement trouvé (Shea, 1981). La collecte d'embryons au 12^{ème} jour, quand l'élongation a commencé, peut être faite à l'œil nu, mais le dommage de la paroi du trophoblaste est probable (Shea, 1981).

La morphologie des embryons peut varier d'une apparence idéalement sphérique de la portion protoplasmique de l'ovaire vers une apparence dégénérative de diminution de la portion protoplasmique de l'ovaire (Shea, 1981). Les embryons sont classés en se basant sur la qualité du développement embryonnaire selon les standards de Lindner & Wright (1983) qui a été modifié ultérieurement par la société internationale du transfert embryonnaire (Robertson & Nelson, 1998). Les embryons jugés comme "excellents" sont "sphériques, symétriques et la taille, la couleur et la texture de leurs cellules sont uniformes (Lindner & Wright, 1983). Les embryons "bons" ont des imperfections insignifiantes telles qu'un peu de blastomères compactés présentant des vésicules, avec une forme irrégulière (Lindner & Wright, 1983). Les embryons "Excellents" et "bons" ont été combinés pour un grade "1" (Robertson & Nelson, 1998; Hasler, 2001). Les embryons moyens ne posent pas des problèmes sévères ; ils ont des blastomères compactés contenant des vésicules, et peu de cellules dégénérées" (Lindner & Wright, 1983). Les embryons de classe dite "moyenne" sont répertoriés dans le grade "2" (Robertson & Nelson, 1998; Hasler, 2001). Finalement, les embryons médiocres ou grade "3" sont des embryons qui ont "des problèmes sévères ; des nombreuses blastomères compactés contenant de nombreuses vésicules larges, des cellules dégénérées, des cellules de taille variée, avec une masse embryonnaire encore viable" (Lindner & Wright, 1983; Robertson & Nelson, 1998). 8 à 12 cellules embryonnaires collectées au 7^{ème} jour indiquent que l'embryon est mort, l'embryon est dégénéré ou l'ovulation a été retardée (Shea, 1981). Les embryons dégénérés produisent de mauvais résultats de gestation (Shea, 1981). Selon une étude effectuée par Lindner & Wright (1983), le taux de gestation est probablement moins affecté par le stade de développement embryonnaire que par sa qualité. Les embryons pauvres en qualité ont rendu le taux de

gestation bas, alors que les taux d'embryons classés comme excellent ou bon ont rendu le taux de gestation haut (Lindner & Wright, 1983).

Chapitre 02 : Production & Transfert Embryonnaire chez la vache laitière :

1.1. La superovulation :

L'objectif de la superovulation est de continuer la croissance des follicules subordonnés qui vont devenir atériques naturellement avec la montée des effets du follicule dominant (Bergfelt et al., 1997; Mapletoft, Steward & Adams, 2002). Des différentes combinaisons d'hormones traitantes comme la GnRH et la PGF₂ α (McDougall, S., N.B. Williamson & K.L. Macmillan, 1995; Pursley et al., 1995), la P₄ et l'E₂ (Bo et al., 1995, Bo et al., 1996) et l'aspiration du follicule (Bergfelt, Lightfoot & Adams, 1994; Bergfelt et al., 1997) sont utilisées pour développer les follicules (Bergfelt et al., 1997). Les traitements gonadotrophines augmentent le nombre des embryons récupérés (Bergfelt et al., 1997). La source de gonadotrophine, le traitement par lot, et l'activité biologique sont tous importants à considérer lors d'administration d'hormones exogènes (Murphy et al., 1984; Kanitz, 2002). actuellement il y a plusieurs types de gonadotrophine qui ont été testés dans des protocoles de superovulation comme l'équine chorionique gonadotrophine (eCG) (Murphy et al., 1984; Donaldson, 1989; Mapletoft, Steward & Adams, 2002), l'humane menopausal gonadotrophine (hCG) (Mapletoft, Steward & Adams, 2002) l'ovine (Donaldson, 1989) la porcine (Murphy et al., 1984; Donaldson, 1989; Mapletoft, Steward & Adams, 2002) et la bovine (Bellows et al., 1991) FSH pituitaire.

La FSH est responsable d'induire la superovulation des follicules (Mapletoft, Steward & Adams, 2002). A cause de sa demi vie, la FSH commerciale se purifie 5 heures dès qu'elle est injectée chez une vache laitière, l'injection doit être donnée deux fois par jour (Monniaux et al., 1983; Mapletoft, 2002). Néanmoins, d'autres études suggèrent qu'une seule injection par jour est efficace. (Kanitz et al., 2002). Une population commerciale analogue de la FSH est Folltropin-®V; (Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) est une efficace analogue pour la superstimulation des follicules (Mapletoft et al., 2001). Une utilisation du Folltropin-®V qui a été préparée par des solutions de LH et de FSH à des différentes concentrations produisait plus de corps jaunes et des embryons fertiles (Mapletoft et al., 2002). Kanitz et al. (2002) ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'avoir la contamination de la LH dans les solutions de la FSH pour induire la superovulation; toutefois, La contamination importante de la LH, n'altérera pas les effets du protocole de la superovulation. Un résumé est écrit par Linsell et al. (1986) reporte que pour obtenir une activité de la FSH, Les concentrations FSH doivent être significativement trois fois plus grandes que celles des LH, pour cela, à partir de trois fois il y a une activation de la FSH. Une injection de PGF₂ α est donnée dans le dernier jour du traitement de gonadotrophine pour régesser le corps jaune (Prado Delgado, Elsdén & Seidel, 1989).

1.2. Les Protocoles de Superovulation:

Les traitements de superovulation devraient être donnés quand le follicule dominant n'est pas présent, soit le follicule dominant est roulé dans la vague précédente ou bien il est ablaté ou roulé (du à une stimulation hormonale) (Wikland, Enk & Hamberger, 1985; Bennet et al., 1988; Pieterse et al., 1988). Les animaux à deux vagues ont un follicule dominant qui n'est pas fonctionnel, 30% du cycle œstral (Bergfelt et al., 1997). Les animaux à trois vagues ont un follicule dominant qui n'est pas fonctionnel 35% du cycle œstral (Bergfelt et al., 1997). Seulement 20% du cycle œstral existe pour initier le traitement de superovulation dans le temps de l'émergence de la vague (Bergfelt et al., 1997). En plus du roulement du follicule dominant, les utilisations commerciales de superovulation nécessitent que les cycles œstraux des animaux soient synchronisés également pour minimiser les gestions intensives des mains d'œuvre (Bo et al., 1995). La synchronisation peut être achevée par administration des progestatifs à travers un intra vaginal progestérone-releasing device (CIDR) (Macmillan & Peterson, 1993) ou des prostaglandines (Bo et al., 1995).

Des études effectuées par Bo et al. (1993) ont utilisé un œstradiol valerate (EV) et une combinaison de progestérone et d'œstradiol-17 β avec une utilisation d'un implant de progestérone pour déclencher le roulement du follicule dominant et permettre l'émergence d'une nouvelle vague (Bo et al., 1993; Bo et al., 1994; Bo et al., 1995). Une insertion d'ensemble d'un intra vaginal progestérone-releasing device et d'un œstradiol induit une lutéolyse prématurée (Macmillan & Petterson, 1993). Ces études ont pour objectif l'application des traitements dans des temps aléatoires dans le développement des vagues folliculaires et atteindre l'un de ces deux résultats:

- 1) La régression du follicule dominant et l'accélération de l'émergence d'une nouvelle vague,
- 2) le retard de l'émergence d'une nouvelle vague (Bo et al., 1993; Bo et al., 1994; Bo et al., 1995).

Les résultats de traitement dépendent du timing durant le cycle œstral. Les traitements qui sont donnés précocement (Jour 1) ou mi (Jour 3) du cycle dans un moment où la vague folliculaire va décroiser, les chances du développement des follicules sont diminuées, la période de la dominance folliculaire permet une montée précoce de la FSH, et permet également le développement de nouvelle vague (Bo et al., 1993; Bo et al., 1995). Le Traitement tardif en phase de la croissance folliculaire (Jour 6) a causé un retard dans l'émergence d'une nouvelle vague qui est "probablement associée avec la suppression de la montée de la pré-vague de la FSH" (Bo et al., 1993). Bo et autres (1995) ont procédé au traitement des animaux précocement dans la phase de la croissance folliculaire de la prochaine vague (Jour 9), ils ont observé le même résultat que le traitement dans la phase de la croissance précoce de la première vague : le follicule dominant a régressé et une nouvelle vague folliculaire est accélérée. La nouvelle vague pourrait émerger approximativement 4 jours après traitement (Bo et al., 1995).

Les traitements de la superovulation sont seulement effectués quand le follicule dominant n'est pas présent, mais sont plus effectués dans le "temps de la montée de la pré-vague endogène en FSH ou la vague émergente" (Bo et al., 1995). Une étude effectuée par Nasser et autres (1993) a conclu que plus de follicules sont recrutés et la suppression des follicules subordonnés est prévenue quand la superovulation est induite durant la montée de

pré-vague. La follicule stimulating hormone a été administrée entre les jours 8 et 12 du cycle œstral (Lindsell, Murphey & Mapletoft, 1986) et donnée en doses décroissantes en douze heures d'intervalles pendant cinq jours (Lindsell, Murphey & Mapletoft, 1986; Nasser, 1993). Le dernier jour du traitement par gonadotrophine a été accompagné par une injection de PGF₂α (Prado Delgado, Elsdén & Seidel, 1989) avec un retrait du CIDR (Macmillan & Peterson, 1993). L'œstrus a été détecté 48 heures après et l'insémination est effectuées à ce moment (Macmillan & Peterson, 1993). Un pourcentage de la détection de l'œstrus dans les 72 heures et les 96 heures après a été beaucoup plus diminuée que dans les 48 heures, une suggestion pour l'insémination artificielle a été bien effectuée 48 heures après l'injection de PGF et le retrait du CIDR (Macmillan & Peterson, 1993).

1.2.1. Traitement I: Protocol de GnRH :

Au jour 0, les animaux ont eu un CIDR® qui contient 1.38 g de P₄, (Eazi-Breed™; Pfizer Animal Health, Kanamazoo, MI, 49001) par une insertion intra vaginale. Au jour 3, 100µg de GnRH (Cystorellin®; Merial Limited, Athens, GA) a été injectée en intramusculaire pour faire développer le follicule dominant. Au jours 5 à 8, une follicule stimulating hormone commercial, (Folltropin®-V; Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) a été injecté en intramusculaire en doses décroissantes en fonction du statut et de sensibilité de l'animal pour le traitement. Typiquement, les génisses ont été injectées avec 200 mg de FSH tandis que les vaches ont reçu 300 mg de la même hormone ; FSH. On se base sur leurs réponses, le traitement a été augmenté ou diminué en flushes subséquents. Au jour 8, le CIDR a été retiré et 25mg de PGF₂α (Lutalyse®; Pfizer Animal Health, Kanamazoo, MI) a été administré en intramusculaire. Les animaux ont été inséminés artificiellement en utilisant des semences commercialement disponibles dans le début d'œstrus et dans chaque 12 heures d'intervalle jusqu'à l'arrêt de manifestation des chaleurs par les animaux. Tous les animaux ont été inséminés au minimum deux fois. Au moment de dernière insémination, chaque vache a été injectée avec 100µg de GnRH (Cystorellin®; Merial Limited, Athens, GA). Au jour 17 de ces animaux ont été récoltés des embryons viables.

1.2.2. Traitement II: Protocol d'Œstradiol-17β/ Progestérone :

Au jour 0, les animaux ont eu une insertion de Controlled Internal Drug Releasing (CIDR®) qui contient 1.38 g de Progestérone (P₄), (Eazi-Breed™; Pfizer Animal Health, Kalamazoo, MI). Une insertion intra vaginale et une injection intramusculaire d'œstradiol (2.5 mg) et de progestérone (50 mg) similaire pour le protocole décrit par Bo et al., (1995). Au jours 4 à 7, une follicule stimulating hormone commerciale, (Folltropin®-V; Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) a été injecté en intramusculaire en doses décroissantes en fonction du statut et de la sensibilité de l'animal pour le médicament. Typiquement, les génisses ont été injectées avec 200 mg de FSH et les vaches ont reçu 300 mg de FSH. On se base sur leurs réponses, le traitement a été augmenté ou diminué en flushes subséquents. Au jour 7, le CIDR a été retiré et 25mg de PGF₂α (Lutalyse®; Pfizer Animal Health, Kanamazoo, MI) a été administrée en intramusculaire. Les animaux ont été inséminés artificiellement en utilisant des semences commercialement disponibles dans le début d'œstrus et dans chaque 12 heures d'intervalle jusqu'à l'arrêt de manifestation des chaleurs par les animaux. Tous les animaux

ont été inséminés au minimum deux fois. Au moment de dernière insémination, chaque vache a été injectée avec 100µg de GnRH (Cystorellin®; Merial Limited, Athens, GA). En jour 16, les animaux ont été récoltés des embryons viables.

1.2.3. Traitement III: Protocol de Gonadotrophines :

Trois différents types de gonadotrophines ont été utilisés pour induire la superovulation chez la vache: gonadotrophines d'extraits pituitaires d'un animal domestique (FSH), équine chorionique gonadotrophine (eCG) et humaine menopausal gonadotrophine (hMG) (Alkemade SJ et al., 1993, Mapletoft RJ et al., 2002). PGF a été utilisée pour l'induction de la lutéolyse dans un régime de superovulation, pour permettre et pour préciser le timing d'approche de l'œstrus et de l'ovulation.

Comme la demi vie biologique de la FSH pituitaire chez la vache a été estimée à 5 heures ou moins, elle doit être injectée deux fois par jour en intramusculaire pour induire la superovulation. Le régime utilisé est un traitement biquotidien de FSH en doses décroissantes en 4 ou 5 jours. 48 ou 72 heures après l'initiation du traitement, PGF est injectée pour induire la lutéolyse. L'œstrus et la LH préovulatoire ont lieu en 36 à 48 heures, avec une ovulation subséquente en 24 à 36 heures après.

Les extraits pituitaires purifiés (LH removed) sont aujourd'hui disponibles dans la plus part des pays. Un produit, Folltropin-V (Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) est un extrait pituitaire porcine avec approximativement 84% de LH contenu enlevé (Alkemade SJ et al., 1993, Mapletoft RJ et al., 2002). Il est disponible dans des flacons contenant l'équivalence de 400 mg NIH-FSH-P1. Il a été administré en dose constante ou décroissante établie avec une PGF donnée 72 heures après l'initiation du traitement (Alkemade SJ et al., 1993).

L'équine chorionique gonadotrophine est une glycoprotéine complexe avec deux activités 'FSH et LH', elle est connue comme ayant une demi vie approximativement 40 heures chez la vache, et persiste plus de 10 jours dans la circulation des animaux; ainsi elle est injectée normalement une fois suivie de PGF 48 heures après (Alkemade SJ et al., 1993, Mapletoft RJ et al., 2002). La longueur de la demi vie d'eCG également cause une stimulation ovarienne prolongée, des follicules non ovulatoires, des profils endocrines anormaux, et elle réduit la qualité des embryons. Ces problèmes ont été résolus par l'injection intraveineuse d'anticorps à eCG dans le temps avec la première insémination, 12 à 18 heures après le début de l'œstrus. Toutefois, les anticorps à eCG ne sont pas commercialement disponibles, et donc l'eCG est rarement utilisée chez les bovins. Les doses recommandées d'eCG varient de 1500 à 3000 UI/animal avec 2500 UI par injection intramusculaire communément choisie. La « Humane menopausal gonadotrophine », utilisée dans des cas individuels rares, n'a pas gagné faveur en transfert embryonnaire bovin à cause du cout et de sa efficacité mineure (Alkemade SJ et al., 1993).

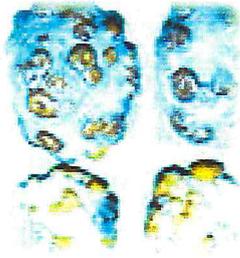


Figure 4. Deux paires d'ovaires bovins superstimulés.
Enlevés 7 jours après ovulation, (Mapletoft 2006).

2.1. La Récolte Embryonnaire :

Les procédures courantes du transfert embryonnaire pour la récolte sont généralement accomplies par des techniques non chirurgicales en, approximativement, sept jours après reproduction. Le processus de la récolte est relativement simple et peut être effectué en une heure. Ce processus exige une instrumentation spécifique et un savoir faire.

Au début, la donneuse subie une anesthésie épidurale. Un tube cathéter flexible en caoutchouc est passé à travers le col et le corps vers la corne utérine. Le ballonnet est gonflé avec une solution saline pour tenir le cathéter en place et pour éviter l'écoulement des liquides. Une solution saline est injectée dans les cornes utérines à travers des trous au bout du cathéter qui précède le ballonnet. La solution de remplissage des cornes utérines est légèrement massée et le liquide contenant les embryons est aspiré en utilisant le cathéter. Cette solution est collectée à travers un filtre et dans des boîtes de Pétri, les embryons sont alors localisés, et rapportés pour être étudiés au microscope (Mitchel & Doak, 2004; Jaenudeen et al., 2000).

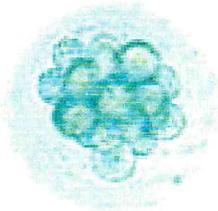


Figure 5. embryon bovin au stade 16 cellules, (Mapletoft 2006).

2.2. Evaluation et processus des embryons :

Sur une collection, les embryons sont évalués sous un microscope pour le stade de développement et de la qualité embryonnaire. Les embryons sont collectés en jour 6 à 8 après l'insémination, ils sont souvent au stade morula ou au stade blastocyste. Il devrait être noté que l'évaluation visuelle des embryons qui n'est pas une science exacte est une évaluation subjective. Le système de codage standardisé suivant (Table 1) est reconnu par la société internationale du transfert embryonnaire, Savoy, Illinois.

Table 1. Stades de développment embryonnaire ; reconnu par la société international du transfert embryonnaire (Robertson & Nelson, 1998).

Stade	Description
1	Non fécondé
2	2 à 12 cellules
3	Jeune Morula
4	Morula
5	Jeune Blastocyste
6	Blastocyste
7	Blastocyste expansé
8	Blastocyste éclos
9	Blastocyste expansé éclos

Une seconde graduation d'indicateur de qualité est celle des grades de qualité (Table 2).

Table 2. Les grades de qualité embryonnaire ; reconnu par la société internationale du transfert embryonnaire (**Robertson & Nelson, 1998**).

Grade	Description
1	Excellent ou bon. Une masse embryonnaire symétrique et sphérique avec des blastomères (cellules) individuelles qui sont uniformes en taille, en couleur, et en densité. Cet embryon est compatible avec son stade probable de développement. Des irrégularités structurales devraient être relativement mineures, et au moins 85% du matériel cellulaire devrait être intact, avec une masse embryonnaire viable.
2	Moyenne. Des irrégularités modérées en générale dans la forme de la masse embryonnaire ou en taille, en couleur et en densité des cellules individuelles. Au moins 50% du matériel cellulaire devrait être intact, avec une masse embryonnaire viable.
3	Médiocre. Des irrégularités majeures dans la forme de la masse embryonnaire ou en taille, en couleur et en densité des cellules individuelles. Au moins 25% du matériel cellulaire devrait être intact, avec une masse embryonnaire viable.
4	Mort ou dégénéré. Des embryons Dégénérés, ovocytes ou embryons à une cellule. Ces embryons ne sont pas viables.

Les embryons de qualité appropriée (1 ou 2 préférablement) peuvent être transférés directement vers des vaches receveuses ou être congelés pour une utilisation ultérieure (**Blair & Flanders, 2003**).

3.1. La congélation de l'embryon :

La congélation d'une cellule vivante constitue un processus physio-chimique complexe de chaleur et du transport de l'eau entre la cellule et son milieu environnant. Il existe un optimum taux de refroidissement pour chaque type de cellule. Il est dépendant de la taille de la cellule, son ratio, sa perméabilité en eau, et le coefficient de température de cette perméabilité (Leibo et al., 1978, Palasz et al., 1996).

Normalement, le milieu contient des embryons refroidis au dessous de ses points de congélation sans formation du cristal de glace. Ensuite, dans certaines températures basses, une glace nucléaire a lieu, suivie par une augmentation rapide de la température due à la libération de chaleur latente de fusion. Pour éviter le super-refroidissement extensif, la cristallisation de glace est induite dans le milieu extracellulaire quelque 2°C inférieur à son point de congélation (- 4°C à - 7°C) par ensemencement du milieu par un cristal de glace (Palasz et al., 1996). L'eau dans les cellules de l'embryon et entre les cristaux de glace dehors l'embryon ne congèle pas à cette température à cause de la diminution du point de congélation de solutés. Jusqu' au refroidissement et l'agrandissement des cristaux de glace, la concentration du soluté augmente et l'embryon osmotiquement répond en perdant l'eau dans le milieu extracellulaire non congelé.

Les cellules sont lésées durant la congélation et le dégel principalement par les effets de solution et formation de glace intracellulaire (Leibo et al., 1978, Palasz et al., 1996). La deuxième est spécialement dommageable quand relativement y a une formation des grandes quantités des grands cristaux. Pour éviter la congélation intracellulaire, les embryons doivent être refroidis en 1°C/minute ou lentement. Toutefois, les taux plus bas peuvent aussi endommager les cellules par des effets de solution. C'est spécialement nocif si les cellules ne sont pas autorisées pour la réhydratation durant un très rapide dégel (Palasz et al., 1996).

Le taux de dégel exigé dépend du régime de la congélation utilisé. Quand les embryons sont refroidis doucement en températures entre - 27°C et - 40°C et ensuite rapidement en - 196°C (azote liquide), le dégel doit être rapide, par exemple, environ 200°C/minute. Les cellules traitées dans ce chemin peuvent contenir quelques glaces intracellulaires, et le dégel doit être rapide pour prévenir le dommage contre la recristallisation de cette glace. De l'autre, si les embryons sont refroidis doucement aux températures inférieure à - 60°C avant de les transférer au liquide nitrogène, puis le dégel est normalement fait doucement en environ 20°C/minute (Leibo et al., 1978). Quoique les deux systèmes résultent dans des taux similaires de la survie de l'embryon, des techniques plus rapides de la congélation et du dégel sont préférés dans les essais sur le terrain.

Les embryons sont normalement conservés dans le liquide nitrogène à - 196°C. Les réactions uniques qui ont lieu à - 196°C sont les ionisations directes de la radiation du fond. En conséquent, le temps de conservation de plus de 200 ans est improbable pour produire aucune diminution détectable dans la survie ou bien pour causer un changement génétique pour les embryons congelés.

Les cryoprotecteurs tel que le glycérol dont les concentrations rangées en 1.0 à 2.0 M sont nécessaires pour assurer la survie de l'embryon après la congélation. On pense que les cryoprotecteurs agissent en réduisant la quantité de glace présentée dans une température quelconque durant la congélation, ainsi par modération des changements dans la

concentration de soluté. Le critère recommandé pour un cryoprotecteur inclut une haute solubilité, une faible toxicité dans des hautes concentrations, et un faible poids moléculaire les deux pour faciliter la pénétration et pour exercer un effet maximum de rejoindre (Palasz et al., 1996). Le glycérol était le plus souvent utilisé pour la protection des embryons durant la congélation mais plus récemment, plus de cryoprotecteurs sont répandus tel que l'éthylène glycol, qui étaient privilégiés parce qu'ils peuvent être utilisés avec "un transfert direct" c'est à dire, le transfert vers une receveuse sans l'enlèvement préalable du cryoprotecteur (Leibo et al., 1998, Voelkel et al., 1992).

Durant l'addition et la dilution du cryoprotecteur pénétré, la cellule subit des échanges osmotiques résultants dans le renflement ou la contraction (Palasz et al., 1996). En conséquent, si l'addition ou bien particulièrement la dilution est continue inappropriée, la viabilité des cellules peut être affectée. Le glycérol peut être additionné à des embryons dans un simple pas mais il y a une évidence claire que le taux de glycérol enlevé est plus critique. La méthode standard empirique a été pour la dilution "démarche-mettre au parfum" avec l'addition de PBS ou de pipeter l'embryons vers des concentrations décroissantes de glycérol. Toutefois, (Leibo et al., 1978) ont suggéré une modification dans la procédure de l'enlèvement du cryoprotecteur en introduire des solutés non perméables comme le sucre dans le milieu de dilution. Le sucre joue comme une contre force osmotique pour limiter le mouvement d'eau à travers les membranes. Comme le cryoprotecteur laisse l'embryon, il va rétrécir la réponse pour la dilution du milieu extracellulaire hypertonique. Il les regagne un volume normal quand dans la fin du processus l'embryon est placé dans un milieu de culture isotonique normal. En utilisant cette information, les méthodes pratiques de l'enlèvement rapide du glycérol des embryons dégels étaient devisées. Comme un résultat, une "première paille" a été développée alors que les embryons peuvent être dégelés, des solutions mélangées avec le dégel et transférer vers une receveuse se fait non chirurgicalement, tout en spécialité. Dans une étude spécialisée, 476 embryons congelés ont dégelés et traités dans un préalable sucre pour le transfert, sans évaluation microscopique, résultat dans un taux de gestation de 42.4% (Leibo 1984). Plus récemment, cette méthode donnait un chemin au "transfert directe" en utilisant des cryoprotecteurs hautement pénétrés, tel que l'éthylène glycol, qui ne fait aucun dommage osmotique pour l'embryon s'il n'y a pas un préalable enlevé pour le transfert. Une gestation précoce résulte pour le "transfert direct" au Canada, avec plus de 19,000 embryons, ont été non différents à ceux obtenus avec le glycérol et l'enlèvement préalable du cryoprotecteur pour le transfert (Leibo et al., 1988).

3.2. Les procédures de congélation-dégel :

Le protocole suivant était prouvé avec succès pour la cryopreservation des embryons bovins de 7 jours dans le PBS supplémenté avec 10 à 20% FCS et 1.0 à 1.5 M glycérol (Mapletoft 1985). Les embryons sont pipetés dans le milieu de congélation dans une température de chambre (20°C) et laissés de huit à 10 minutes pour permettre au glycérol d'être homogène avec les cellules embryonnaires. Durant cette période d'équilibre les embryons sont transférés en volumes de 0.25 ou 0.5 ml du milieu de congélation vers des pailles Françaises qui sont alors hermétiquement fermées. Les échantillons peuvent immédiatement être transférés dans la chambre de congélation à - 6°C ou à - 7°C et conservés

durant 5 minutes. La cristallisation du milieu extracellulaire est initiée en touchant la paroi externe de la paille avec une pince pré refroidie dans l'azote liquide (ne pas toucher la colonne du milieu qui contient les embryons). Les échantillons sont conservés à la température, et ensemencée pour un temps supplémentaire de 10 minutes pour permettre la cristallisation du milieu et faire progresser l'équilibre. Ensuite, les embryons sont refroidis en 0.3 à 0.8°C/minute pour atteindre une température qui varie entre - 30°C et - 40°C, et puis ils sont immergés dans l'azote liquide (- 196°C) pour les conserver.

On procède à la décongelation de l'embryon en mettant la paille au bain mari à une température entre 20 et 35°C. Pour éviter toute fêlure de la zone pellucide il faut plonger les embryons dans un bain mari à 35°C ; le taux de dégel devrait être autour 200°C/minute.

Quand le glycérol est utilisé comme un cryoprotecteur, il doit être extrait sans causer un dommage osmotique. La méthode à adopter est l'utilisation de solution du sucrose entre 1.0 et 0.5 M dans un premier temps en 10 minutes ou 0.3 M du sucrose dans un deuxième temps trois étapes de dilution de 5 minutes chacune (0.75 M du glycérol et 0.3 M du sucrose ; 0.375 M du glycérol et 0.3 M du sucrose ; 0.3 M de sucrose) (Mapletoft 1985). Les embryons sont alors retransférés en milieu de culture PBS, lavés et évalués pour un éventuel transfert.

3.3. Le transfert direct :

Récemment, l'utilisation des cryoprotecteurs hautement pénétrés tel que l'éthylène glycol permettaient le transfert direct des embryons bovins. Leurs extraction et leurs examen au microscope n'est pas nécessaire (Leibo et al., 1998). Avec cette approche, la paille de l'embryon est se dégèle dans un bain mari, mieux que la semence, et les contenus de la paille sont déposés dans l'utérus de receveuse. Ce procédé s'avère plus simple que l'insémination artificielle. Il n'y a pas besoin d'un microscope ou des procédures de dilution compliquée. Le cryoprotecteur laisse l'embryon dans l'utérus. Comme il est indiqué précédemment, le transfert direct de 19.000 embryons bovins au Canada a permis un taux de gestation globale de 58%, qui ne diffère pas de celui obtenu par la technique de dilution régulière du cryoprotecteur. Several AI Centers forme maintenant des techniciens spécialisés dans le transfert embryonnaire. Le transfert des embryons bovins congelés ou dégelés devient maintenant très similaire à l'utilisation de semence congelée ou dégelée dans l'insémination artificielle.

3.4. La vitrification :

La congélation des embryons bovins maintenant est banale et les taux de gestation sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec des embryons frais (Leibo et al., 1998). Toutefois, les procédures de la congélation et de la détente exigent beaucoup plus du temps, l'utilisation des microscopes et les congélateurs biologiques. Ces derniers peuvent être actuellement remplacés par une procédure relativement simple nommée vitrification (Rall et al., 1985). L'embryon dans sa solution cryoprotecteur est placé directement dans le liquide nitrogène. À cause de la forte concentration des cryoprotecteurs, les cristaux de glaces n'auront pas lieu dans la solution. Comme la formation du cristal de glace est une des causes d'endommagement en congélation, la vitrification peut amener la cryopreservation des ovocytes et des fécondations in vitro des embryons. La vitrification qui offre de nombreux

avantages est facilement utilisable. Expérimentalement, les procédures de la vitrification sont maintenant largement utilisées. Et sa commercialisation est une simple question de temps. Il a été rapporté que récemment, on a procédé à un transfert direct des embryons bovins vitrifiés avec des taux de gestations semblables à ceux des techniques traditionnelles (van Wagendonk et al., 1996).

4.1. Le Transfert Embryonnaire :

Le transfert embryonnaire est une technique reproductive qui permet de collecter des ovules d'une vache donneuse en les implantant dans une vache receveuse (Mapletoft, 1984). Le premier transfert embryonnaire a été réalisé sur les lapins en 1890 Mapletoft (1984). La première récolte embryonnaire bovine a été faite en 1930 par Hartman, Lewis, Miller, et Swett (1930) et la première naissance d'un veau comme résultat du transfert embryonnaire a été en Wisconsin en 1951 (Willett et al, 1951.)

Chaque année environ 500,000 embryons sont récoltés et transférés ou congelés (Thibier, 2000; Hasler, 2001). Une application commerciale de transfert embryonnaire n'est devenue populaire qu'à partir de 1972 (Seidel, 1981). De nombreux programmes d'ovulation et du transfert embryonnaire ont se basent sur la superovulation et utilisent des techniques du transfert embryonnaire pour transférer les embryons collectés de la vache donneuse à des vaches receveuses (Barros & Nogueira 2001). Le développement du transfert embryonnaire non chirurgical a généré une méthode de collection des embryons et leur transfert à un animal receveur (Brand & Akabwai, 1978). Des avantages du transfert embryonnaire incluent une amélioration génétique, un contrôle des maladies, une importation et exportation des embryons, un sauvetage de la fonction reproductive, une recherche, un coût et des taux de succès (Brand & Akabwai, 1978; Mapletoft, 1984; Galli et al., 2003).

Les généticiens ont progressé dans leurs travaux grâce à la possibilité qui leur est offerte de sélectionner les races et de raccourcir les intervalles de temps entre les générations (Mapletoft, 1984). L'utilisation de la superovulation et du transfert embryonnaire peuvent produire un grand nombre de vaches supérieures (Seidel, 1981; Mapletoft, 1984). Le transfert embryonnaire joue un rôle important en réduisant le risque des maladies transmissibles et permet le transport des embryons à travers les pays alors que le transport des animaux vivants adultes est beaucoup plus couteux et même stressant pour l'animal (Mapletoft, 1984). Les animaux incapables de reproduire naturellement peuvent être utilisés comme des vaches receveuses (Mapletoft, 1984). Finalement, le transfert embryonnaire permet de progresser dans la recherche tel que le domaine de la gestation gémellaire. Elle permet également à l'utérus d'être apte à assurer une bonne gestation. Le contrôle endocrine de l'environnement utérin est facilité grace à ce transfert (Mapletoft, 1984).

Grace au transfert embryonnaire on est capable de synchroniser la vache donneuse et la vache receveuse (Brand & Akabwai, 1978; Lindner & Wright, 1983; Mapletoft, 1984). Sans cette synchronie, le taux de gestation sera bas (Brand & Akabwai, 1978). La prostaglandine F₂ α est administrée chez la vache receveuse 12 à 18 heures avant la vache donneuse alors que la synchronisation peut être accomplie entre les vaches donneuses et les vaches receveuses (Mapletoft, 1984). Une vache donneuse observée en chaleur est inséminée artificiellement et l'embryon peut être collecté 6 à 8 jours après l'insémination (Mapletoft,

1984). Selon Lindner et Wright (1983), les protocoles de synchronisation peuvent être en dehors de synchronisation de plus de 2 jours dans ce cas là l'œstrus chez la receveuse apparait avant celui de la donneuse, et quand la synchronisation est de moins de 2 jours l'œstrus chez la receveuse apparait après celui de la donneuse. sans entrainer la baisse du taux de gestation (Lindner & Wright, 1983; Mapletoft, 1984). Une étude faite par Lindner et Wright (1983) montre que la synchronisation des receveuses et des donneuses est plutôt importante dans la synchronisation du stade cellulaire que dans l'âge des embryons. L'embryon est collecté par une procédure non chirurgicale. Une manchette de caoutchouc cathéter est insérée à travers le col utérin et conduite jusqu'à l'une des cornes (Mapletoft 1984). Les embryons peuvent être collectés par un système d'injection de PBS fermé ou interrompu ou bien par une technique de seringue non interrompue (Mapletoft, 1984). Les embryons passent à travers un filtre plancton et sont transférés ensuite vers des boites de Pétri pour être observés sous un microscope stéréo dissection (Mapletoft, 1984). Les embryons peuvent être cultivés ou bien transférés après collection (Mapletoft, 1984). Les blastocystes bovine peuvent être conservés dans un réfrigérateur à 4°C pour être utilisés de préférence tout de suite après. Si on les conserve plus de 2 jours le transfert risque de ne pas aboutir (Lindner & Wright, 1983).

4.2. Avantages du Transfert Embryonnaire :

Grace à la méthode du transfert embryonnaire on peut obtenir de bons veaux en utilisant les meilleurs taureaux et les meilleures vaches ou génisses. Maintenant le fermier peut suivre un programme embryonnaire, et obtient des productions à vie avec une seule collecte.

L'avantage du Transfert Embryonnaire peut être expliqué ainsi : Traditionnellement, les vaches produisent seulement un veau par an. Le transfert embryonnaire permet la production de toute la progéniture en un an émanant d'une seule vache donneuse.

- _ Augmenter le potentiel génétique du troupeau en un temps relativement court.
- _ Augmenter la production laitière chez la vache.
- _ Augmenter le poids des veaux durant le sevrage.
- _ Les embryons congelés peuvent être transportés quasi n'importe où.
- _ Préserver les races supérieures pour les futures générations grâce à la congélation des embryons (Mitchell & Doak, 2004):

4.3. Technologies des procédures du Transfert Embryonnaire :

4.3.1. La gestion des donneuses :

4.3.1.1. La sélection des donneuses :

Avant de sélectionner la donneuse il faut prendre en considération les aspects suivant :

- _ La supériorité génétique (une race de qualité).
- _ La capacité reproductive.
- _ La valeur économique ou la vente de la progéniture.

Dans le terme de sélection génétique supérieure, elle devrait être basé sur :

- _ La valeur reproductive annuelle (on a plus d'un veau par an).
- _ La haute production laitière (pour un élevage laitier).

_ Body conformation score (Rasad, 2004).

4.3.1.2. La santé de l'animal donneur :

Le critère du choix de la donneuse :

Elle doit être saine. Dans le cas contraire le processus de superovulation peut être affecter négativement ce qui entraîne une baisse de la reproduction. Pour être sûre de la bonne santé de la vache, il faut procéder aux travaux suivants :

- _ L'analyse du sang.
- _ La vaccination de la donneuse.
- _ L'évaluation de la palpation transrectale (pour connaître la condition normale de l'organe reproductif).

4.3.1.3. L'Alimentation de l'animal donneur :

Il y a une corrélation positive entre, la condition corporelle et la condition de l'alimentation. Une alimentation de mauvaise qualité nutritive réduira le niveau de la fertilité. Donc, il est nécessaire de bien la nourrir (Mitchel & Doak, 2004).

4.3.1.4. Le cycle œstral de la donneuse :

Une des clés de succès du transfert embryonnaire est la détection de l'œstrus. Ceci doit être établi avec précision. La durée du cycle œstral devrait être régulièrement normale parce que si elle est anormale elle va avoir un effet négatif sur le processus de superovulation. Il est préférable de procéder à la détection de l'œstrus dans deux cycles œstraux consécutifs. Habituellement elle est faite à 6 heures du matin et à 6 heures du soir. Pendant la détection de l'œstrus, il faut éviter les anomalies de détection des chaleurs tel que les chaleurs silencieuses (Curtis, 1991).

4.3.2. La gestion des receveuses :

4.3.2.1. La sélection des receveuses :

Les receveuses idéales sont des femelles qui présentent les critères suivants :

- _ Une absence des pathologies, spécialement les pathologies reproductives.
- _ Une bonne fertilité.
- _ Aucuns symptômes dystociques.
- _ (Le métissage n'a pas une influence négative sur la fertilité, il peut améliorer le niveau de fertilité).

4.3.2.2. La santé de l'Animal Receveur :

La vache receveuse est choisie selon les critères suivants :

- _ Le statut sanitaire (elle doit être saine).
- _ Le statut reproductif (bonne fertilité).
- _ L'Application du système de quarantaine.

_ Le contrôle journalier pour découvrir d'éventuels symptômes des maladies. Surveiller la température corporelle, qui risque d'affecter la fertilité si elle est anormalement élevée ou anormalement basse.

4.3.3. La gestion des donneuses et des receveuses : La détection de l'œstrus :

La synchronisation de l'œstrus devrait être faite chez les deux 'donneuse et receveuse' (Curtis, 1991). On recourt à l'observation visuelle quand on veut :

_ détecter l'œstrus après l'insémination artificielle au matin et au soir approximativement 30 minutes.

_ La technique du transfert embryonnaire devrait être faite au bon moment en ligne avec l'apparence des symptômes de l'œstrus qui vont résulter dans le grade de l'œstrus synchronisé.

_ L'observation intensive devrait être faite un jour avant et un jour après l'œstrus, et toujours, l'observation de l'œstrus devrait être exécutée à 6 et à 10 heures du matin ; à 2 et à 10 heures du soir.

_ L'application de la détection d'œstrus devrait être faite attentivement et avec précision en respectant les procédures de synchronisation de l'œstrus entre la receveuse et la donneuse (ceci a un effet significatif sur le succès du transfert embryonnaire).

_ Une étude montre que le taux de succès du transfert embryonnaire est meilleur si la receveuse reçoit l'œstrus le même jour que la donneuse. (Blair & Flanders, 2003).

La partie

expérimentale ;

1. Introduction :

L'amélioration génétique et la reproduction bovine prennent une longue période, c'est pour cette raison, la technologie de la superovulation et du transfert d'embryons ont été appliqués dans le programme de reproduction pour réduire le temps de l'amélioration génétique. Ces techniques avancées ont plus d'avantage que la reproduction naturelle (**Barati et al., 2006**). Il était rapporté que différents races de bovins répondent différemment aux régimes de superovulation. Actuellement, les chercheurs sont essayés de diminuer les doses de la FSH pour induire la superovulation chez les bovins. L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer la réponse à un traitement de superovulation en réduisant le nombre d'injections de la pFSH.

2. Matériel :

2.1. Le lieu, la durée, et les animaux utilisés :

L'étude a été réalisée au niveau de la station expérimentale de la faculté agro vétérinaire de l'université Saad DAHLAB de Blida.

Cette étude a été menée de novembre 2011 au juin 2012.

Le travail a porté sur 04 vaches de race Holstein, dont deux pie rouges et deux pie noires, âgées de 4 à 5 ans, d'un état d'embonpoint variant de 3 à 3.5, trois de ces quatre vaches étaient en lactation. Elles ont toutes une cyclicité régulière et n'ont montré aucune affection apparente du tractus génital.

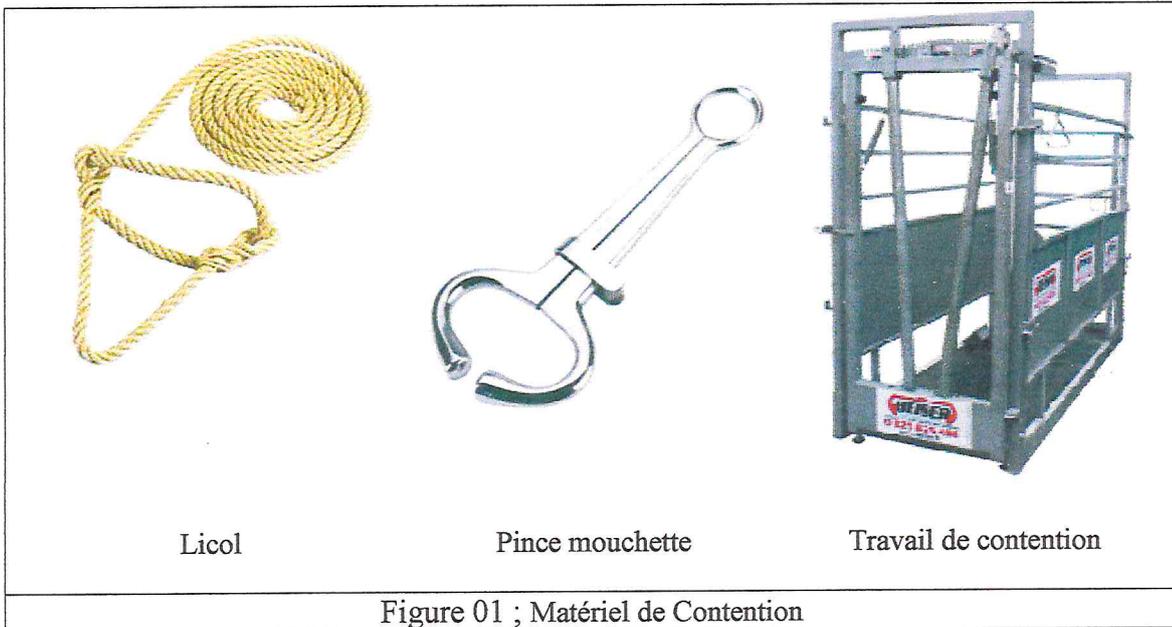


Photo 01 ; cheptel expérimental

2.2. Le matériel et le médicament utilisés :

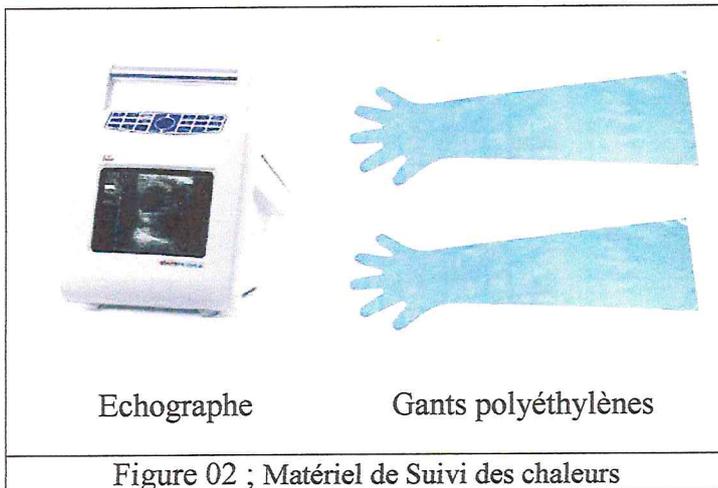
2.2.1. Matériel de la contention : Nous avons utilisé :

Une bride, une pince mouchette, un travail de contention (Figure 01)



2.2.2. Matériel d'échographie :

Un échographe ; ESAOTE Pie Médical, et des gants gynécologiques (Figure 02).



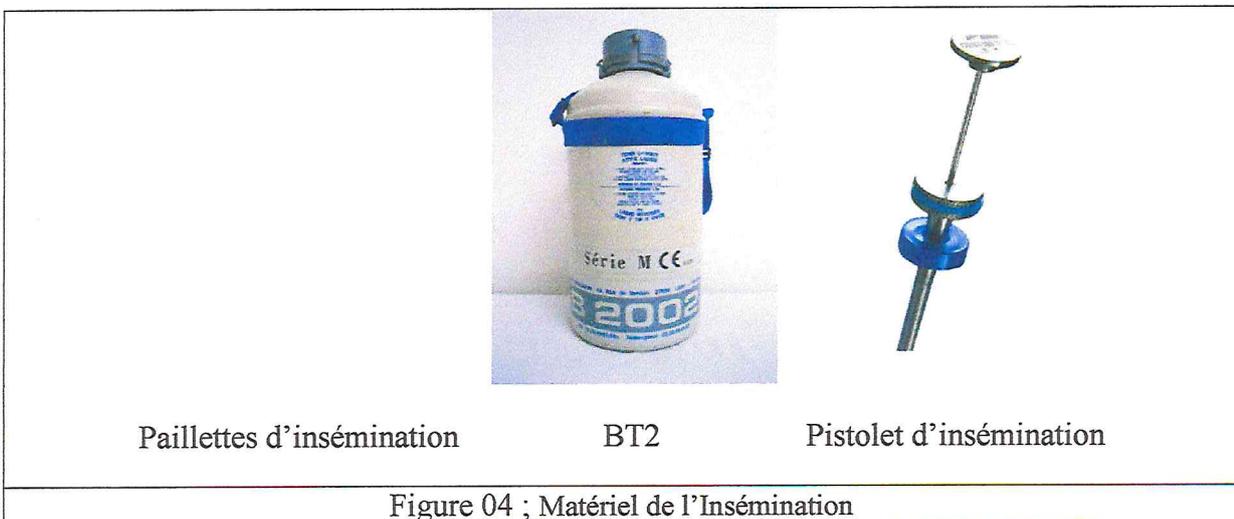
2.2.3. Matériel du traitement :

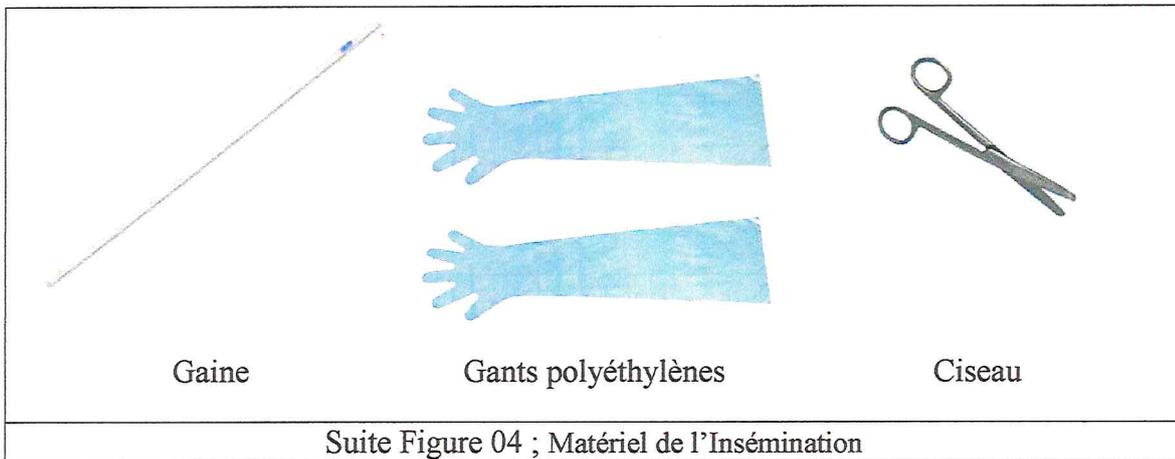
Des hormones (STIMUFOL® ; lyophilisat injectable de follitropine porcine et lutropine porcine + Prostavet® ; PGF₂ ALPHA), des seringues stériles, des aiguilles stériles, un antiseptique (alcool chirurgicale) (Figure 03).



2.2.4. Matériel de l'insémination :

Des paillettes d'insémination, un BT2, un pistolet d'insémination type Cassou, des ciseaux, des gaines et des gants gynécologiques (Figure 04).

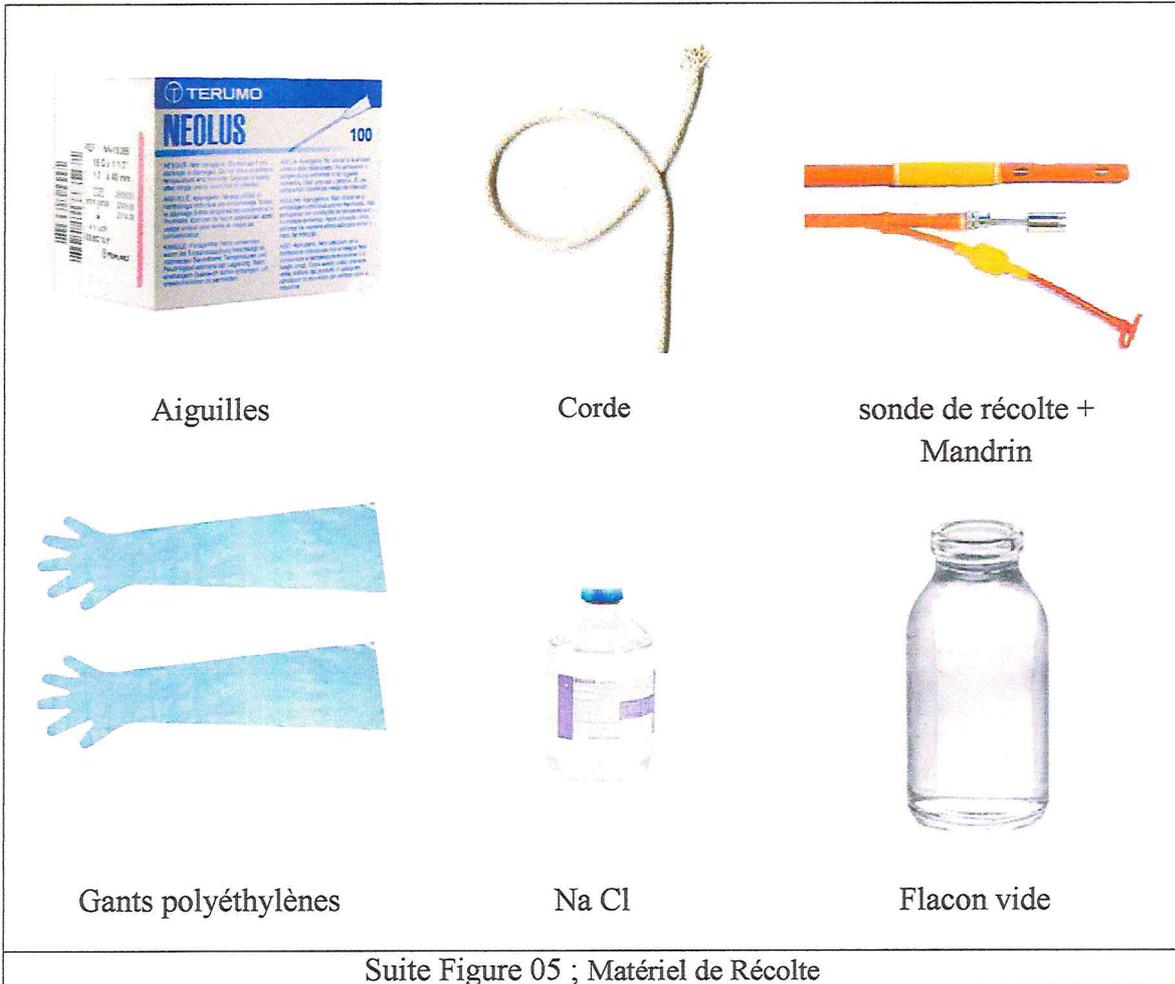




2.2.5. Matériel de la récolte :

Des ciseaux, une lame de bistouri, des antiseptiques (alcool chirurgicale + iode), un coton, un anesthésique (Xylocaïne), des seringues stériles, des aiguilles stériles, une sonde de récolte à deux voies (minitube® CH 16 19982/0113) et son mandrin métallique, des gants polyéthylènes, des flacons de sérum salé (Na Cl) étant utilisé comme milieu de récolte, et des flacons vides en verre de 500 ml pour mettre le liquide de récolte en dedans (Figure 05).

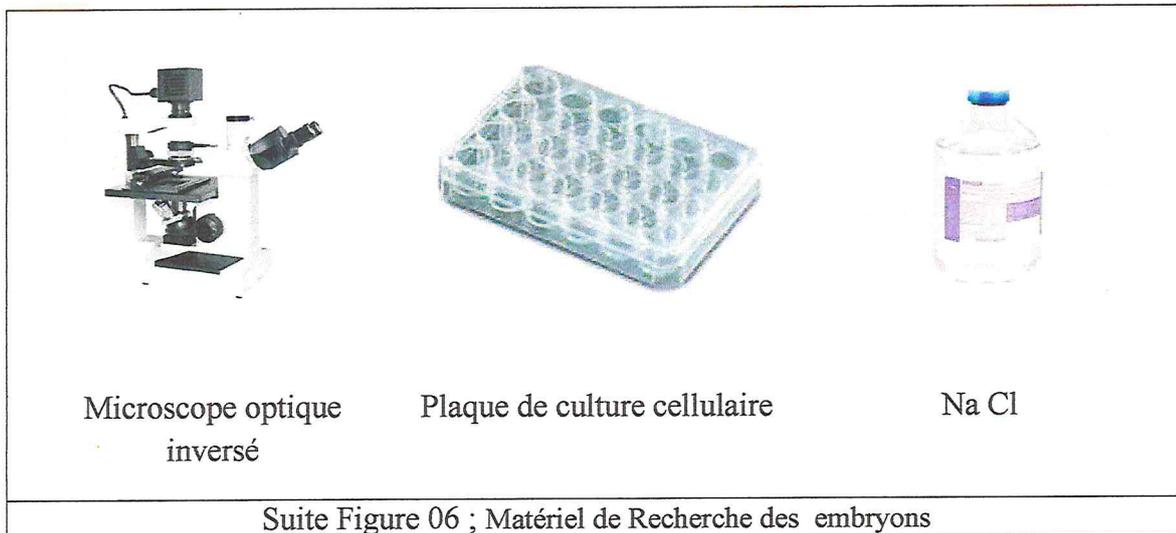




2.2.6. Matériel de la recherche des embryons :

Une tubulure de petit calibre en silicone, des boites de pétri quadrillées, un microscope optique inversé (WILOVERT S®), une plaque de culture cellulaire (24 puis), des paillettes 25 μ l (Figure 06).





3. Méthode :

3.1. Détection des chaleurs :

Le contrôle de la cyclicité a été fait par un suivi quotidien en examinant les vaches environ 30 minutes par jour dans une aire d'exercices. L'acceptation du chevauchement par des vaches congénères, l'écoulement muqueux, et la congestion vulvaire étaient considérés comme des signes majeurs de chaleur. A ce moment une palpation transrectale a été réalisée pour confirmer la présence d'un follicule de grande taille (20 mm). La dernière chaleur observée nous a servi de référence pour le traitement de superovulation (tableau 1)

Tableau 01 : Les dates d'apparition des chaleurs

Vache	1 ^{er} cycle		3 ^{ème} cycle		5 ^{ème} cycle		7 ^{ème} cycle	
	1 ^{ère} chaleur	2 ^{ème} chaleur	3 ^{ème} chaleur	4 ^{ème} chaleur	5 ^{ème} chaleur	6 ^{ème} chaleur	7 ^{ème} chaleur	8 ^{ème} chaleur
PN 07002	29.11	20.12	12.01	S.T	S.T	18.03	S.T	S.T
PN 07004	08.12	29.12	23.01	13.02	04.03	24.03	14.04	05.05
PR 08001	01.12	22.12	15.01	07.02	27.02	18.03	S.T	S.T
PR 08002	04.12	26.12	18.01	09.02	S.T	18.03	08.04	30.04
	2 ^{ème} cycle		4 ^{ème} cycle		6 ^{ème} cycle			

_ S.T : sous traitement

3.2. Le traitement de superovulation, l'insémination, et la récolte :

Le traitement de superovulation a été initié entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour après la manifestation d'une chaleur de référence naturelle. On commence toujours les injections en présence d'un corps jaune de 20 à 30 mm. Ce dernier est confirmé ou infirmé par l'échographie.

La partie expérimentale

Le traitement a été réalisé par une injection intramusculaire de 50 mg de pFSH diluée avec 9 ml du solvant SMP (STIMUFOL® qui contient 20% de LH) donné en trois jours successifs au matin en trois injections de 16.66 mg pour chacune.

La lutéolyse a été induite par une injection intramusculaire de 5 mg de prostaglandine (Prostavet®) donnée au même temps avec la troisième injection de pFSH.

Deux inséminations artificielles de 12 heures d'intervalle ont été réalisées le 5^{ème} jour (48 et 60 heures après l'injection de prostaglandine).

La récolte a été réalisée entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour par rinçage des cornes avec un volume total de 500 ml de sérum salé NaCl. La bonne contention mécanique (le travail de contention ; photo 02) et médicamenteuse (la xylocaïne ; photo 03) ont facilité la manipulation. Le nombre des corps jaunes et des follicules présents sur les ovaires a été estimés par palpation rectale juste avant la récolte. Les embryons récoltés ont été classés selon les critères morphologiques (Figure 07, photo 04).

Homones		FSH	FSH	FSH+PGF _{2α}	2 IA	
		↓	↓	↓ ↓	↓	
Doses (mg)		16.66	16.66	16.66 05		
Jours	0	10	11	12	14	21
	Estrus naturel	Traitement de superovulation			Insémination artificielle	Récolte

Figure 07 ; Le schéma des traitements effectués.

Sont considérés comme de bons embryons ceux qui ont un développement normal le jour de la collecte. Cette normalité est jugée sur des critères morphologiques (taille, forme générale, intégrité, opacité...) (Elsden et al 1978).

La vache 07004 ne présentait pas des chaleurs régulières ou bien présentait des pathologies ovariennes (kystes ovariens multiples confirmés par échographie), elle n'a pas été traitée et donc elle a été écartée du programme.



Photo 02 ; La vaches 08001 est contentionnée et prête d'être collectée



Photo 03 ; La vache 08001 reçoit une anesthésie épidurale juste avant la collecte



Photo 04 ; Dr ADEL entraine de collecter la vache 08001

4. Résultats :

4.1. résultat de suivi des chaleurs :

On a vu que les vaches ont un cycle apparemment régulier de durée moyenne comprise entre 17 et 25 jours. Durant notre travail, on a reçu quelques kystes ovariennes qui ont été diagnostiqués par échographie et qui n'ont pas traitées (défaut de médicament), c'est pour cette raison on les a attendus plus de deux cycles avant de commencer le traitement.

4.2. La réponse à la superovulation :

03 vaches ont été soumises au traitement de superovulation, 04 traitements ont été effectués, et 02 vaches ont été correctement récoltées ; soit un taux de collecte globale de 50%. Le meilleur taux de collecte a été enregistré chez la vache 08002, et le faible taux de collecte chez la vache 08001 étant du à la présence d'un follicule non ovulé (tableau 02).

Tableau 02 ; La réponse ovarienne à la superovulation des vaches.

La vache	Nombre de traitement de superovulation effectués	Nombre des structures ovariennes
07002	02	15 corps jaunes 06 corps jaunes + 01 follicule
08002	01	17 corps jaunes
08001	01	15 corps jaunes + 01 follicule
Total	04	13.25 corps jaunes + 0.5 follicule

Ces résultats ont montrés que tous les traitements ont donnés des réponses ovariennes positives. Le taux de réponses positives à ce traitement a été 100 %.

La vache 07002 a été récoltée pour sa première fois le 11^{ème} jour en raison des mauvaises conditions climatiques, par contre la deuxième récolte a été réalisée à moitié (la corne droite toute seule) en raison de l'impossibilité du passage de la sonde de récolte au niveau de la corne gauche et ce à cause de l'agitation de l'animal due à la douleur provoquée par la manipulation en l'absence d'anesthésie épidurale faute de produit.

Les vaches 07002 et 08001 ont subi des traitements de superovulation, elles sont inclus dans cette étude pour ses réponses ovariennes seulement parce qu'elles ont manifestées ses chaleurs de superovulation après l'insémination suite a un défaut de détection des chaleurs et elles nous ont données que des ovules non fécondés le jour de la collecte. On a vu que ses vaches (08001 et 07002) ne produisaient aucun embryon transférable, et elles ont été présentées un follicule sur l'un de ses ovaires le jour de collecte (photo 05).

Il nous reste que la vache 08002 pour laquelle on va étudier sa réaction au traitement de la superovulation (la réponse ovarienne et embryonnaire) (tableau 03).

Tableau 03 ; La réponse de la vache 08002 au traitement de superovulation.

La vache	Nombre des corps jaunes	Nombre des structures récoltés
08002	17	15 structures

4.3. La récolte des embryons :

Sur la collecte effectuée de la vache 08002, 15 structures (11 embryons et 4 ovules non fécondés) ont été récoltées.

Au total de 15 structures récoltées ;

On a eu 06 (40%) embryons transférables appartenant à la catégorie classe 01, classe 02, et à la classe 03 dont ;

05 (33.33%) appartenait à la catégorie classe 01,

01 (06.66%) appartenait à la catégorie classe 03,

Et aucun embryon n'appartenait à la catégorie classe 02.

(Tableaux ; 04 et 05, Figures ; 08 et 09).

Tableau 04 ; Le résultat global de la récolte de la vache 08002.

La vache	Le nombre de structures récoltés	Les embryons transférables		Les structures non transférables (embryons ou ovules non fécondés)	
		Le nombre	Le pourcentage	Le nombre	Le Pourcentage
08002	15	06	40%	9	60%

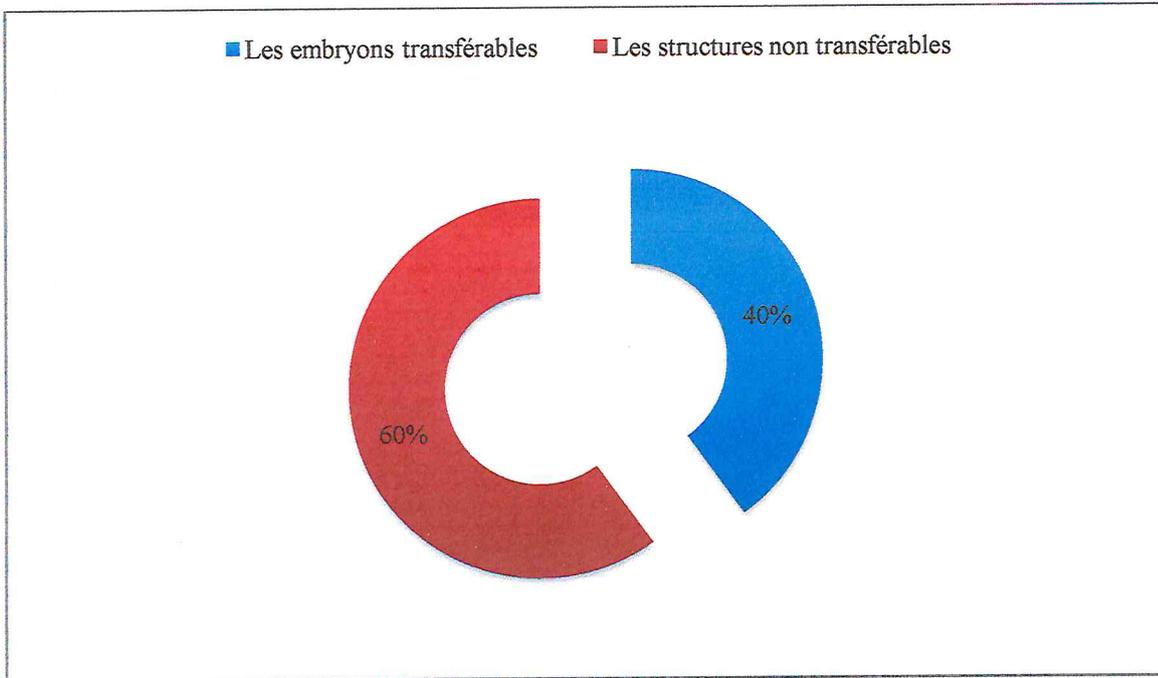


Figure 08 ; Le résultat global de la récolte de la vache 08002.

Tableau 05 ; Classification des embryons transférables de la vache 08002.

La vache	Les embryons transférables					
	Les embryons classe 1		Les embryons classe 2		Les embryons classe 3	
	Le nombre	Le pourcentage	Le nombre	Le pourcentage	Le nombre	Le pourcentage
08002	05	33.33%	00	00%	01	6.66%

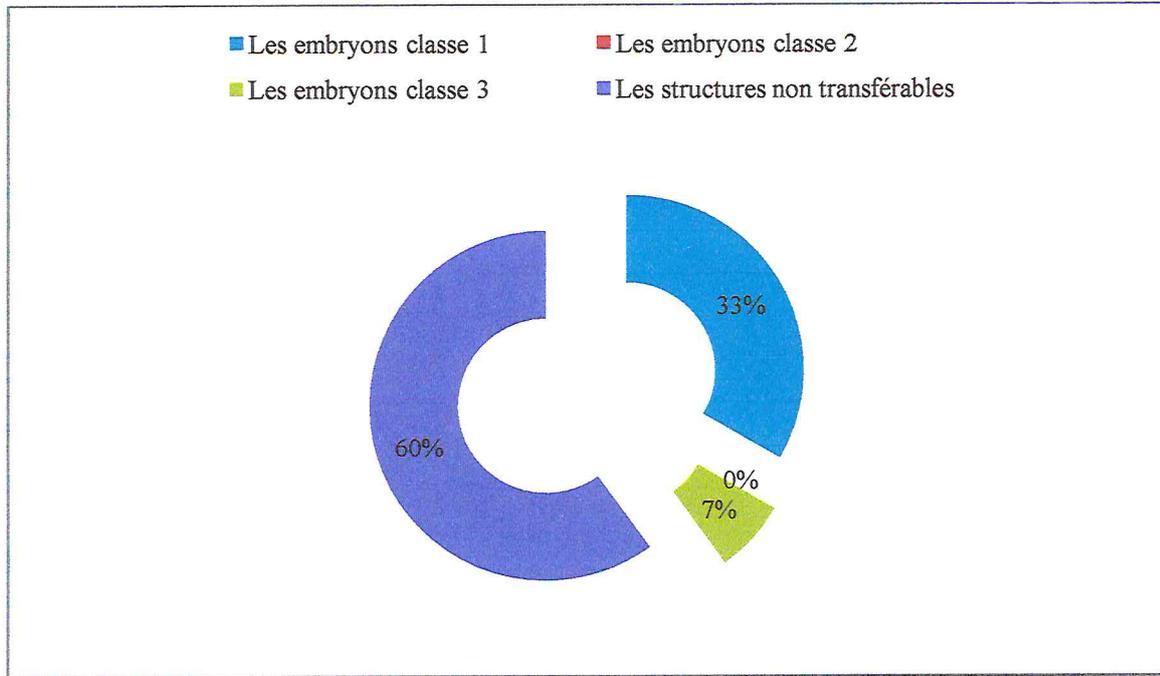


Figure 09 ; Classification des embryons transférables de la vache 08002.

On a eu encore 09 (60%) structures non transférables dont ;

05 (33.33%) embryons appartenait à la catégorie classe 04,

Tendis que les 4 (26.66%) structures restantes appartenait à la catégorie ovules non fécondés. (Tableaux ; 06, Figures ; 10).

Tableau 06 ; Classification des structures non transférables de la vache 08002.

La vache	Les embryons non transférables			
	Les embryons classe 4		Les ovules non fécondés	
	Le Nombre	Le Pourcentage	Le nombre	Le pourcentage
08002	05	33.33%	04	26.66%

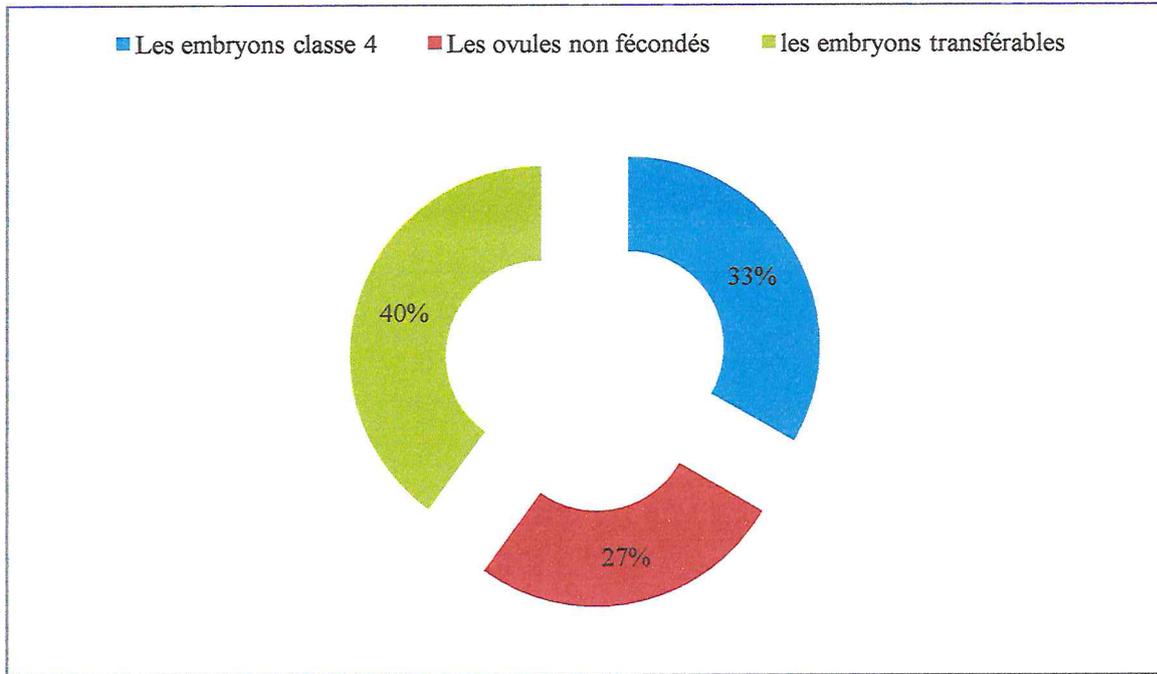


Figure 10 ; Classification des structures non transférables de la vache 08002.

Par conséquent, le nombre des embryons de bonne qualité (embryons transférable) a été de 06 (05 embryons de la classe 1 avec 01 embryon de la classe 03).

5. Discussion :

La FSH qui est une gonadotrophine majeure utilisée en superovulation bovine, est usuellement utilisable en multiple injections biquotidiennes (8 à 10 fois) pendant 4 à 5 jours, (Looney et al., 1981 et Ushinohama et al., 1998). La réduction du nombre d'injection de la pFSH pour la superovulation sans diminution du rendement peut être moins stressante pour les animaux donneurs ; elle fait réduire la main d'œuvre requise pour la production des embryons. Plusieurs études ont visé à la réduction du nombre requis des injections de la pFSH étaient procédés, inclus l'étude qui utilisait une seule injection de la FSH dissoute dans le PVP ; Poly Vinil Pyrrolidone ou celle qui utilisait une seule injection journalière de la pFSH établie pendant trois à cinq jours (Looney et al., 1981, Kelly et al., 1997, Yamamoto et al., 1995, Sugano et Shinogi, 1999, Martens et al., 2005, et Yamamoto et al., 1992). Toutefois, l'application pratique des études était limitée. Notre étude a évalué l'effet de la réduction du nombre d'injection (03) et simultanément du nombre des jours (03) d'un seul traitement par la pFSH sur la réponse de la superovulation chez des vaches laitières. Notre observation montre que le nombre des corps jaunes au moment de la collecte, et particulièrement, le rendement de la production des embryons n'a été pas affecté par la réduction du nombre d'injections de la pFSH dans cette étude. Looney et al., 1981, ont montré qu'une seule injection journalière de la FSH établie a résulté en une réponse superovulatoire égale ou supérieur à celle de l'injection en bijournalière de la pFSH établie pendant cinq jours consécutifs. Semblablement, Martens et al., 2005, ont trouvé que quatre injections de la FSH ont produit un total du nombre d'embryons comparable au traitements de huit injections pendant quatre jours consécutifs dans l'élevage viandeux.

Notre résultat montre que le nombre moyen de corps jaunes obtenu est de 13.25 corps jaunes par vache, ce résultat est supérieur à celui obtenu par (SON et al., 2007) et (Purohit et al., 2006) qui étaient respectivement (10.0 et 11.4) en utilisant respectivement une dose total de (24 mg et 50 mg) pFSH donnée en six doses décroissantes pendant trois jours ; et il est inférieur à celui obtenu par (Lubbadeh et al., 1980) qui était de 17.9 en utilisant une dose total de 50 mg de pFSH donnée en décroissance en quatre injections journalières en sous cutanée.

Le nombre moyen des structures récoltés est de 15 structures (embryons et ovules non fécondés) par vache, ce résultat est supérieur à celui obtenu par (Lubbadeh et al., 1980), (SON et al., 2007) et (Purohit et al., 2006) qui respectivement était de 6.7 , 10 et 7.4.

Jusqu'à maintenant, cette étude démontre que la diminution du nombre d'injections pour la superovulation n'affecte pas le taux global de la collecte.

Notre résultat montre aussi que le nombre d'embryons transférables est de 06 embryons, ce résultat est supérieur à celui obtenu par (SON et al., 2007) et (Purohit et al., 2006) qui étaient respectivement 4.1 et 6.5 ; il est inférieur à celui obtenu par (Peerayut et al., 2012) qui est de 8.5 en utilisant une (200 mg en doses décroissantes) de la pFSH en traitement biquotidien pendant quatre jours.

Néanmoins, la proportion des embryons transférables dans cette étude a été réduite dans le protocole de trois injections de la pFSH, qui suggère que l'injection établie en une par jour seule de la pFSH peut amener à diminuer le nombre des embryons transférables comparant à l'injection établie en bijournalière de la pFSH. Une autre étude, **Yamamoto et al., 1992** a démontré que plus d'embryons transférables sont obtenus suite à un protocole de superovulation en utilisant une seule injection de la pFSH dissoute dans le PVP ; Poly Vinil Pyrrolidone (soit une moyenne de 7.2 d'embryons) ou à un protocole de huit injections de la pFSH en bijournalière pendant quatre jours (soit une moyenne de 5.5 d'embryons) comparant au protocole de trois seules injections journalières de la pFSH pour trois jours qui a donné (une moyenne de 3.0 d'embryons). Ainsi le résultat dans les termes de la réponse superovulatoire comme un résultat de réduire le nombre des injections de la pFSH avait varié entre ces types des études. **Benyei et barros (2001)** ont montré que le nombre d'ovulation (12.3 à 13.4) et le nombre des embryons de bonne qualité (4.8 à 5.3) n'est pas différent entre le standard (1000 UI de Pluset®) et les doses décroissantes biquotidiennes (600 UI) de FSH pendant 4 jours. La relation entre l'intervalle du temps pour l'induction d'une décharge de LH et le nombre et ou la qualité des embryons n'est pas complètement comprise. Il a été encore reporté que le faible taux de fertilité (taux des embryons transférables) peut-être une conséquence de diminution dans le nombre des follicules croissants (**Lopes et al., 2007**).

Dans cette étude, le taux des ovocytes (ovules non fécondés) a été plus haut (26.66%) que chez d'autres études précédentes qui se rangent de 23.5% à 39% chez différentes races (**Larson et al., 2010, Mikkola et al., 2005, Son et al., 2007b, et Sugano et al., 2001**).

Dans cette étude aussi, la persistance des follicules sur les ovaires serait liée à une croissance folliculaire qui perturberait l'équilibre endocrinien en assurant le maintien d'un certain taux d'œstrogène.

Finalement, la courte demi-vie de la pFSH hypophysaire nécessite des traitements biquotidiens, qui sont stressants et sujet d'erreur. Des protocoles récents du traitement ont permis la superovulation avec une seule injection ou deux injections de la pFSH 48 heures d'intervalle (**Reuben et al., 2011**).

6. Conclusion :

Ce travail nous à permis de vérifier l'effet du rythme d'injection sur la réaction ovarienne chez la vache. Plusieurs entraves ont été rencontrées lors de cette expérimentation, ce qui a eu pour conséquence une diminution du nombre des embryons viables par vache et une augmentation du nombre des ovules non fécondés. Parmi les problèmes rencontrés sur terrain on peut citer la fréquence élevée de kystes ovariens, ce qui nous a empêchés de réaliser un nombre suffisant de récoltes ainsi que des conditions inadéquates parfois de réaliser des récoltes complètes.

Néanmoins ce travail nous à permis de démontrer que malgré la diminution du nombre d'injection la réaction ovarienne reste satisfaisante avec un nombre de corps jaunes moyen de 13.25 par vache.

Recommandation :

- 1 _ Bien informer celui qui fait l'expérience avant qu'il commence afin de limiter les erreurs (la pratique se diffère un peu de la théorie).
- 2 _ Prévoir le matériel adéquat et la méthode adéquate.
- 3 _ Favoriser le travail sur des vaches moins agressives afin de limiter le stress et travailler en toute sécurité.
- 4 _ N'attendre pas plus de deux cycles successifs avant de commencer le traitement afin de gagner un peu de temps et de détecter les vaches qui présentent des anomalies sur la cyclicité pour rétablir leurs situations.
- 5 _ Refaire l'expérience sur un cheptel plus important en qualité (bonne conformation laitière ou viandeuse) et en quantité (pour juger bien le nouveau schéma à trois injections).
- 6 _ Former les éleveurs pour être connaître les diverses biotechnologies de l'embryon qui nécessitent la superovulation (production d'embryon in vivo) afin de partager l'expérience et créer des lieux de pratique que se soit étatiques ou privés.

Adams, G.P., L.F. Nasser, G.A. Bo, A. Garcia, M.R. Del Campo & R.J. Mapletoft. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology*. 42: 1103-1113.

Alkemade SJ, Murphy BD, Mapletoft RJ. 1993. Superovulation in the cow; Effects of biological activity of gonadotropins. In: Proc Ann Mtg Am Embryo Assoc Portland, Maine.

Allrich R.D. 1994. Symposium : Estrus, New Device, and Monitoring. *J. Dairy Sci.*, 77, 2738-2744

Avery, B., A. Hay-Schmidt, P. Hyttel & T. Greve. 1998. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6 - dimethylaminopurine prior to invitro maturation. *Theriogenology*. 50: 334-344.

Ball P.J.H. et Peters A.R. 2004. *Reproduction in Cattle Third Edition*. Blackwell Publishing, Oxford, 242 p.

Barati, F., Niasari_Naslaji, A.; Bolourchi, M., Sarhaddi, F., Razavi, K., Naghzali, E. and Thatcher, W.W. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*. 66, 1149-1155.

Barros, C.M. & M.G.F. Nogueira. 2001. Embryo transfer in bos indicus cattle. *Theriogenology*. 50: 1483-1496.

Benyei B, Barros CWC. 2001. The effects of FSH dose and frequency of embryo collection on superovulatory response in lactating Holstein cows. *Theriogenology* ; 55: 512 (abstract).

Bergfelt, D.R., G.A. Bo, R.J. Mapletoft & G.P Adams. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. *Animal Reproduction Science*. 49: 1-12.

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

Binelli M., Thatcher W.W., Mattos R., Baruselli P.S. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*. 56:1451-1463.

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

Bo GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* ; 42: 963-975.

Bo, G.A., G.P. Adams, M. Caccia, M. Martinez, R.A. Pierson & R.J. Mapletoft. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. 39: 193-204.

Bonnes G., Desclaude J., Drogoul C., Gadoud R., Jussiau R., Le Loc'h A, Montmeas L., Robin G. 2005. Reproduction des animaux d'élevage. 2ème édition, Dijon: Educagri éditions, 409p.

Brand, A. & D. Akabwai. 1978. Some aspects of non-surgical embryo transfer in cattle. *Veterinary Science Communications*. 2: 23-37.

BRUYAS J.F. 1991. Cycle oestral et détection des chaleurs. *Dépêche Vét.*, suppl. 19, 9-14

Callejas SS, Alberio RH, Cabodevila JA, Dulout F, Aller JF, Teruel MT. 2002. Ovarian stimulation with FSHP in multiple or single dose in polyvinylpyrrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-P and eCG. *Theriogenology* ; 57: 763 (abstract).

Chang, M. C. 1952. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. *The Anatomical Record*. 113: 143-161.

Chastant-Maillard S., Mialot J-P., Rosso V., Fournier R. 2003. « Les vagues folliculaires chez la vache. » *L'action vétérinaire*, n°1643, 15-19.

Chastant-Maillard S., Fournier R., Remy D. 2005. « Les vagues folliculaires. Actualités sur le cycle de la vache. » *Le point vétérinaire*, n° spécial : Reproduction des ruminants : maîtrise des cycles et pathologies, 36, 10-15.

Crosby, I.M., F. Gandolfi & R.M. Moor. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journal of Reproductive Fertility*. 82: 769-775.

Curtis, J. L. 1991. Cattle Embryo Transfer Procedure. ACADEMIC PRESS, INC. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. p. 1

De Sousa, P.A., A.J. Watson, G.A. Schultz & S. Bilodeau-Goeseels. 1998. Oogentic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Molecular Reproduction and Development*. 51: 112-121.

Derivaux J. 1971. Reproduction chez les animaux domestiques. Editions Derouaux, Liège, 157 p.

Donaldson LE. 1985. LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cows. *Theriogenology*, 23, 441-47.

Donaldson, L.E. 1989. Porcine, equine, and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology*. 31: 183.

Driancourt M.A., Gougeon A., Royere D., Thibault C. 1991. La fonction ovarienne.
In : La reproduction chez les mammifères et l'Homme. INRA Ellipses, 273-298.

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 : 37-47.

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

Ferguson J.D. 2005. Nutrition and reproduction in dairy herds. *Veterinary Clinics of Food Animal Practice*. 21:325-347.

Fieni F., Tainturier D., Bruyas J.-F., Battu I. 1995. « Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache. » *Bulletin des GTV n°4* : 35-49.

Galli, C., R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina & G. Lazzari. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59: 599-616.

Hamilton, W.J. 1946. Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *Journal of Anatomy*. 80: 194-204.

Hanzen C., Lourtie O., Drion P.V. 2000. « Le développement folliculaire chez la vache. Aspects morphologiques et cinétiques. » *Annales de Médecine Vétérinaire*, 144, 223-235.

Hartman, C.G, W.H. Lewis, F.W. Miller & W.W. Swett. 1931. First findings of tubal ova in the cow, together with notes on oestrus. *The Anatomical Record*. 48: 267-275.

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

Huyart C. 2004. Relation entre la qualité des gamètes femelles et la fertilité chez la vache laitière. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Nantes). N-2004-152. 150 pages.

Jaenudeen, M. R., H. Wahid and E. S. E. Hafez. 2000. Ovulation Induction, Embryo Production and Transfer. In: Hafez, E. S. E., and B. Hafez. *Reproduction in Farm Animals*.

Kanitz, Wilhelm, F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H. Nohner, & R. Pöhland. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction, Nutrition & Development*. 42: 587-599.

Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP. 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.

Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 73, 698-703.

Leibo SP. 1984. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* ; 21:767-790.

Leibo SP, Mazur P. 1978. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JC Jr, ed. *Methods in Mammalian Reproduction*. NY: Academic Press ; 179-201.

Leibo SP, Mapletoft RJ. 1998. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. In: *Proc Ann Mtg Am. Embryo Trans Assoc, San Antonio, TX* ; 91-98.

Lindner, G. M. & R.W. Wright. 1983. Bovine embryo and morphology. *Theriogenology*. 20: 407-416.

Looney CR, Boutte BW, Archbald LF, Godke RA. 1981. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology* ; 15: 13–22.

Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows, *Anim Reprod Sci*, 99, 34-43.

Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Robalo Silva J. 2001. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* ; 56: 65–77.

W. F. Lubbadeh a , C. N. Graves and S. L. Spahr. 1980. EFFECT OF REPEATED SUPEROVULATION ON OVULATORY RESPONSE OF DAIRY COWS. *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, Vol. 50, No. 1.

Macmillan, K.L. & A.J. Peterson. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and treatment of post-partum anoestrus. *Animal Reproduction Science*. 33: 1-25.

Mapletoft, R.J. 1984. Embryo transfer technology for the enhancement of animal reproduction. *Nature*. 2: 149-160.

Mapletoft RJ. 1985. Embryo transfer in the cow: General procedures. *Rev sci tech Off int Epiz* ; 4:843-858.

Mapletoft, R.J., K.B. Steward & G.P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproductive Nutrition Development*. 42: 601-611.

Martens G, Nohner HP, Leiding C, Schneider F, Becker F, Nuernberg G, Kanitz W. 2005. Optimizing frequency of FSH application for superovulatory treatment in cattle. *Reprod Fertil Dev* ; 17: 313–314 (abstract).

McDougall, S., N.B. Williamson & K.L. Macmillan. 1995. GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. *Animal Reproduction Science*. 39: 205-214.

Mialot J.P., Constant F., Chastant-Maillard S., Ponter A.A., Grimard B. 2001. « La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications. » Société française de buiatrie, Paris, 163-168.

Mikél Jensen A, Greve T, Madej A, Edqvist L-E. 1982. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG- PGF 2α treated cow. *Theriogenology* ; 18: 33–44.

Mikkola M, Mäntysaari P, Tammiranta N, Peippo J, Taponen J (2005). Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci*, 87, 193-202.

J. R. Mitchell, and G. A. Doak. 2004. The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle. Ninth Edition. Pearson Prentice Hall, New Jersey. p.3, 221, 243-327

Monget P., Fabre S., Mulsant P., Lecerf F., Elsen J.M., Mazerbourg S., Pisselt C., Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 23:139-154.

Monniaux D., Chupin D., Saumande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19:55-81.

Monniaux, D., D. Chupin, D & J. Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19: 55-82.

Monniaux, D., D. Chupin, D & J. Saumande. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19: 55-82.

NEBEL R.L. 2003. Components of a Successful Heat Detection Program. *Advances in dairy Technology*, 15, 191-203

Palasz AT, Mapletoft RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotech Advan* ; 14:127-149.

Peerayut Nilchuen, Srisuwan Chomchai and Sukanya Rattanatabtimtong. 2012. superovulation with different doses of follicle Stimulating Hormone in Kamphaeng Saen Beef Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11(5):676-680.

Picard-Hagen N., Humblot P., Berthelot X. 2005. « Synchronisation des chaleurs chez les bovins. Principes et facteurs de variation des résultats. » *Le Point Vétérinaire*, n° spécial : Reproduction des ruminants : maîtrise des cycles et pathologies, 2005, 36, 28-31.

Picard-Hagen N., Gayrard V., Berthelot X. 2008. « La physiologie ovarienne chez la vache : nouveauté et applications. » *Journées Nationales des GTV*, Nantes, 43-54.

PIN D. 1999. La reproduction bovine (Première partie). *Action Vét.*, 1469, 12-19.

Ponsart C. 2003. Le cycle fait des vagues. *Bulletin technique de l'insémination artificielle*. 10:23-25.

G.N. Purohita, Dinesh Kumar, S. Vyas¹, M. Gaur, R.C. Yadav, K.A. Gupta² and S.S. Sharma. 2006. Superovulation and Embryo Recoveries in Rathi (BOS INDICUS) Cattle: Effect of Equine Chorionic Gonadotropin or Porcine FSH. *Indian J. Anim. Res.*, 40 (2): 164 - 166, 2006

Pursley, J.R., M.O. Mee & W.C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*. 44: 915-923.

Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* ; 313:573-575.

Rasad, S. D. 2004. Teknologi Reproduksi Ternak. *Laboratorium Reproduksi Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Padjadjaran (Bahan Ajar)*. P. 45

Reuben J. Mapletoft and Gabriel A. Bó 6 November 2011. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle (abstract). *Reproduction, Fertility and Development* 24(1) 278-283

Robertson, I. & R.E. Nelson. 1998. Certification and identification of the embryo. *Manual of the International Embryo transfer Society*. 103-134.

Seidel, G.E.Jr. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*. 211: 351-358.

Shea, B.F. 1981. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*. 15: 31-42.

Dong-Soo SON, Chang-Yong CHOE, Sang-Rae CHO, Sun-Ho CHOI, Hyun-Jong KIM and Ill-Hwa KIM. 2007a. The Effect of Reduced Dose and Number of Treatments of FSH on Superovulatory Response in CIDR-Treated Korean Native Cows. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 53, No. 6, 19045

Son DS, Choe CY, Choi SH, Rae-Cho S, Kim HJ, Han MH, Ryu IS, Suh GH, Kim UH, Kim IH 2007b. Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci*, 100, 14-21.

STEVENSON J.S. 2007. Clinical Reproductive Physiology of the Cow. In: YOUNGQUIST R.S and THRELFALL W.R (eds). *Current Therapy in Large Animal. Theriogenology*, Elsevier Saunders. St Louis, 258-270

Sugano M, Shinogi T, Nakada K, Nakao T 2001. Endocrine profiles and embryo quality in Japanese black cattle superovulated with human menopausal gonadotrophin and porcine follicle stimulating hormone. *Reprod Domest Anim*, 36, 57-63.

Sugano M, Shinogi T. 1999. Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim Reprod Sci* ; 55: 175–181.

Telford, N.A., A.J. Watson & G.A. Schultz, G.A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*. 26: 90-100.

Thibault C., Levasseur M.-C. 1991. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris : Ellipses-INRA, 768p.

Thibier, M. 2000. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year : a new record for bovine embryo transfers in vivo-derived embryos transferred. In: Wheeler, M (ed), *Embryo Transfer Newsletter*. 18:24-28.

Ushinohama K, Kamimura S, Hamana K. 1998. Ultrasonographic observation of individual follicular development in Japanese black cows superovulated with FSH. *J Reprod Dev* ; 44: 237–242.

van Wagendonk AM, den Daas JHG, Rall WF. 1996. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods : Vitrification one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* ; 48:1071-1084.

Voelkel SA, Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* ; 37:23-38.

Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.-G., Armstrong D.G. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82(E. Suppl.):E63-E74.

Willett, E.,L. W.G. Black, L.E. Casida, W.H. Stone & P.J. Buckner. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*. 113: 247.

Yamamoto M, Suzuki T, Ooe M, Takagi M, Kawaguchi M. 1992. Efficacy of single vs. multiple injection superovulation regimens of FSH using polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* ; 37: 325 (abstract).

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

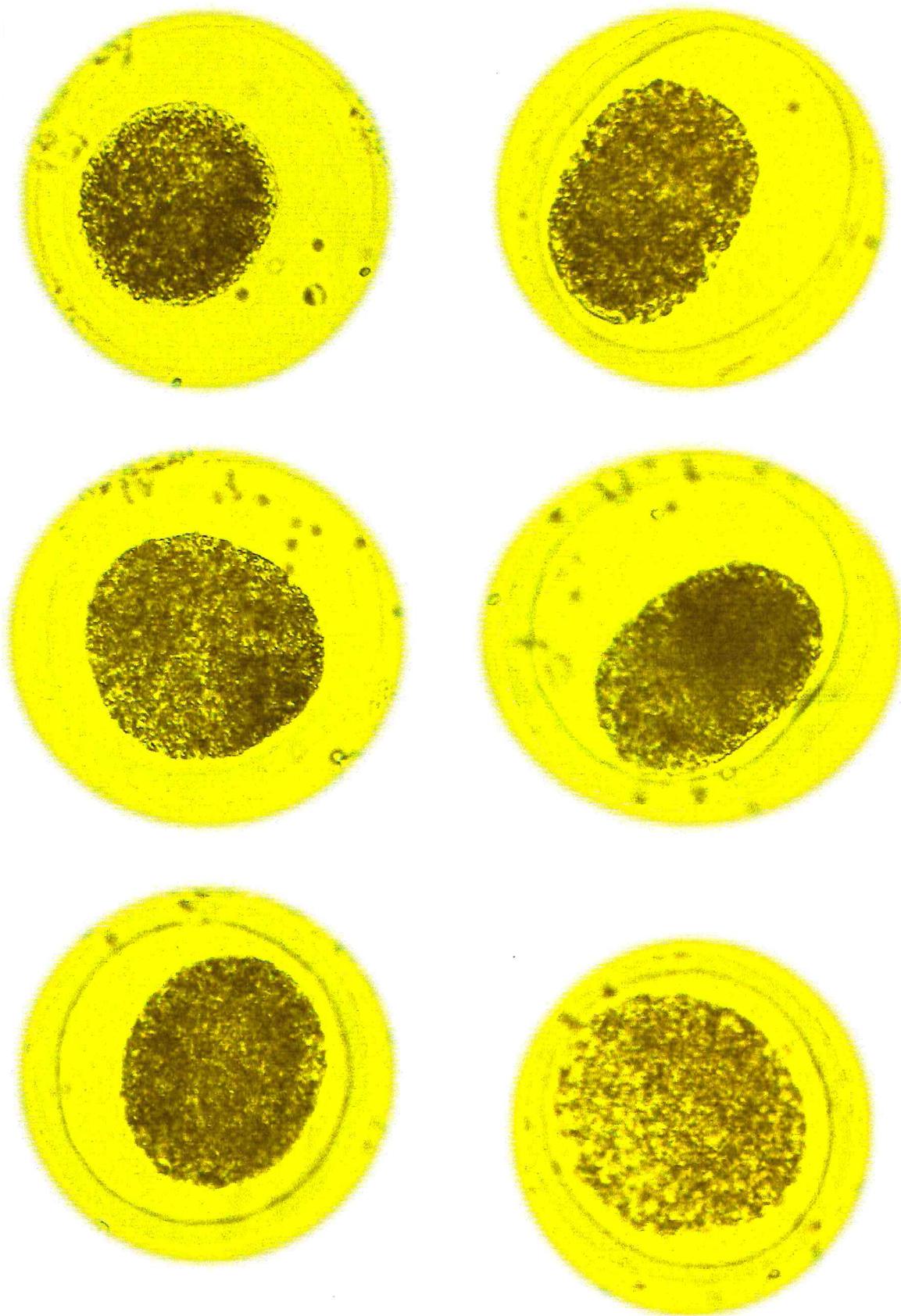


Photo 05 ; Les ovules non fécondés issus de la vaches 08001

