

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université Saad DAHLAB Blida

Faculté des sciences agro-vétérinaires et Biologiques

Département des Sciences vétérinaires

## Mémoire

En vue de l'Obtention d'un Magister En Sciences Vétérinaires  
Option : reproduction

Sujet :

Etude des Réponses du Traitement de Superovulation chez la  
Vache en vue du Transfert  
Embryonnaire

Présenté par : Mr AMAL MOKANECI



### Membres de Jury :

Président de Jury : Mme KHEMMAR F, professeur , USTHBab-Ezzouar

Examineurs : Mr BOUYOUCHEF A, maître de conférences Université de Blida

Mr FERROUK M chargé de cours Université de Blida

Mr KHELEF D chargé de cours, Ecole vétérinaire El Harrachi

Promoteur : Mr LAFRI M , chargé de cours Université de Blida

Co-promoteur : Mr KAIDI R , maître de conférences Université de Blida

Année 2002 - 2003

## Table des matières

<b>Abréviations :</b> .....	<b>8</b>
<b>Dédicaces</b> .....	<b>9</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>10</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>11</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>El lo abstracto</b> .....	<b>13</b>
<b>Introduction générale :</b> .....	<b>14</b>
<b>Problématique :</b> .....	<b>15</b>
<b>Objectifs :</b> .....	<b>16</b>
<b>Partie Bibliographique</b> .....	<b>17</b>
<b>CHAPITRE I:</b> .....	<b>18</b>
<b>1. LA FOLLICULOGENESE.</b> .....	<b>18</b>
<b>I. La dynamique de la croissance folliculaire :</b> .....	<b>18</b>
<b>II. Les phases de la folliculogénèse :</b> .....	<b>18</b>
1. La phase fœtale :.....	19
2. La phase pré-pubertaire :.....	19
3. La phase pubertaire ou adulte :.....	19
a) Phase de croissance :.....	20
b) Phase de maturation : .....	21
□ Maturation nucléaire de l'ovocyte : .....	21
□ Maturation cytoplasmique : .....	22
c) Phase de recrutement : .....	23
d) Phase de sélection : .....	24
e) Phase de dominance : .....	24
f) Atresie folliculaire : .....	24
<b>CHAPITRE II:</b> .....	<b>28</b>
<b>2. LA REGULATION DE LA FOLLICULOGENESE.</b> .....	<b>28</b>
<b>I. La régulation de la folliculogénèse :</b> .....	<b>28</b>
1. Phase gonadotrope indépendante : .....	28
2. Phase gonadotrope dépendante : .....	28
3. Contrôle hormonal durant le recrutement : .....	28
a) Rôle de la FSH : .....	29
b) Rôle de la GH : .....	29
c) Rôle des facteurs de croissances: .....	30
4. Contrôle hormonal durant la sélection : .....	30
5. Contrôle hormonal durant la dominance : .....	31
<b>II. Les facteurs influençant la folliculogénèse :</b> .....	<b>33</b>
1. Effet de l'alimentation : .....	33
a) Effets sur la croissance folliculaire : .....	33

b) Mécanisme d'action : .....	33
<input type="checkbox"/> Gonadolibérine et gonadotrophines : .....	33
<input type="checkbox"/> L'insuline : .....	34
<input type="checkbox"/> L'Insulin Growth Factor : .....	34
<input type="checkbox"/> La leptine : .....	35
2. Effet de la succion du pis: .....	35
3. Effet de l'imprégnation de la P4 pendant la gestation : .....	36
4. Le caractère dystocique. ....	36
<b>CHAPITRE III: .....</b>	<b>37</b>
<b>3. L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-</b>	
<b>GONADIQUE. ....</b>	<b>37</b>
<b>I. Introduction : .....</b>	<b>37</b>
<b>II. L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien : .....</b>	<b>37</b>
1. Développement embryonnaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire : .....	37
2. L'activité de l'axe pendant la période adulte: .....	37
a) Les rétrocontrôles de l'axe et la cyclicité : .....	38
<input type="checkbox"/> Feedback négatif : .....	38
<input type="checkbox"/> Feedback positif : .....	39
<b>CHAPITRE IV: .....</b>	<b>40</b>
<b>4. LE CYCLE ŒSTRAL. ....</b>	<b>40</b>
<b>I. Introduction : .....</b>	<b>40</b>
1. Mécanisme endocrinien du cycle sexuel : .....	40
2. Le cycle œstrien : .....	40
3. Le cycle utérin : .....	41
4. Les manifestations de chaleurs: .....	41
a) Phase de préparation (de 6 à 10 heures) : .....	42
b) Phase de chaleurs vraies (de 16 à 18 heures) : .....	42
c) Phase de fin de chaleurs : .....	42
<b>CHAPITRE V: .....</b>	<b>43</b>
<b>5. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</b>	
<b>PRECOCE. ....</b>	<b>43</b>
<b>I. L'Ovulation : .....</b>	<b>43</b>
1. Modification cytologique lors de l'ovulation : .....	43
2. Modification vasculaire au cours de l'ovulation : .....	44
<b>II. La Fécondation : .....</b>	<b>44</b>
1. L'accouplement : .....	44
2. La capacitation des spermatozoïdes : .....	44
3. Pénétration du cumulus oophorus : .....	45
4. Fixation du spermatozoïde et la réaction acrosomique : .....	45
5. L'activation de l'ovocyte: .....	45
<b>III. Développement embryonnaire durant stade libre : .....</b>	<b>45</b>
La première différenciation (le stade blastocyste) : .....	46
a) Les premiers stades de l'embryogenèse : .....	47

b)	La totipotence embryonnaire : .....	47
c)	La compaction embryonnaire:.....	47
d)	Les facteurs de reconnaissance d'une gestation: .....	47
<b>CHAPITRE VI: .....</b>		<b>50</b>
<b>6. LA SUPEROVULATION.....</b>		<b>50</b>
<b>I. Introduction : .....</b>		<b>50</b>
<b>II. Définition :.....</b>		<b>50</b>
<b>III. Les différentes méthodes de superovulation :.....</b>		<b>50</b>
1.	PMSG comme agent super ovulatoire :.....	51
a)	L'utilisation du sérum anti-PMSG: .....	51
b)	L'utilisation combinée de la PMSG et la prostaglandine:.....	52
2.	Follicule stimulating Hormone FSH : .....	53
a)	Sources, doses et purification de la FSH : .....	54
b)	Meilleurs résultats : .....	55
c)	FSH recombinante bovine :.....	56
3.	Le timing de la superovulation durant le cycle oestral : .....	56
4.	Effet du follicule dominant sur les réponses de superovulation : .....	57
5.	Synchronisation des vagues folliculaires: .....	57
6.	Effet du follicule dominant chez les vaches de lactation :.....	58
<b>IV. Les différents protocoles de superovulation :.....</b>		<b>58</b>
1.	Traitement de Priming FSH: .....	58
2.	Traitement avec la FSH:.....	59
a)	Réduction du nombre d'injections de FSH: .....	59
b)	Traitement en une seule injection de FSH: .....	59
<input type="checkbox"/>	Formule du polyvinylpyrrolidone : .....	60
<input type="checkbox"/>	Formule d'oxyde de silicone : .....	60
<input type="checkbox"/>	Pulsed Delivery System : .....	60
<input type="checkbox"/>	GnRH est la Down-regulation hypophysaire :.....	60
<input type="checkbox"/>	Utilisation de la Somatotrophine recombinante Bovine : .....	60
<input type="checkbox"/>	Hormone de croissance et l'action de l'IGF-I : .....	61
<b>V. La méthode de l'IA pour les donneuses superovulées :.....</b>		<b>61</b>
<b>VI. Les caractéristiques des follicules préovulatoires et des ovocytes après superovulation : .....</b>		<b>62</b>
1.	Asynchronisme interfolliculaire : .....	62
2.	Défaut dans la prématuration ovocytaire : .....	62
3.	Caractéristiques des follicules préovulatoires:.....	62
4.	Défaut du pic préovulatoire de LH :.....	63
<b>VII. La répétition du traitement de superovulation : .....</b>		<b>63</b>
La répétition du traitement de superovulation : .....		63
<b>VIII. Le rendement embryonnaire lors de la superovulation :.....</b>		<b>63</b>
<b>IX. Les facteurs influençant les réponses des traitements de superovulation :.....</b>		<b>64</b>
1.	Sélection de donneuses potentielles : .....	64
2.	Intervalle post-partum : .....	64
3.	Repeat breeders et les problèmes chez la vache :.....	64
4.	L'âge :.....	65

5. Pathologie :.....	65
6. Espèces et races :.....	65
7. Nutrition et effets des saisons :.....	65
8. La variabilité individuelle : .....	66
9. L'effet du follicule dominant : .....	66
<b>X. La sélection des donneuses:.....</b>	<b>66</b>
La gestion des donneuses: .....	67
<b>XI. Récolte d'embryons :.....</b>	<b>68</b>
1. La récolte non chirurgicale (Flushing) :.....	68
a) Estimation des réponses à la superovulation :.....	69
b) Filtres et cathéters :.....	69
c) L'anesthésie Epidurale :.....	69
d) La procédure de récolte « Flushing » :.....	69
e) Dilatation cervicale chez les génisses : .....	70
f) Principe de l'intervention : .....	70
2. L'influence de la semence mâle « taureau »:.....	71
3. Défaut d'exhibition des signes de l'oestrus chez les donneuses :.....	71
4. L'effet de l'allaitement sur la qualité d'embryons :.....	71
5. Récolte embryonnaire après abattage:.....	71
6. Traitement par la Prostaglandine après la récolte : .....	72
7. Fertilité après la superovulation : .....	72
<b>XII. Classification des embryons bovins :.....</b>	<b>72</b>
1. La terminologie embryonnaire :.....	72
2. Les procédures d'évaluation et ces étapes : .....	72
3. Evaluation d'embryons de vaches superovulées :.....	75
a) La variabilité du stade des embryons récoltés :.....	78
b) La culture <i>In Vitro</i> , secours des embryons :.....	78
4. La superovulation et le développement de embryonnaire : .....	78
a) Le nombre cellulaire : .....	78
b) L'éclosion comme mesure de la viabilité des embryons :.....	78
c) Index de viabilité des embryons bovins : .....	79
<b>XIII. Augmentation de la qualité et du nombre d'embryons :.....</b>	<b>79</b>
1. Ponction du follicule dominant sous échographie : .....	79
2. Traitements hormonaux :.....	79
3. L'OPU (Ovum pick up, ou Ponction Folliculaire Echoguidée) : .....	80
<b>CHAPITRE VII:.....</b>	<b>82</b>
<b>7. LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE. ....</b>	<b>82</b>
<b>I. Introduction : .....</b>	<b>82</b>
<b>II. Le concept : .....</b>	<b>82</b>
<b>III. Les différentes procédures du transfert d'embryons :.....</b>	<b>82</b>
1. La manipulation des embryons chez les bovins :.....	82
2. La protection des embryons : .....	82
3. Le nombre embryons transférés : .....	82
4. La technique chirurgicale du transfert embryonnaire:.....	83
5. La technique non – chirurgicale du transfert embryonnaire:.....	83

a) Les facteurs influençant le succès du transfert embryonnaire non chirurgical :.....	83
<input type="checkbox"/> L'effet de la qualité des embryons :.....	83
<input type="checkbox"/> La compétence de l'opérateur :.....	84
<input type="checkbox"/> L'intérêt de l'asepsie :.....	84
<b>IV. La synchronisation donneuses – receveuses :.....</b>	<b>84</b>
1. Son importance :.....	84
2. La sélection et la gestion des receveuses :.....	84
3. Les niveaux des hormones chez les receveuses :.....	85
4. Les races indigènes, receveuses d'embryons importés :.....	85
<b>V. L'intérêt du transfert embryonnaire :.....</b>	<b>85</b>
1. Aspect sanitaire du TE :.....	86
2. Rénovation des schémas de sélection :.....	86
a) Schémas de sélection génétique MOET :.....	87
b) Les gains génétiques du MOET :.....	87
3. Aspect économique du TE :.....	88
<b>Conclusions :.....</b>	<b>89</b>
<b>Partie Expérimentale.....</b>	<b>90</b>
<b>I. Introduction :.....</b>	<b>91</b>
<b>II. Objectif du travail :.....</b>	<b>91</b>
<b>III. Matériels et méthodes :.....</b>	<b>92</b>
1. Cadre de l'étude :.....	92
2. Période expérimentale :.....	92
3. Animaux et lots :.....	92
4. La sélection des donneuses :.....	93
5. Formation des lots :.....	96
<input type="checkbox"/> Le premier lot :.....	96
<input type="checkbox"/> Le deuxième lot :.....	96
<input type="checkbox"/> Le troisième lot :.....	97
<input type="checkbox"/> Le quatrième lot :.....	97
6. Le protocole expérimental :.....	97
a) Synchronisation et la superovulation :.....	97
7. Le programme superovulatoire :.....	98
<input type="checkbox"/> Le premier lot :.....	99
<input type="checkbox"/> Le deuxième lot :.....	101
<input type="checkbox"/> Le troisième lot :.....	102
<input type="checkbox"/> Le quatrième lot :.....	103
a) L'insémination artificielle ou l'IA :.....	105
b) La récolte embryonnaire :.....	105
<input type="checkbox"/> Du matériel jetable :.....	105
<input type="checkbox"/> Du matériel non jetable :.....	106
<b>IV. Résultats :.....</b>	<b>111</b>
1. Les signes de chaleurs :.....	111
2. L'évaluation des réactions ovariennes :.....	113
3. Le résultat de la récolte des 4 lots :.....	113
4. L'appréciation du code chaire :.....	118
5. Les produits de récolte:.....	119

V. Discussion :.....	121
VI. Conclusion :.....	133
VII. Recommandation & Perspectives :.....	136
Références :.....	137
ANNEXE .....	146

## Table des illustrations, tableaux & annexes

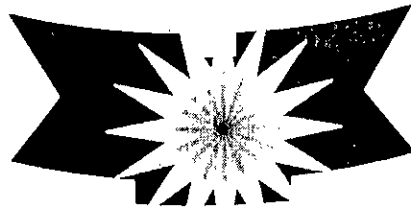
FIGURE 1-1: LES DIFFERENTES ETAPES DE LA FOLLICULOGENESE (MONNIAUX ET AL., 1999). ..	19
FIGURE 1-2 : FOLLICULE MUR DE DE GRAAF. (SCRIBAN, 1999). .....	21
FIGURE 1-3 : MATURATION NUCLEAIRE DE L'OVOCYTE DE MAMMIFERE ; EX : RUMINANTS D'APRES SZOLOS (1991). .....	22
FIGURE 1-4: MATURATION CYTOPLASMIQUE DE L'OVOCYTE (SCRIBAN, 1999). .....	23
FIGURE 1-5 : MOLECULES MODULATEURS DANS LA MATURATION CYTOPLASMIQUE DE L'OVOCYTE, (STIMULATEUR + .....	23
FIGURE 1-6 : L'ATRESIE FOLLICULAIRE AU NIVEAU CELLULAIRE (THIBAUT ET AL., 2001). .....	26
FIGURE 1-7 : LE PHENOMENE DE L'ATRESIE FOLLICULAIRE (MONNIAUX ET AL., 1999). .....	27
FIGURE 2-1 : CYCLE OESTRAL CHEZ UNE VACHE AVEC LE PROFILE HORMONAL SERIQUE (ENNUYER, 2000). .....	29
FIGURE 2-2 : LA CONCENTRATION FSH ET P4 DURANT UNE VAGUE OVULANTE (ENNUYER, 2000). .....	31
FIGURE 2-3 : STEROÏDOGENESE DANS UN FOLLICULE EN STADE IMMATURE PUIS MATURE (ROCHE, 1996). .....	32
FIGURE 3-1: L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-OVARIEN ET CES DIFFERENTS FEEDBACK. (A.R PETERS & P.S.H BALL, 1994). .....	39
FIGURE 5-1 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA FECONDATION ET L'ACTIVATION OVOCYTAIRE (CROSET ET AL, 1991). .....	46
FIGURE 5-2 : LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE CHEZ LE BOVIN (SCRIBAN, 1999). .....	48
FIGURE 5-3: DIALOGUE MERE EMBRYON (SCRIBAN, 1999). .....	49
FIGURE 6-1 : PROTOCOLE DE SUPEROVULATION PAR LA PMSG ET ANTI-PMSG LORS D'UN CYCLE NORMAL, D'APRES NIBART (1991). .....	52
FIGURE 6-2 : PROTOCOLE DE SUPEROVULATION PAR LA PMSG ET ANTI-PMSG LORS D'UN CYCLE MAITRISE, D'APRES NIBART (1991). .....	52
FIGURE 6-3 : COURBE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES PERIPHERIQUES D'OESTRADIOL, PROGESTERONE, LH, CHEZ UNE VACHE AYANT REPONDU AU TRAITEMENT DE SUPEROVULATION PAR LA FSH-P (NIBART ET AL., 1988). .....	56
FIGURE 6-4 : PROTOCOLE DE SUPEROVULATION PAR LA FSH-P DANS UN CYCLE MAITRISE, D'APRES NIBART (1991). .....	58
FIGURE 6-5 : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE CHEZ LA VACHE SUPEROVULEE D'APRES MAPLETOFT (1986). .....	70
FIGURE 6-6 : LA SONDE DE FOLLEY (SONDE A 2 VOIES). .....	70
FIGURE 6-7 : DIFFERENTES PHASES EMBRYONNAIRES, A : OVOCYTE NON FECONDE, B : MORULA COMPACTEE, C : BLASTOCYSTE, D : BLASTOCYSTE EN ECLOSION. (SEIDEL ET AL., 1991). .....	77
FIGURE 6-8 : PROTOCOLE CANADIEN DE LA SUPEROVULATION ASSOCIEE A LA L'OPU (GUILBAULT ET AL., 1996) .....	80
FIGURE 7-1 : SYNCHRONISATION DONNEUSES-RECEVEUSES POUR LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE (SOLTNER, 1993). .....	85
FIGURE 4 : LES EFFETS DU DEFICIT ENERGETIQUE SUR LA REPRODUCTION SELON (MIALOT ET GRIMARD). .....	124

TABLEAU 1-1 : LES CHANGEMENTS METABOLIQUES ET BIOCHIMIQUES LORS DE L'ATRESIE (MONNIAUX ET AL., 1999).....	25
TABLEAU 6-1:IMPORTANCE DE LA REPARTITION DES DOSES DE PFSH PAR INJECTION (CHUPIN ET PROCUREUR, 1983).....	54
TABLEAU 6-2 : EFFET DE LA DOSE FSH INRA-SANOFI SUR LE TAUX D'OVULATION ET LA PRODUCTION D'EMBRYONS TRANSFERABLES CHEZ LES BOVINS (CHUPIN, 1988).....	54
TABLEAU 6-3 : EFFET DE LA DOSE DE FSH BURNS-BIOTEC SUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ LES BOVINS (DONALDSON, 1984). ....	54
TABLEAU 6-4 : PROGRAMME DE SUPEROVULATION UTILISE CHEZ LA VACHE D'APRES MAPLETOFT (1986).....	57
TABLEAU 6-5 : LES STADES DE DEVELOPPEMENT EMBRYONNIQUE NORMALE EN FONCTION DU JOUR DE L'OESTRUS D'UNE DONNEUSE (SEIDEL ET AL., 1991). ....	74
TABLEAU 6-6 : LES TAUX DE GESTATION DES EMBRYONS CLASSES DANS 4 GROUPES BASES SUR LA MORPHOLOGIE(SEIDEL ET AL., 1991). ....	75
TABLEAU 6-7 : NOTATION D'EMBRYONS DE VACHES SUR DES BASES ET DES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES (D'APRES KENNEDY ET AL., 1983).....	76
TABLEAU 6-8 : LES CRITERES EMPLOYES DANS L'EVALUATION DES EMBRYONS DE VACHES D'APRES LES TRAITS MORPHOLOGIQUES (LONERGAN, 1992). ....	77
TABLEAU 6-9 : INFLUENCE DE LA PONCTION DU FOLLICULE DOMINANT SUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS, VIABLES ET CONGELABLES, PAR DES GENISSES CHAROLAISES SUPEROVULEES PAR FSH (STIMUFOL, RM) (COMBARNOUS ET AL., 1997).....	79
<hr/>	
ANNEXE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACTIVATION DU MPF (SCRIBAN, 1999). ....	147
ANNEXE 2 : PHENOMENE D'APOPTOSE (MONNIAUX ET AL., 1999). ....	148
ANNEXE 3 : LES VOIES DE LA STEROÏDOGENESE SEXUELLE (THIBAUT ET AL., 2001).....	149
ANNEXE 4 : SYNTHESE DES OESTROGENES A PARTIR DES ANDROGENES (THIBAUT ET AL., 2001). ....	150
ANNEXE 5 : REGULATION DE LA STEROÏDOGENESE PAR LES HORMONES GONADOTROPES (THIBAUT ET AL., 2001). ....	151
ANNEXE 6 : AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-OVARIEN (SCRIBAN, 1999).....	152
ANNEXE 7 : PROFILE HORMONALE CHEZ LA VACHE DURANT UN CYCLE OESTRAL (SCRIBAN, 1999). ....	153
ANNEXE 8 : FOLLICULE PEU AVANT L'OVULATION (THIBAUT ET AL., 1991). ....	154
ANNEXE 9 : LE PHENOMENE OESTRALE CHEZ LA VACHE (ROCHE, 1996). ....	155
ANNEXE 10 : FOLLICULOGENESE.....	156
ANNEXE 11 : EMBRYOGENESE.....	157
ANNEXE 12 : PHENOMENE DE LA DEVIATION (D'APRES GINTHER ET AL., 1996) ....	158
ANNEXE13 : SYSTEMES DE FEEDBACK POSITIFS ET NEGATIFS INTRA-FOLLICULAIRE DANS L'OVAIRE DES RUMINANT. (ARMSTRONG ET AL., 1997). ....	159
ANNEXE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE POSSIBLE REGULATION DE DEVELOPPEMENT FOLLICULAIRE PREANTRAL BASE SUR DES OBSERVATION <i>IN-VITRO</i> ET <i>IN-VIVO</i> . (VAN DEN HURK ET AL., 1997).....	160
ANNEXE 15 : MECANISMES DE CONTROLE DE LA PRODUCTION D'ŒSTRADIOL DANS LE FOLLICULE EN RECRUTEMENT ET LE FOLLICULE DOMINANT (MONGET ET MONNIAUX, 1995). ....	161
ANNEXE 16 : FACTEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIES EXPRIMES PAR LES CELLULES FOLLICULAIRES : ACTIONS DE TYPE PARACRINE SUR LA SURVIE, LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES DE GRANULOSA <i>IN VITRO</i> (MONNIAUX ET AL., 1999). ....	162



## Abréviations :

- 6-DMAP: 6-diméthyl-aminopurine.  
A : Androgènes.  
ACTH : Adrenocorticotropique hormone.  
ADNc: acide désoxyribonucléique codant.  
AMH : hormone anti-Müllérienne.  
BMP-15: Bone Morphogenetic Protein 15.  
CBG: corticostéroïdes binding globulin.  
CL, CJ : Corps jaune.  
CRF : Corticotrope releasing factor.  
DA : Dopamine.  
DF : Dominance fonctionnelle.  
DM : Dominance morphologique  
E.M: l'éminence médiane.  
E2 : Oestradiol 17 $\beta$ .  
ECM: extracellular matrix.  
EGF: epidermal growth factor.  
ERE : Estradiol Regulatory Élément.  
ET, TE: Transfert embryonnaire.  
FAD : flavine adénine dinucléotide.  
FD : Follicule dominant.  
FGF: fibroblast growth factor.  
FSH : Follicle stimulating hormone.  
FSH: hormone folliculo-stimulante.  
GABA :  $\gamma$  amino-butyrique acid.  
GAP: Gonadotropin releasing hormone Associated Peptide.  
GnRH : gonadotrophin releasing hormone.  
GnRH: gonadotrophin-releasing hormone.  
GP : globule polaire.  
hCG : gonadotrophine chorionique humaine.  
hMG : gonadotrophine de la femme ménopausée  
HRE: hormone regulatory élément.  
hsp 90 : Heat shock protein 90.  
IA, AI : Insémination artificielle.  
IGF: insulin-like growth factor.  
IGFBPs: IGF binding proteins .  
IGFs: insulin-like growth factors.  
InsL3 : l'insuline-like hormone 3.  
IVF : Fécondation in vitro.  
LAP: Latency-associated peptide.  
LH : hormone lutéinisante.  
LH : Luteinizing hormone.  
LH-RH: Luteinizing Hormone Releasing Hormone.  
ME : Mortalité embryonnaire.  
MEP : Mortalité embryonnaire précoce.  
MIS : Meiosis Inducing Substance.  
MOET : Multiple ovulation and embryo transfer.  
MPF: Maturation Promoting Factor ou Meiosis Promoting Factor.  
MPGF: Mâle Pronucleus Growth Factor.  
ARNm ou mRNA: acide ribonucléique messagé.  
MSF: Meiosis Stabilizing Factor  
MTOC : Centre organisateurs des microtubules  
NADPH: nicotinamide dinucléotide phosphate.  
NF : Non fécondé.  
NPY: le neuropeptide Y.  
OMI : Oocyte Meiosis Inhibitor.  
OVL: Organe vasculaire de la lame terminale.  
P4 : Progestérone.  
PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide.  
PBS : Phosphate-buffered saline.  
PKA : Protéine Kinase A.  
PMSG/eCG: Pregnant Mare Sérum Gonadotrophin.  
POMC : précurseur de la  $\beta$  End.  
SBP ou SHBG: stéroïde binding plasma.  
T : Testostérone.  
TGF: transforming growth factor.  
TNF: tumor necrosis factor.  
 $\beta$  End :  $\beta$  Endorphine.  
VIP : Peptide Vaso-actif intestinale.  
CRE : Cyclic AMP Responsive Element.  
FRP: Follicle Regulatory Protein.  
FSP: FSH Suppressing Protein.  
CRH : Corticotropin Releasing Hormone.  
 $\alpha$  MSH: Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone.  
EOP: Endogenous Opioid Peptides.  
BE : Bouton embryonnaire.  
MCI : Masse cellulaire interne.  
IFN $\tau$  : Interféron  $\tau$  (tau) ou trophoblastine.  
oTP : Trophoblastine ovine.  
rBST : STH bovine recombinante.  
IM : Intra Musculaire.  
IV : Intra Veineuse.  
SC : Sous cutané.  
DMSO : diméthylsulfoxyde.  
IETS : International Embryo Transfer Society.



## Dédicaces

*A mon défunt Grand père, pour ces conseils.*

*A Mr Roy A., et Md Roy P., pour leurs réconforts.*

*A ma Grand-mère et ma Tante pour leurs appuis.*

*A ma chère Mère pour son encouragement.*

*A mon père, mes frères et mes sœurs pour leurs patiences.*

*A tout mes amis de la graduation : Dr Hafiz A., Ledraa S.*

*A Docteur Oudjida O., le médecin de la Famille, pour son soutien.*

## Remerciements

*Mes sincères remerciements :*

*A Dieu le tout puissant, pour se qui m'a donné comme savoir, O Seigneur fais moi don de plus de connaissance.*

*A mon promoteur et copromoteur Dr Lafri M., Dr Kaïdi R., pour leurs assistances et leurs patiences.*

*A Dr Touati K., Dr Meghni M., Mr Boudjakdji A-K., et toutes les personnes qui ont participé dans ce mémoire.*

*A tout mes amis de la postgraduation : Dr Gharbi S., Dr Yahimi AK., Dr Bouhnifia M., Dr Moumen AN., et ce que je n'ai pas cité.*

*A tout mes amis du cercle informatique Selmouni S., Taïbi M., Hamdani T, Mohamed et à tout le monde que j'ai connu de loin ou de près.*

*Dieu Soit Loué.*

## Résumé

La superovulation est une biotechnologie qui a pour but, de produire plus d'embryons ou d'ovocytes à partir d'un animal de haute qualité génétique, que ceux normalement produits durant un cycle œstral ; ce cycle physiologique est sécable en deux phases : lutéale et folliculaire, le tout d'une durée de 21 jours environ chez une vache parfaitement cyclée. Lors de la période folliculaire (environ 4 jours) la vache non superovulée ne produit qu'un seul ovocyte très rarement deux, alors que lors d'une hormonothérapie adéquate visant une superovulation, la femelle traitée en produit plus d'embryons ou d'ovocyte (moyenne 5 à 6). Ainsi la superovulation est considérée comme un moyen pour amplifier le nombre d'ovules émis durant la période oestrale, shuntant le processus de sélection et de dominance principale responsable de l'atrésie des follicules subordonnés d'une cohorte pendant une vague folliculaire.

L'objectif principal de notre étude est la maîtrise, la mise en œuvre dans notre pays de cette biotechnologie. Notre expérience a concerné 12 vaches laitières parmi elles 7 génisses et 6 primipares, fractionnées en 4 lots de 3 animaux. Un traitement par PLUSET® (gonadotrophines hypophysaires FSHp/LHp) a été appliqué aux 4 lots ; selon un planning et un timing rigoureux sur un cycle maîtrisé grâce au PRID® (spirale de progestérone), des doubles inséminations artificielles en employant deux paillettes à chaque fois ont été faite à 56 h et 68 h de l'injection de PROSOLVIN® (PGF2 $\alpha$  de synthèse) et du retrait des spirales de progestérone ; ensuite une récolte non chirurgicale «Flushing » et une évaluation puis une classification sous microscope des produits a été pratiquée. La réponse au traitement superovulatoire a été inventoriée en premier lieu via le fouillé rectal dont la palpation ovarienne, pour rechercher et compter les corps jaunes, ces derniers étaient supérieurs à ceux rencontrés physiologiquement 74 – 77 versus ~12 pour 12 vaches sans traitement sauf, que les résultats sur les produits de récolte étaient défavorables environ 8 ovocytes non fécondé et 3 embryons dégénérés pour les lots 3 et 4. Une exploration complète des différents facteurs influençant la réponse superovulatoire qui soit intrinsèque ou extrinsèque doit être envisagée. Ainsi leurs contrôles et maîtrises apporterait plus de lumière à la superovulation, en faveur des résultats plus positifs ; cependant d'autres expérimentations doivent être fait dans ce sens pour une amélioration des données de base surtout celles qui concerne notre pays, celles-ci constitueraient la littérature scientifique manquante chez nous, de se fait une infrastructure pour le développement de ces biotechnologies embryonnaires modernes qui constituent actuellement la condition sine qua non pour l'amélioration et le développement d'une industrie d'élevage.

**Mots clés :** Superovulation, l'atrésie, gonadotrophines, Flushing, facteurs intrinsèques et extrinsèques, biotechnologies de l'embryon.

### **Remerciements :**

*Spéciales remerciements au laboratoire Calier (Espagne) pour son don gracieux d'hormones type PLUSET® (FSHp/LHp) Gonadotrophines hypophysaires.*

*Au Dr MEGHNI et à Mr BOUDJAKDJI personnels du CNIAAG «Centre national d'insémination artificielle et de l'amélioration génétique» pour leurs matériels et leurs aides dans cette expérimentation.*

*Au Dr K. TOUATI pour son aide généreuse, par son expérience et sa grande technicité lors de la récolte embryonnaire.*

*A Mr TOUAHRIA pour sa ferme et ses animaux.*

# Abstract

The superovulation is a biotechnology which aims, to produce more embryos or ovocytes from animal of high genetic quality, which those normally produced during an oestrous cycle ; this physiological cycle is divisible in two phases: luteal and follicular, the whole of one lasted about 21 days of perfectly cycled cow, during follicular period (about 4 days) the cattle wasn't superovuled which produce only one oocyte and very rarely two, while during an adequate hormono-therapy aiming at a superovulation, the female treated produces of them more embryos or ovocytes (average 5 - 6), so the superovulation is considered as a means to amplify the number of ovums emitted during the oestrous period, shunting the process of selection and dominance, which are a principal responsible for the atresia of the follicles subordinates of a cohort during a follicular wave.

The main objective of our experimental study is mastery and the implemented in our country of this biotechnology, for this intention the experience concerned 12 dairy cows among them 7 heifers and 6 cattles in first lactation (primipares), split in 4 share of 3 animals, a treatment by PLUSET® (gonadotrophin, FSHp / LHp from the hypophysis) was applied to 4 shares, according to a schedule and a rigorous timing on a cycle controlled due to the PRID® (progesterone's spiral), double artificial inseminations by using two straws each time were made at 56 hours and 68 hours from injection of PROSOLVIN® (synthesis's PGI<sub>2</sub>α) and of the withdrawal of the spirals of progesterone, then a non-surgical recovery procedures "Flushing" and an evaluation then a classification under microscope of products was practised, the response to the superovulation treatment was inventoried first per rectum with the ovaries palpation , to seek and to count corpus luteum, were superior in this meeting physiologically 74 - 77 versus ~12 for 12 cows without safe treatment, these last ones of which results on the products of harvest were unfavourable about 8 ovocytes not fertilized and 3 embryos degenerated for shares 3 and 4, a complete investigation of various factors influencing response of superovulation treatment which is intrinsic or extrinsic has to be to envisage, so their controls and masteries would bring more light to the superovulation, in favour of more positive results; However the other experiments must be made in sense for an improvement of the basic data especially those that concerns our country, these would constitute missing scientific literature to us, of makes an infrastructure for the development of these modern embryonic biotechnologies which establish at present indispensable condition for the improvement and the development of the livestock industry.

**Keywords:** Superovulation, atresia, gonadotrophin, Flushing, intrinsic factors and extrinsic, biotechnologies of the embryo.

## **Acknowledgement:**

*Special thanking for Calier laboratory for the graceful donation of hormone, typify PLUSET® (FSHp/LHp) hypophysis Gonadotrophins.*

*To Dr MEGHNI and mister BOUDJAKDJI, personal of the CNIAG "national Centre of artificial insemination and the genetic improvement" for their materials and their helps in our experiment.*

*To Dr K. TOUATI for the generous help by his experience and his big professional skill during the embryonic recovery.*

*To mister TOUAHRIA for his farm and his breeding.*

# El lo abstracto

El superovulation es una biotecnología que apunta, para producir más embriones u ovocytes del animal de calidad genética alta que aquéllos normalmente produjeron durante un ciclo del oestrous; este ciclo fisiológico es divisible en dos fases: el luteal y follicular, el todo de uno duró aproximadamente 21 días de perfectamente vaca del cycle, durante el periodo del follicular (aproximadamente 4 días) el ganado no era superovuled que produce sólo un oocyte y muy raramente dos. mientras durante una hormono-terapia adecuada que apunta a un superovulation, la hembra tratada produce de ellos más embriones u ovocytes (el promedio 5 - 6), para que el superovulation es considerado como un medios para amplificar el número de ovums emitidos durante el periodo del oestrous, mientras desviando el proceso de selección y dominación que son un principal responsable para el atresia del folículo subordina de una cohorte durante una ola del follicular.

El objetivo principal de nuestro estudio experimental es dominio y los llevamos a cabo en nuestro país de esta biotecnología, la experiencia involucró 12 vacas de la lechería entre ellos 7 vaquillas y 6 ganados en primera lactación para esta intención (el primipares), hiéndase en 4 porción de 3 animales, un tratamiento por PLUSET® (el gonadotrophin, FSHp / LHp del hipófisis) se aplicó a 4 porciones, según un horario y un cronometrar riguroso en un ciclo la deuda controló al PRID® (la escalera de caracol de progesterone), las inseminaciones artificiales dobles usando dos pajas cada tiempo estaban hecho en 56 horas y 68 horas de la inyección de PROSOLVIN® (el PGF2a de síntesis) y del retiro de las escaleras de caracol de progesterone, entonces un procedimientos de la recuperación non-quirúrgicos "Vaciando" y una evaluación entonces una clasificación bajo el microscopio de productos era el practised, la contestación al tratamiento del superovulation se inventarió primero por el recto con el palpation de los ovarios, buscar y contar el luteum del cuerpo, era fisiológicamente superior en esta reunión 74 - 77 contra ~12 para 12 vacas sin el tratamiento seguro, estos últimos ones de que los resultados en los productos de cosecha eran desventajosos aproximadamente 8 ovocytes no fertilizaron y 3 embriones se degeneraron para comparte 3 y 4, una investigación completa de varios factores que influyen en responce de tratamiento del superovulation que es intrínseco o extrínseco tiene que ser mirar a la cara, para que sus mandos y dominios traerían más ligero al superovulation, en el favor de resultados más positivos; Sin embargo los otros experimentos deben hacerse sobre todo en el sentido para una mejora de los datos básicos aquéllos que las preocupaciones nuestro país, éstos constituirían extrañando la literatura científica a nosotros, de hechuras una infraestructura para el desarrollo de estas biotecnologías embrionarias modernas que establecen la condición indispensable en la actualidad para la mejora y el desarrollo de la industria del ganado.

**Las palabras claves: Superovulation, el atresia, el gonadotrophin, Vaciando, los factores intrínsecos y extrínseco, biotecnologías del embrión.**

## **El reconocimiento:**

*El agradeciendo especial para el laboratorio de Calier para la donación elegante de hormona, representante PLUSET® (FSHp/LHp) el hipófisis Gonadotrophins.*

*A Dr MEGHNI y señor BOUDJAKDJI, personal del CNIAG "el Centro nacional de inseminación artificial y la mejora genética" para sus materiales y sus auxilios en nuestro experimento.*

*A Dr K. TOUATI para la ayuda generosa por su experiencia y su habilidad profesional grande durante la recuperación embrionaria.*

*Al señor TOUAHRIA para su granja y su cría.*

## Introduction générale :

Le cheptel bovin Algérien est représenté par 6,07% de l'effectif total de têtes soit 1,36 millions de têtes dont 75% est constitué de femelles. Les vaches laitières avec un effectif de 642 000 têtes représentent 53,27% de l'ensemble des femelles bovines et 47,24% du cheptel algérien. Ce cheptel est fortement présent dans la zone littorale et la zone tellienne du nord (tell, littoral, les plaines du tell et les régions montagneuses) représentées par 816 000 têtes bovines dont 607 000 têtes bovines femelles soit 74% de l'effectif national bovin total (Source : Ministère de l'agriculture, 1996).

L'objectif primordial dans un cheptel bovin, devrait être de produire un veau par vache annuellement. Le degré avec lequel un producteur peut atteindre cet objectif influencera ses bénéfices (Hamilton et Stark, 1990). Un facteur essentiel dans la production efficace d'un veau demeure un haut niveau de fertilité pour chacun des animaux reproducteurs la femelle par sa santé reproductrice, le mâle par sa bonne semence conduite grâce à l'IA. Étant donné que si un problème touche l'une des deux parties, un impact plus important sur la productivité du troupeau se fera sentir par les problèmes de fertilité chez la femelle (augmentation de l'intervalle vêlage). Ces deux causes entraînent une sérieuse perte économique pour le propriétaire du troupeau.

Les procédures modernes nommées biotechnologies de la reproduction pourraient accélérer le développement agronomique de l'Algérie et réduire la dilapidation des revenus nationaux car notre pays gaspille des millions de dollars US pour l'importation des produits animaux et leurs dérivés en tête de liste le lait. Ces biotechnologies indissociables les unes des autres, sont actuellement à l'apogée de leur utilisation dans les pays développés. On citera l'une d'elles et qui a fait l'objet de notre étude ; la superovulation qui est une méthode d'induction d'une poly-ovulation chez la vache (espèce mono-ovulatoire) pour produire plusieurs ovocytes ou embryons (la vache durant sa carrière de reproductrice produit environ 6 veaux) et de ce fait multiplier les rejetons de vaches d'élites, qui ne seront pas nécessairement portés jusqu'à terme par la vache donneuse (mère).

Cette superovulation est produite grâce à un traitement hormonal à base de gonadotrophines naturelles ou de synthèses celles-ci shunt la phase de sélection et de dominance folliculaire qui sont une conséquence naturelle et physiologique de l'espèce pour limiter le nombre d'ovocytes ovulés à un seul. La superovulation bien maîtrisée, ainsi induite donne en moyenne 5 embryons viables par vache (Scriban, 1999). Les embryons frais ou congelés issus de la superovulation sont soit transplantés à des vaches présélectionnées comme receveuses grâce au transfert embryonnaire qui permettrait la diffusion des animaux d'élites dans un troupeau de ce fait de réduire le temps de l'amélioration génétique en réduisant l'intervalle de génération d'après le MOET «*multiovulatory embryo transfer*» ; ou soit d'exporter ses embryons et donc ouvrir un nouveau marché international.

En effet, le transfert d'embryons a toutefois permis une avenue plus pratique pour l'exportation ou l'importation d'espèces désirées. Le principal avantage vient du fait que c'est le moyen le plus sécuritaire du point de vue sanitaire pour lutter contre l'introduction de nouvelles maladies dans un pays, souhaitant tout de même l'introduction de meilleures lignées génétiques ou de nouvelles espèces animales.

## Problématique :

Il est judicieux d'isoler et de découvrir les problèmes d'élevage dans nos cheptels bovins, et de les extirper pour mieux les comprendre. Il n'est pas surnois que notre pays comme tout pays en voie développement, souffre d'une dépendance extérieure alimentaire, comme celle des produits laitiers et ces dérivés, denrée animale à large consommation par une démographie grandissante, en plus de la viande qui est retrouvée sur le marché à des prix exorbitants. Ceci incite le pays à recourir à l'importation de ses produits élémentaires, à travers des pays développés, en citant la CE communauté associant les plus grands exportateurs surtout pour l'Algérie. Cette voie de compensation pèse très lourd sur le budget de l'état puisqu'elle est évaluée à 486,2 millions de dollars US pour l'importation du lait et ses dérivés et 35,1 millions de dollars US pour la viande et ceci durant l'année 2002. (Statistiques fournis par la Direction Générale des Douanes), ces problèmes très handicapants sont cités ci-dessous :

*Il est connu que la production laitière locale est de quantité et de qualité médiocre ceci est du à la mauvaise gestion des élevages, et les races d'animaux utilisés, on citera :*

- Les problèmes pathologiques en recrudescence.
- Les infertilités et le Repeat-Breeding dans nos cheptels.
- L'indisponibilité de l'aliment bétail et sous alimentation des animaux.
- Les races bovines inadéquates (mauvaises laitières).
- L'absence de professionnalisme chez les éleveurs.
- Investissement insuffisant dans les élevages.
- L'absence programme de reproduction.
- Absence de recherche biotechnologique en reproduction vétérinaire.

*Alors le pays a recouru à l'importation des animaux améliorés mais ceci n'est pas sans risque, on citera :*

- Les risques élevés d'introduction des maladies transmissibles tel que la BSE, IPV.
- Prédisposition aux maladies à cause du stress de transport.
- Les taux élevés de mortalités des animaux importés, pendant le transport et dans les lazarets.
- Les installations et les infrastructures coûteuses pour l'importation.
- L'inadaptation des animaux adultes à leur nouvel environnement et au régime alimentaire différent.



## Objectifs :

On déduit de ces différents et nombreux problèmes cités précédemment, qu'il est nécessaire de trouver des solutions plausibles et tangibles à la crise agronomique nationale, qui accable notre pays, par le gaspillage énorme de ces revenus pour combler la demande croissante de ces citoyens en denrées animales, le rendant de plus en plus dépendant, de ce fait, il est de notre devoir de rechercher de nouvelles issues à ces problèmes. Ceci par la recherche de modèle extérieur comme certains pays sous développés ayant eu les mêmes difficultés dans la production animale et puis de saisir les solutions qui ont été employées pour les résoudre, comme l'application du MOET au Kenya (Mutiga, 1992) et au Brésil (Nohner et Hahn, 1994) et dont les résultats étaient satisfaisants, ceci par l'introduction de la biotechnologie comme outil moderne de production animale.

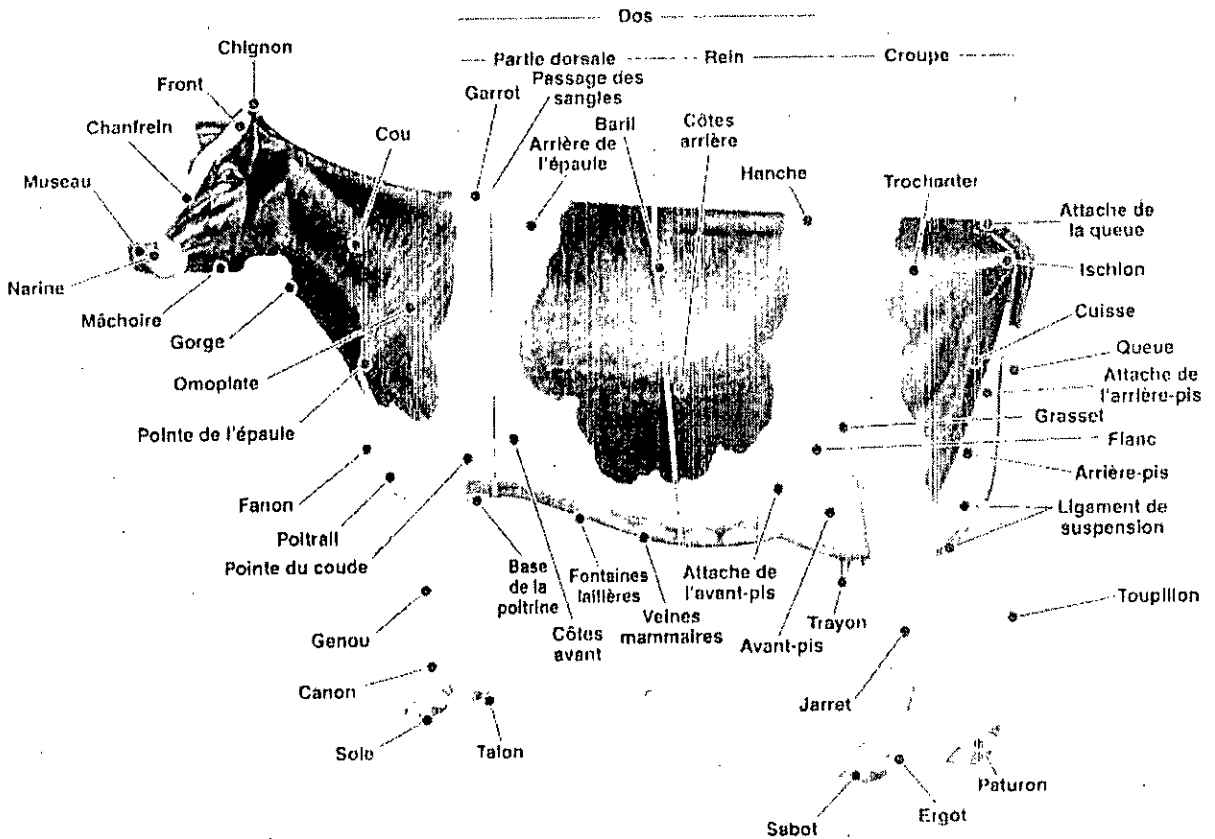
Les biotechnologies de la reproduction qui sont la superovulation et le transfert embryonnaire, connaissent durant ces dernières décennies un développement inégalable et un summum inimaginable, ceci par leur apport au nombre important de solutions pertinentes pour l'élevage moderne « *livestock industry* », qui est la pièce manquante à nos plans agronomiques. Ainsi dire il nous incombe de rattraper le grand retard dans ces sciences nouvelles, par un investissement scientifique et matériel ceci dit par un travail coopératif de toute les équipes de recherches, vu que ces biotechnologies exigent une synchronisation de tout les autres champs de recherches, pour leurs introductions et leurs applications en Algérie.

En effet notre pays doit impérativement rattraper son retard dans la production animale de qualité et de quantité, maîtrisé ses évolutions scientifiques, les rendre applicables dans les programmes et les plans agronomiques pour enfin arriver à ses objectifs. L'insémination artificielle, la superovulation et le transfert embryonnaire comme biotechnologie de la reproduction apporteront incontestablement une véritable révolution agraire longtemps souhaitée, comme celle apportée au continent occidental après la deuxième guerre mondiale.

*Notre étude a pour objectif d'amener un intérêt soigné pour la superovulation en tant que Biotechnologie de reproduction, pour cela on a ciblé les points suivants :*

1. Approfondir notre connaissance théorique sur le phénomène de superovulation.
2. L'application d'un protocole de la superovulation sur notre cheptel.
3. Etude de la réponse et de son application sur le terrain.

# Partie Bibliographique



## CHAPITRE I:

### 1. LA FOLLICULOGENESE.

L'ovaire organe paire est la gonade spécifique du sexe femelle, c'est à dire que c'est le lieu de tous les processus de la reproduction aboutissant à la production de la gamète femelle ; appelée ovocyte, ce phénomène a été décrit pour la première fois en XVII<sup>ème</sup> siècle par l'anatomiste hollandais Reinier De Graaf dans son ouvrage intitulé «*De mulierum organis generationi inservientibus tractus novus*». Les caractéristiques générales du follicule ovarien (Hanzan et al., 2000), depuis, beaucoup de points sombres dans le mécanisme de la folliculogenèse, furent enlevées et leurs énigmes résolues. Ces connaissances nouvelles ont été décisives pour les autres moyens de contrôle et de maîtrise de la reproduction des animaux domestiques surtout les animaux à intérêts économiques, et tout ceci fût permis par l'histologie et la dissection folliculaire *In Vitro* et également *in vivo* par endoscopie, laparotomie, le marquage à l'encre de chine et récemment par l'échographie (Saumande, 1991).

De toutes les données recueillis, il est actuellement admis que la fonction de folliculogenèse représente le pivot de la reproduction femelle ceci à travers l'ovaire. Ce temple folliculaire est le siège de tous les phénomènes de la folliculogenèse, de la phase fœtale, pré et post puberté, gestation et post partum. Il est connu également, que le potentiel folliculaire se fait bien avant la naissance chez l'ensemble des mammifères, un maximum de cellules gamétiques est atteint après une première phase de division et de multiplication aux environs du centième jour *in utero* chez la vache et commence à décroître progressivement jusqu'à la naissance ; à cette phase succède une phase de croissance folliculaire ; dans celle-ci, on compte : la croissance, régulation, l'ovulation et la lutéogenèse.

#### I. La dynamique de la croissance folliculaire :

Au cours du cycle sexuel et selon les espèces, la ou les vagues de croissance folliculaire sont observées uniquement pendant la période préovulatoire chez la femme, la ratte et la truie. Chez la vache et la jument, au contraire, on en observe également pendant la phase diœstrale du cycle (Fortune, 1994).

Chez la vache, une à quatre vagues par cycle ont été décrites. Habituellement et cependant, un cycle ne comporte que 2 ou 3 vagues, le follicule préovulatoire étant issu de la dernière vague (Ginther et al., 1989 ; Driancourt et al., 1991a ; Lucy et al., 1992 ; Fortune, 1993). Si trois vagues sont observées, elles débutent habituellement aux jours 2, 9 et 16 du cycle, si celui-ci n'en comporte que deux, elles apparaissent aux jours 2 et 11 du cycle (Ginther et al., 1989 ; Lucy et al., 1992 ; Van De Leemput, 1998).

La présence de 2 ou 3 vagues de croissance folliculaire entraîne des différences cliniquement décelables. Le cycle (21,5 vs 19,7 jours) et la phase lutéale (18,0 vs 16,7 jour) sont allongés si trois vagues de croissance folliculaire sont observées. De même dans ce cas la deuxième vague de croissance folliculaire apparaît plus précocement (9,4 vs 10,7 jours), le diamètre du follicule dominant de la première vague est moindre (12,8 vs 14,4 mm) et l'intervalle entre le moment où émerge le follicule dominant de la troisième vague et l'ovulation est plus court (7 vs 11 jours) (Lavoit et al., 1990 ; Ginther et al., 1989).

#### II. Les phases de la folliculogenèse :

La mise en place du potentiel folliculaire se fait bien avant la naissance, chez les mammifères. Le nombre maximal de cellules gamétiques contenues dans l'ovaire, est atteint après une première phase de multiplication, aux environs du centième jour de gestation chez la vache et décroît progressivement ensuite, jusqu'à la naissance. A cette première phase succède une phase de croissance et une phase de maturation, cette dernière concernant surtout l'ovocyte. Cette évolution ne concerne qu'un nombre réduit de follicules, la plupart d'entre eux subissant l'atrésie. La croissance folliculaire présente deux caractéristiques, elle se manifeste sous la forme de croissances et de régressions successives de plusieurs follicules appelées vagues. Chacune d'entre elles consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules de diamètre égal ou supérieur à 5mm parmi lesquels, apparaîtra le follicule dominant ; celui-ci constituée de différents types de cellules d'un ovocyte haploïde, c'est à dire à n chromosomes, c'est lui après son union avec un spermatozoïde « gamète mâle », qui

restitue le nombre diploïde de chromosomes, spécifique à l'espèce, et donnera un zygote puis après une succession de plusieurs division mitotique constituera l'embryon.

### 1. La phase fœtale :

Les cellules germinales souches après leurs migrations vers les ébauches ovariennes vont se multiplier entre le 60<sup>ème</sup> et le 170<sup>ème</sup> jour de gestation (Wandji et al., 1992). Il se forme ainsi pendant la gestation, un stock de 2 millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase I : elles se transforment ce faisant en ovocyte primaire. L'induction de la méiose serait contrôlée par un facteur d'origine mésonephrotique appelé MIS (Meiosis Inducing Substance), synthétisé par les cellules mésenchymateuses de l'ovaire. Le contact des ovogonies avec les cellules d'origine mésonephrotique est donc indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires. L'importance du stock folliculaire ainsi constitué dépend de l'espèce (16 000 chez la brebis, 235 000 chez la vache) de la race, de l'individu, de l'âge et du niveau hormonal ou du statut de reproduction (Driancourt et al., 1991a ; Peters, 1976 ; Cahill, 1981). Cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal. Chez la vache, le nombre de follicules primordiaux a été estimé à 40 000 vers l'âge de 2 à 3 ans et à 2500 entre 12 et 14 ans.

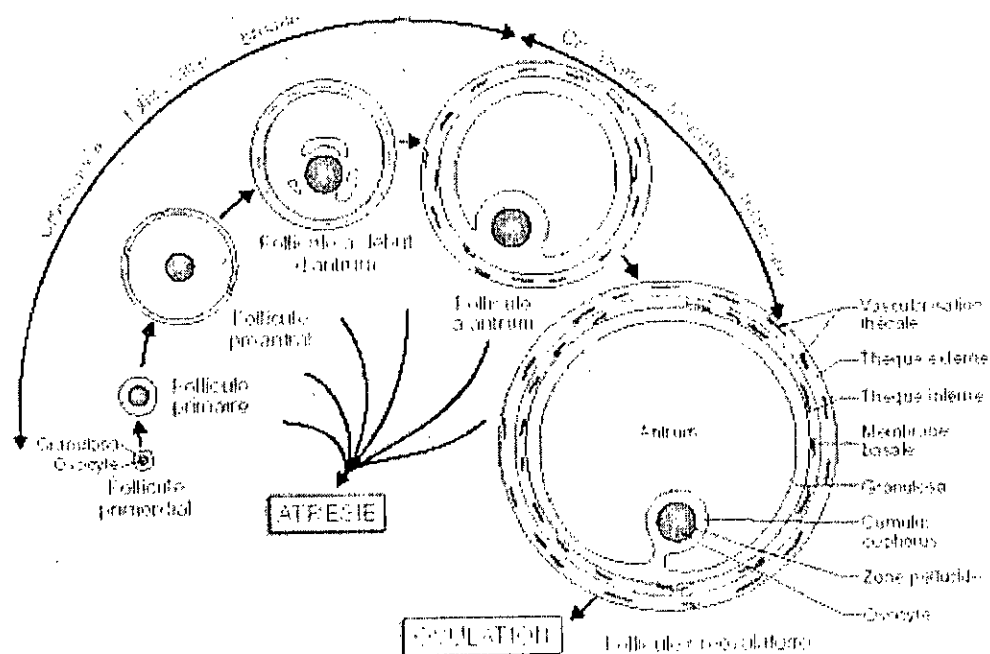
### 2. La phase pré-pubertaire :

A la naissance, le stock d'ovogonies est dans l'espèce bovine d'environ 250 000. Macroscopiquement, les ovaires ne présentent aucun follicule cavitaire. Leur nombre augmente progressivement de la 2<sup>ème</sup> à la 14<sup>ème</sup> semaine, puis demeure constant jusqu'aux environs de la 34<sup>ème</sup> semaine.

### 3. La phase pubertaire ou adulte :

Les étapes du développement des follicules sont au nombre de trois : la phase de multiplication, la phase de croissance et la phase de maturation. Elles sont indissociables du développement de l'ovocyte qu'ils renferment. L'étude descriptive de la folliculogénèse serait incomplète si elle n'envisageait pas également un processus qui concerne la majorité des follicules présents à la naissance sur l'ovaire, à savoir l'atresie folliculaire (fig. 1-1).

Figure 1-1: Les différentes étapes de la folliculogénèse (Monniaux et al., 1999).



### a) Phase de croissance :

Cette phase de croissance ne concerne que 10% du stock folliculaire. Comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et celui de l'ovulation, elle est particulièrement longue et variable selon les espèces. Chez la ratte, elle a été estimée à 21 jours soit 17 jours pour atteindre le stade cavitaire et 4 à 5 jours pour atteindre le stade ovulatoire. Chez la brebis, elle serait de 6 mois soit 130 jours pour atteindre le stade antral puis 50 jours jusqu'à l'ovulation.

Cette phase se caractérise par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme. Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordial, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaire et de De Graaf représentant les follicules antraux (Hulshof et al., 1994).

**Le follicule primordial :** Centré par l'ovocyte I, est entouré de quelques cellules folliculaires endothéliiformes. Son diamètre moyen est de 40  $\mu\text{m}$ . Habituellement localisé en périphérie de l'ovaire, il représente le stade folliculaire quiescent. L'ovocyte, de diamètre compris entre 20 et 35  $\mu\text{m}$ , se trouve bloqué au stade diplotène de la prophase de sa première division méiotique (ovocytes primaires) par un polypeptide produit par la granuleuse des follicules primaires et secondaires : l'OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor).

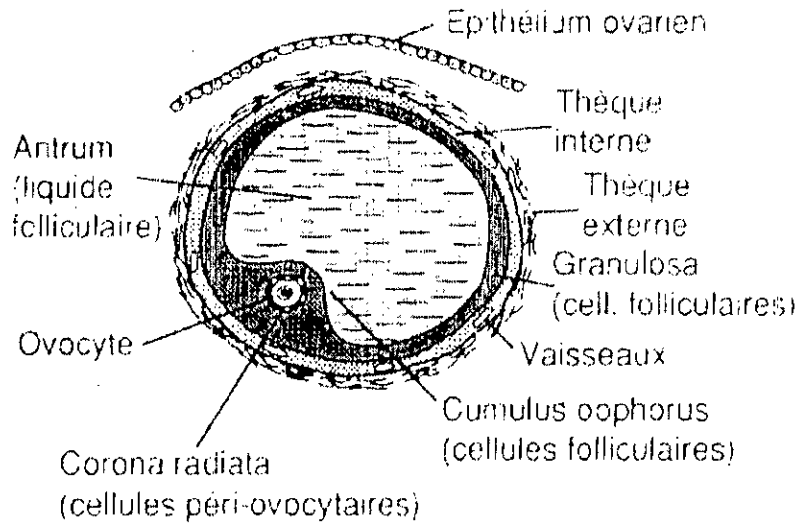
**Le follicule primaire :** Se caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par l'agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise, et sécrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse: la zone pellucide. D'une épaisseur d'une dizaine de microns, elle est constituée à 95% de trois glycoprotéines, organisées en longs filaments interconnectés, appelées ZP1, ZP2, ZP3. La ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par la ZP1. Seule la glycoprotéine ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (Yanagimachi, 1994).

**Le follicule secondaire :** L'ovocyte ici atteint son volume maximal. Il s'est entouré d'une pellucide bien différenciée et de deux ou trois couches de cellules cubiques formant la granulosa. L'ensemble est limité extérieurement par la membrane basale qui s'est transformée en membrane de Slavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de protéohéparane sulfate.

**Le follicule tertiaire :** Il est dit cavitaire ou antral en raison de l'apparition au sein des couches de cellules folliculaires de petites cavités résultant de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de la sécrétion des cellules de la granulosa. Ces cavités finissent par confluer pour former l'antrum. Le développement progressif de l'antrum entraîne la séparation des cellules de la granulosa en cellules du cumulus oophorus. Celles-ci se différencient en corona radiata, couche cellulaire entourant directement l'ovocyte. Ces cellules du cumulus et de la corona présentent de nombreuses zones fonctionnelles (GAP junction) qui constituent autant de moyens de communication entre l'ovocyte et la cavité folliculaire. Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante, compris entre 25 et 50. Il dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules, qui s'atrophient (Armstrong, 1993). A ce stade, et chez tous les mammifères, le follicule cavitaire s'entoure, en dehors de la membrane de Slavjanski, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riches en ARN et en enzymes nécessaires à la stéroïdogenèse, et par la thèque externe formée d'un tassement de tissu conjonctif du stroma ovarien.

**Le follicule mûr ou follicule de De Graaf :** Représente la phase terminale du développement folliculaire. Cette phase ne concerne qu'un follicule sur 1000 entré en croissance (Saumande, 1991). Le follicule mûr se caractérise par une taille maximale de 10mm chez la brebis et la truie et de 25mm chez la vache, par un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse. Gonflé de liquide (fig. 1-2), le follicule affleure en surface de l'ovaire. L'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et du cumulus oophorus. Les théques interne et externe sont bien différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne. La thèque interne est une glande à part entière. La thèque externe est de nature fibreuse. Une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et de la membrane basale. Chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0,13mm atteigne la taille préovulatoire. En effet, l'activité mitotique se réduit progressivement pour céder la place à une différenciation cellulaire plus importante.

Figure 1-2 : Follicule mûr de De Graaf. (Scriban, 1999).



### b) Phase de maturation :

Elle concerne surtout l'ovocyte. Cette phase représente l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte de l'aptitude à être reconnu et fusionné avec un spermatozoïde, à assurer la formation des pronuclei paternel et maternel et à permettre, grâce à ses réserves (ARNm, ribosomes, protéines élaborés pendant la phase de croissance), le début du développement embryonnaire. Elle est induite par le pic ovulatoire. Elle implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte; lorsque l'ovocyte a atteint 80% de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa maturation nucléaire proprement dite, c'est-à-dire la reprise de la méiose

**Acquisition de la compétence des ovocytes :** Pour pouvoir être fécondable, l'ovocyte, longtemps au repos dans son follicule ovarien, doit acquérir une «compétence» à la fécondation appelée maturation. Elle s'accompagne d'un certain nombre de modifications morphologiques, biochimiques et physiologiques. On peut distinguer trois sortes de transformations : la maturation nucléaire qui correspond à la capacité du noyau de l'ovocyte (de  $n$  chromosomes) à reprendre sa méiose en expulsant son premier globule polaire (GP). La maturation cytoplasmique caractérisée notamment par la possibilité du cytoplasme à décondenser le noyau du spermatozoïde et à le transformer en pronoyau mâle capable de s'unir au pronoyau femelle ; la maturation membranaire qui permet à la membrane pellucide de l'ovocyte de reconnaître spécifiquement les spermatozoïdes de son espèce.

#### ▪ Maturation nucléaire de l'ovocyte :

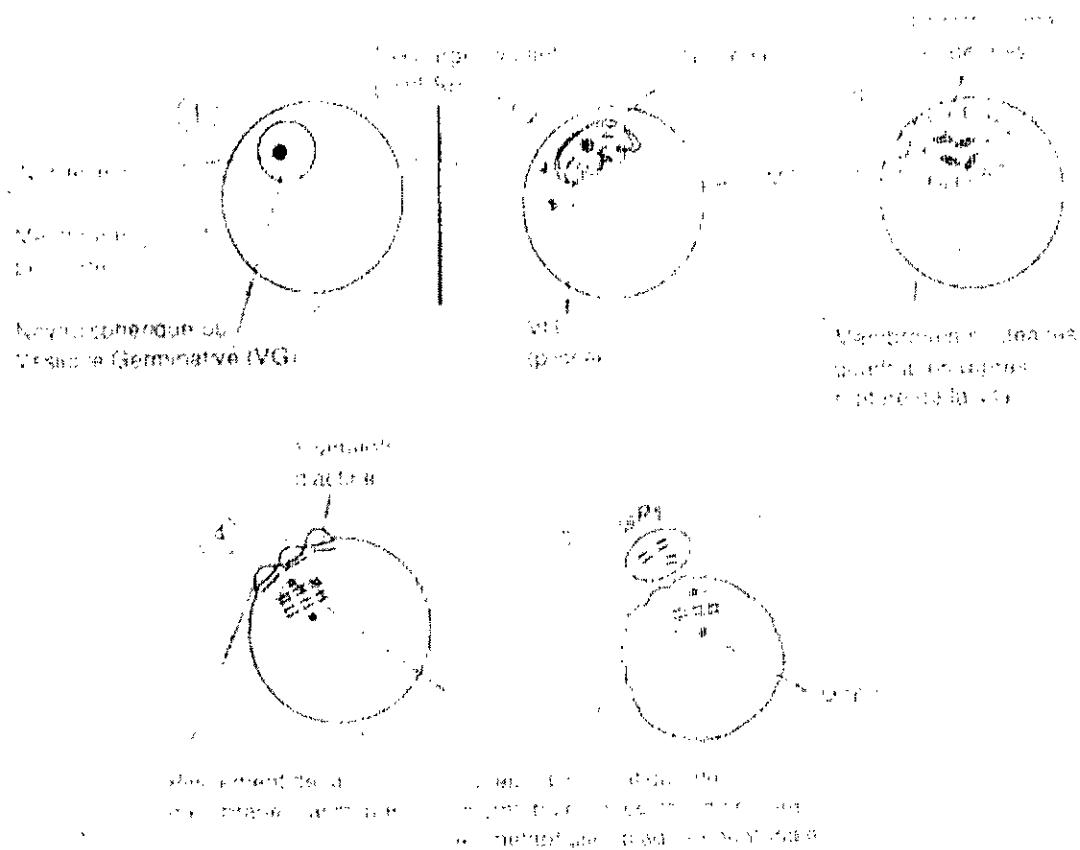
Aspects morphologiques (fig. 1-3). La maturation de l'ovocyte est caractérisée globalement par l'expulsion du 1<sup>er</sup> globule polaire (GP1) et l'arrêt de sa division en 2<sup>ème</sup> métaphase. On observe après la croissance de l'ovocyte, la différenciation des crêtes mitochondriales, le dépôt de vitellus, la synthèse d'ARNm et surtout la disparition des centrioles. Seul persiste le matériel péricentriolaire qui forme une masse filamenteuse, appelée centres organisateurs des microtubules (MTOC) qui jouent un rôle essentiel dans la formation des fuseaux méiotiques.

**Activation de la maturation nucléaire :** le MPF (Maturation Promoting Factor ou Meiosis Promoting Factor) (annexe 1). Ce facteur a d'abord été découvert chez un batracien, le xénope. Un traitement par la progestérone stimule la production de MPF qui provoque la reprise de la méiose, d'où aussi le nom de Meiosis Promoting Factor. Injecté dans des ovocytes stimulés par la progestérone, le MPF induit immédiatement la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire et la formation de deux fuseaux méiotiques. Le MPF n'est pas spécifique d'espèces et contrôle la mitose de toutes les cellules somatiques, aussi bien des batraciens que des mammifères. Il est donc très bien conservé au cours de l'Évolution. L'EGF (Epidermal Growth Factor) qui a été impliqué à la fois dans la maturation de l'ovocyte et dans les premières divisions du zygote induit la phosphorylation de MAP kinase (MAPK) dans plusieurs types cellulaires. En effet, un certain nombre d'éléments initiaux induits par la fixation de l'EGF à son récepteur comme l'autophosphorylation du

récepteur et la stimulation de plusieurs kinases ont été décrits. Plusieurs substrats de MAPK tels que le récepteur à l'EGF, les MAP, le proto-oncogène *c-fos* ont déjà été impliqués (Hanzén et al., 2000)

**Stabilisation de l'ovocyte en métaphase II : *c-mos* et MSF (Meiosis Stabilizing Factor)** Le blocage de l'ovocyte en métaphase II jusqu'à la fécondation est dû au produit cytoplasmique du proto-oncogène *c-mos*, le MSF. L'activation de l'ovocyte dépend à la fois de mécanismes impliquant des phosphorylations-déphosphorylations multiples (inhibées par la 6-DMAP, 6-diméthyl-aminopurine) et des synthèses protéiques (inhibées par la puromycine). Ces deux drogues peuvent bloquer indépendamment la condensation des chromosomes et, par suite, la reprise de la méiose. Chez les mammifères (vache, brebis, lapine, truie), excepté la souris, ces synthèses protéiques exigent la production d'ARN à l'intérieur des cellules de la corona radiata, permettant notamment la synthèse d'une cycline (Moor et Galli, 1991). On comprend donc pourquoi la couche de cellules folliculaires péri-ovocytaires est nécessaire à la reprise de la méiose *in vitro* chez la plupart des mammifères autres que la souris (Hanzén et al., 2000).

Figure 1-3 : Maturation nucléaire de l'ovocyte de mammifère : Ex : Ruminants d'après Szolosi (1991).



#### ▪ Maturation cytoplasmique :

**Migration des granules corticaux :** Cette maturation du cytoplasme est caractérisée par la migration des granules corticaux à partir de l'appareil de Golgi, contre la membrane plasmique (fig. 1-4, fig. 1-5). Ils jouent un rôle prépondérant au moment de la fécondation, après l'entrée du premier spermatozoïde, en s'opposant à la pénétration des autres pour éviter la polyspermie. Présents dans l'ovocyte de tous les mammifères, ils sont fixés à la membrane plasmique par une protéine du cytosquelette, la calpactine, qui intervient dans les mécanismes d'exocytose. D'ailleurs, la libération des granules corticaux entraîne un durcissement de la membrane pellicule défavorable à la fécondabilité ultérieure de l'ovocyte, ce qui est fondamental dans le mécanisme de fécondation de l'ovocyte par un seul spermatozoïde. La maturation cytoplasmique comporterait l'acquisition d'un facteur protéique mal identifié : le MPG (Mâle Pronucleus Growth Factor), responsable de la décondensation de la chromatine et des modifications des protéines nucléaires.

**Maturation membranaire :** C'est la propriété de la membrane pellicule à reconnaître spécifiquement les spermatozoïdes capables de son espèce. Ce serait essentiellement l'acquisition de parties

glycosylées des protéines de la membrane pellucide (ZP3 84 Kda) qui seraient responsables de cette première reconnaissance du gamète mâle. La maturation de la membrane pellucide est assez tardive et serait sous le contrôle de la corona radiata chez les rongeurs.

Figure 1-4: Maturation Cytoplasmique de l'ovocyte (Scriban, 1999).

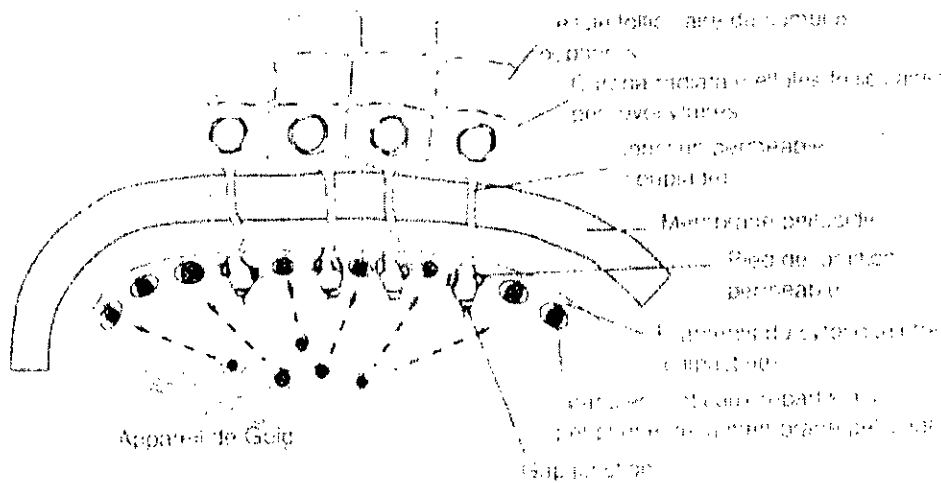
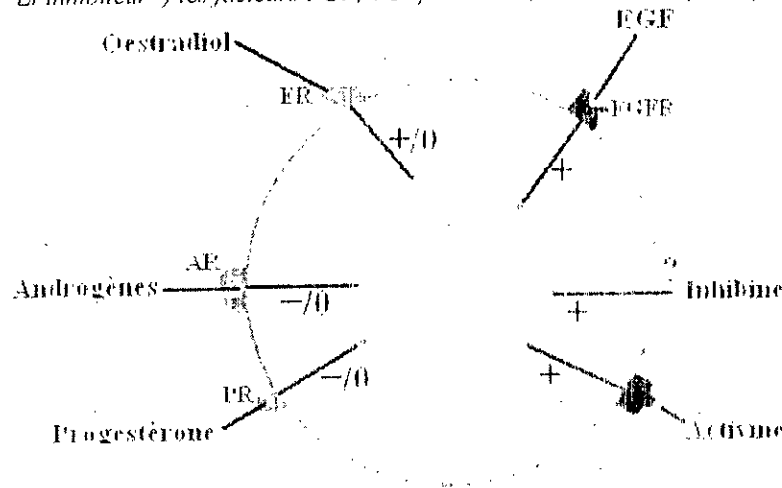


Figure 1-5 : Molécules modulateurs dans la maturation cytoplasmique de l'ovocyte. (stimulateur + Et inhibiteur -) les facteurs FGF, TGFβ et IGF-1, IGF2 ne sont pas représentés (Driancourt et al., 1998).



**c) Phase de recrutement :**

C'est en 1980 que Di Zerega et Hodgen ont, pour les primates, proposé les concepts de «recrutement, sélection et dominance». Leurs études histologiques *in vitro* ont par la suite été confirmées *in vivo* chez la vache par échographie et chez la brebis par marquage à l'encre des follicules.

Le terme *recrutement* s'applique à tout follicule qui a dépassé le stade auquel habituellement la plupart des follicules deviennent atreétiques (Fortune, 1994). Il concerne donc tout un ensemble de follicules entamant dans un environnement d'influence gonadotrophique une maturation susceptible de les conduire à l'ovulation. Ce n'est pas un phénomène isolé ou lié au hasard. Habituellement, il concerne chez les ruminants 2 à 5 follicules de taille comprise entre 3 et 6 mm (Driancourt et al., 1991a). Le recrutement d'un nombre de follicules supérieur à celui nécessaire constituerait une garantie qu'au moins un follicule se trouve dans les conditions optimales de développement et de sensibilité à l'action de concentrations minimales de FSH (Fortune, 1994). Il a en effet été démontré que la destruction d'un follicule dominant au début ou en fin d'une vague de croissance folliculaire retardait dans le premier cas la régression des follicules de taille directement inférieure et entraînait dans le second cas un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante. La disparition du follicule dominant se traduirait par une réaugmentation de l'hormone FSH qui permettrait au second follicule de devenir dominant à son tour (Fortune, 1994) (annexe13, 12, 15).



#### **d) Phase de sélection :**

La sélection, fait référence au processus par lequel parmi les nombreux follicules en croissance, seuls arriveront au stade préovulatoire des follicules en nombre caractéristique de l'espèce ou de la race. Cette notion trouve sa confirmation dans la constance du nombre d'ovulations malgré la diversité quantitative et qualitative de la population folliculaire entre individus. L'atrésie joue un rôle essentiel dans cette sélection (annexe 2).

Cette phase, la sélection se caractérise par une diminution de la concentration de la FSH et par une augmentation progressive de la synthèse d'œstradiol (annexe 12). résultat de l'augmentation de la fréquence des décharges pulsatiles de l'hormone LH responsable de la synthèse accrue d'androgènes par la thèque interne (Driancourt et al., 1991a). L'augmentation de l'œstradiol et plus précisément du rapport entre œstradiol et androgènes constitue une caractéristique de la dominance fonctionnelle du follicule en croissance (Sunderland et al., 1994). On observe également une augmentation dans le liquide folliculaire de la concentration en inhibine. La rétroaction de l'inhibine et de l'œstradiol sur la FSH, variable selon les espèces, entraîne la réduction de synthèse de la FSH et est responsable du processus de sélection. Ainsi, 1 à 5 jours après le recrutement, les concentrations en FSH atteignent des valeurs inférieures à celles induisant le recrutement, celui-ci s'arrête et l'excédent de follicules s'atrésie (Driancourt et al., 1991a).

#### **e) Phase de dominance :**

La notion de dominance a été particulièrement bien décrite dans l'espèce bovine. Elle est toute à la fois morphologique et fonctionnelle (Lavoit et Fortune, 1990). Elle est qualifiée de morphologique (DM) parce qu'elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire. Elle est également fonctionnelle (DF) parce que le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression de follicules en croissance ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (Sirois et Fortune, 1990) et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (Rouiller et al., 1989 ; Gong et al., 1993a) (annexe 15).

Au cours de la phase de sélection, le follicule dominant croît de manière linéaire pendant plusieurs jours jusqu'à atteindre la taille de 9mm environ (Ginther et al., 1989 ; Guilbault et al., 1991). Cette première phase de croissance dépend du stade du cycle auquel elle est observée. Elle est plus courte pour les follicules dominant avant initié leur croissance aux jours 4 et 16 du cycle (2 jours) que pour les follicules dont la croissance a débuté au 12<sup>ème</sup> jour du cycle (4 jours). Une fois ce diamètre atteint par le follicule, celui-ci est à ce moment à même d'exercer sa dominance morphologique et fonctionnelle. C'est au cours de la phase de plateau (6 jours) (Ginther et al., 1989) alors atteinte par le follicule en croissance que ce dernier perd progressivement sa dominance fonctionnelle. Lors de la dernière vague de croissance folliculaire, le follicule dominant poursuit sa croissance en réponse aux facteurs hormonaux responsables de l'ovulation. Lors des premières vagues de croissance folliculaire, le follicule dominant ne pourra ovuler que si la régression du corps jaune est induite par une injection de prostaglandines. Si cette injection est réalisée après la fin de dominance fonctionnelle, le follicule morphologiquement dominant subira l'atrésie et une nouvelle phase de recrutement s'initiera (Kastelic et al., 1990 ; Savio et al., 1990a ; Driancourt et al., 1991b).

Le plus gros follicule présent sur les ovaires n'est donc pas nécessairement d'un point de vue fonctionnel le follicule dominant. Cliniquement, la présence sur les ovaires de plus de 10 follicules de diamètre compris entre 3 et 8mm permet d'exclure celle d'un follicule fonctionnellement dominant (Bungartz et Niemann, 1994). Plusieurs expériences ont démontré que la dominance morphologique est plus longue que la dominance fonctionnelle (Lavoit et Fortune, 1990 ; Fortune et al., 1991 ; Savio et al., 1990b ; Kastelic et al., 1990 ; Kastelic et Ginther, 1991). Cette dernière s'exercera donc surtout au cours de la phase de croissance du follicule dominant et pendant les deux premiers jours suivant. La phase de dominance morphologique et fonctionnelle peut être artificiellement prolongée par l'administration de progestagènes (Sirois et Fortune, 1990 ; Savio et al., 1993). Cet effet dépend néanmoins de la dose du progestagène administrée. A la différence d'une dose élevée, une faible dose entraînera la persistance du follicule et l'augmentation de son diamètre. Elle n'empêchera pas l'ovulation mais sera responsable ce faisant d'une réduction de la fertilité.

#### **f) Atrésie folliculaire :**

Encore appelée involution folliculaire, elle constitue le devenir de la majorité (99,9%) des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle joue donc indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation. Sa durée, ses causes et son mécanisme sont encore mal connus faute d'une détection précoce et fiable. Cytologiquement, elle n'est identifiable que chez les follicules primaires, secondaires ou tertiaires par la mise en évidence de pycnose (grains de chromatine condensée) (Hirshfield, 1989) ou d'apoptose (corps apoptotiques) dans les cellules de la granulose (Hughes et Gorospe, 1991) ou par

l'identification de processus dégénératifs (opacification) au niveau de l'ovocyte. Biochimiquement (fig. 1-5), elle s'accompagne d'une augmentation des concentrations en enzymes lysosomales et en glycosaminoglycans ainsi que d'une diminution (tab 1-1) des concentrations en œstradiol.

La granulosa disparaît progressivement et le cumulus se dissocie (fig. 1-6). L'ovocyte dégénéré reste la dernière cellule identifiable. Sur le plan fonctionnel, la distinction entre les follicules atériques ou non peut être réalisée par la détermination du rapport de leurs concentrations en œstradiol/progestérone (Ireland et Roche, 1982), ou mieux encore, par le rapport de leurs concentrations en œstradiol/ocytocine. La réceptivité à l'hormone LH des follicules de la vague préovulatoire est comparable à celle des follicules des vagues métœstrales ou diœstrales mais leur concentration en œstrogènes et androgènes est plus élevée (Driancourt et al., 1990 ; Ireland et Roche, 1982).

Différentes études ont précisé le moment préférentiel d'apparition de l'atrésie (Hirshfield, 1991). Elles sont basées sur l'analyse du temps nécessaire pour doubler le nombre de cellules de la granuleuse visibles au travers de la plus grande coupe d'un follicule (notion de génération ou cycle cellulaire). Deux faits essentiels ont ainsi été identifiés. La durée des cycles diminue avec leur nombre. Ainsi chez le rat, l'intervalle entre la première et la troisième génération est de plus de 30 jours tandis qu'elle n'est que de 4 jours entre la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> génération (Hirshfield, 1991). Par ailleurs, la fréquence des follicules atériques augmente avec le nombre de cycles de multiplications cellulaires. Elle est maximale au moment de la formation de l'antrum chez la ratte tandis que chez la femme et la vache sa fréquence est la plus élevée au cours des stades suivant la formation de l'antrum (fig. 1-6). Ce nombre dépend davantage de la taille du follicule ovulatoire que de la taille du follicule antral. En effet, le diamètre du follicule antral est comparable chez la ratte, la vache et la femme soit 0,2 à 0,4mm mais le diamètre du follicule ovulatoire est de 0,9 - 10mm chez la ratte et compris entre 15 et 20mm chez la vache et la femme. Les raisons de ces différences sont encore peu connues.

L'atrésie folliculaire touche 99,9 % des follicules involutifs. L'atrésie correspond à la régression du follicule jusqu'à sa disparition complète dans le stroma ovarien. Dans les primaires et préantraux, elle débute par l'entrée en apoptose de l'ovocyte, en revanche dans les follicules à antrum, c'est une augmentation du taux d'apoptose des cellules de granulosa qui est le premier signe observable d'atrésie (fig. 1-6). Dans les cellules de la granulosa, seule la phase finale de l'apoptose, la fragmentation de l'ADN, est réellement visible sous forme d'agrégats d'ADN, les grains de pycnose. Le stade ultime d'involution du follicule est caractérisé par son écrasement et l'invasion de l'antrum par des fibres conjonctives (Thibault et al., 2001).

Tableau 1-1 : Les changements métaboliques et biochimiques lors de l'atrésie (Mommiaux et al., 1999).

Tableau CHANGEMENTS FONCTIONNELS OBSERVÉS AU COURS DE L'ATRÉSIE DES FOLLICULES EN DÉVELOPPEMENT TERMINAL CHEZ LES OVINS ET LES BOVINS		
	Marqueurs fonctionnels	Changements d'expression ou de concentration
granulosa	P450 aromatasase récepteurs SHL et LH connexine 43 et IGFBP-2 et 5 récepteurs de l'IGF/mannose 6 phosphate laminine, fibronectine, collagène IV heparane sulfate proteoglycane	perte précoce et perte tardive diminution progressive augmentation augmentation tardive
thèque folliculaire	P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, C17-20 lyase IGFBP-2 et 5 récepteurs de l'IGF/mannose 6 phosphate fibronectine cellulaire	diminution tardive augmentation perte précoce et perte précoce
liquide folliculaire	œstrogènes androgènes IGFBP-2, 4 et 5 métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 heparane sulfate proteoglycane proreline	chute précoce et augmentation augmentation progressive augmentation précoce et progressive augmentation

Figure 1-6 : l'atrésie folliculaire au niveau cellulaire (Thibault et al., 2001).

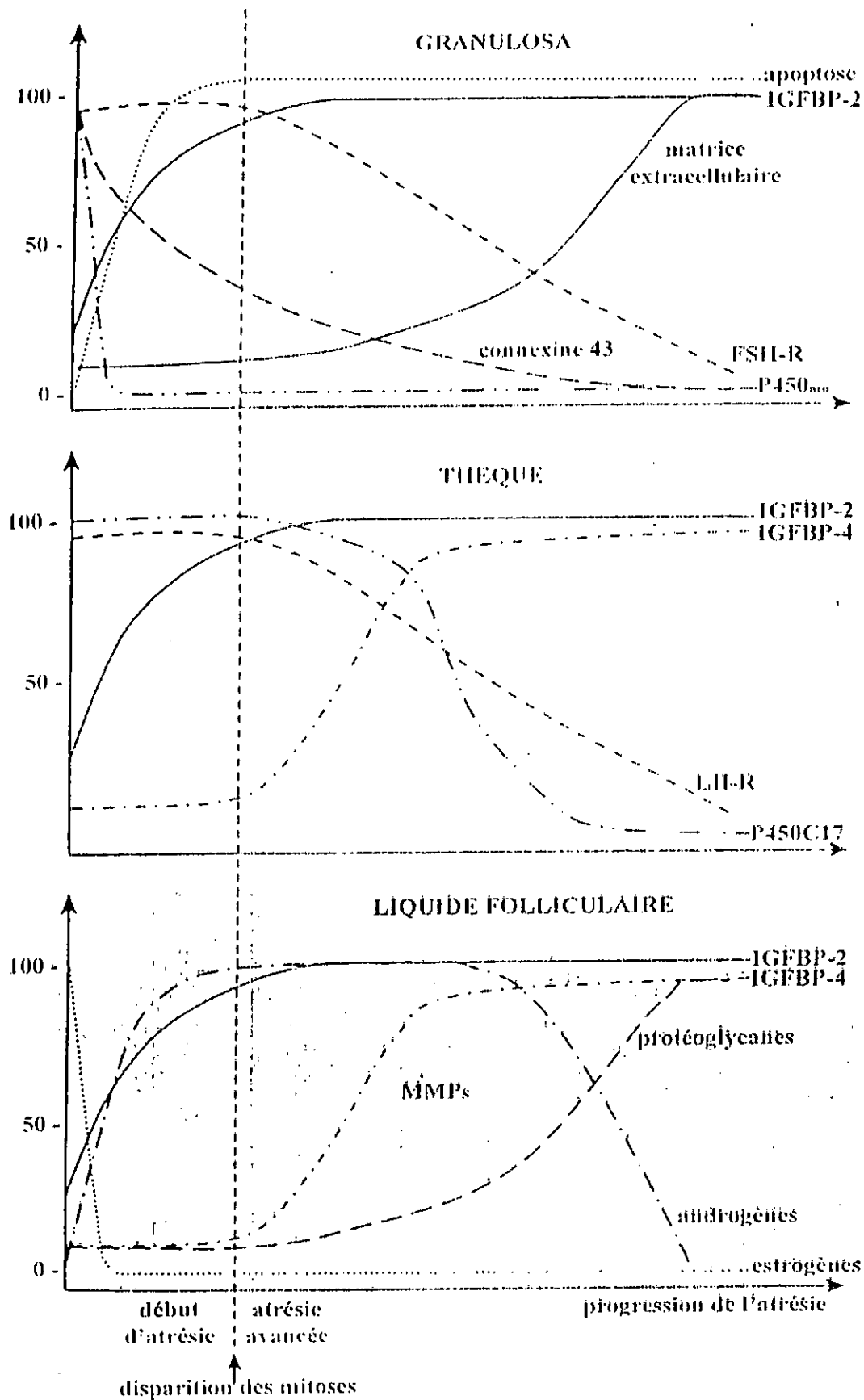
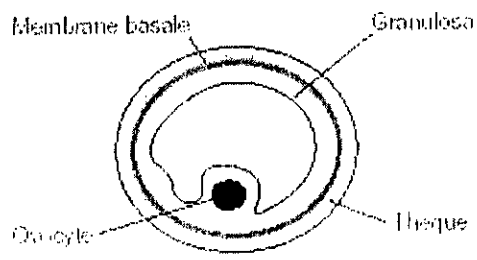
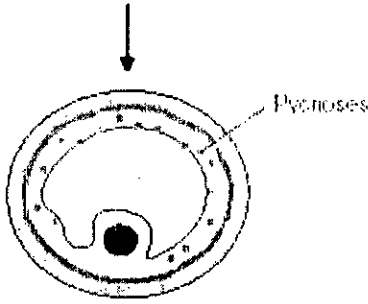
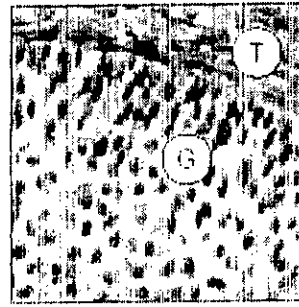


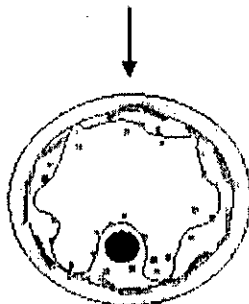
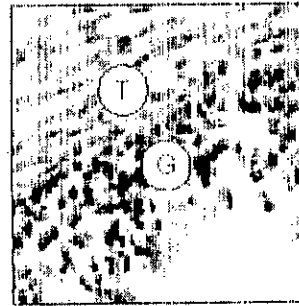
Figure 1-7 : Le phénomène de l'atrésie folliculaire (Monniaux et al., 1999).



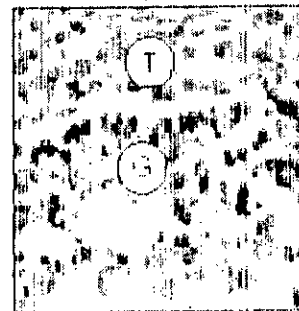
Follicule sain



Follicule atrétique



Follicule en atrésie avancée



## CHAPITRE II:

### 2. LA REGULATION DE LA FOLLICULOGENESE.

#### 1. La régulation de la folliculogénèse :

Deux phases doivent être distinguées en ce qui concerne les régulations hormonales ainsi que le mécanisme d'effet de divers facteurs s'exerçant sur la folliculogénèse au cours du cycle et du post-partum. La première phase, qualifiée de «gonadotrope indépendante», est placée sur le contrôle de facteurs intra-ovariens au nombre desquels on compte l'activine. Elle concerne chez la vache, les follicules de taille inférieure à 5 mm. La seconde phase est plus complexe et dépend tout à la fois des hormones gonadotropes, lutropine et follitropine, mais aussi de nombreux facteurs intra- ou extra-ovariens (Drion et al., 2000) (annexe 14) qui, selon leur nature sont impliqués dans le recrutement, la sélection ou la dominance folliculaire :

##### 1. Phase gonadotrope indépendante :

Chez les mammifères, les facteurs déclenchant l'entrée en croissance des follicules primordiaux restent mal connus. Chez la brebis, l'hypophysectomie n'empêche pas les follicules de croître jusqu'à atteindre une taille de 2mm. Chez la vache, l'inhibition de la libération de l'hormone FSH (Follicle Stimulating Hormone) par l'administration à long terme d'agonistes de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), n'empêche pas certains follicules d'évoluer jusqu'à un diamètre compris entre 6 et 7 mm (Webb et al., 1994). Ces deux observations confirment l'absence de rôle essentiel des hormones gonadotropes pendant les premières étapes du développement folliculaire ; à ce stade, elles agiraient probablement davantage sur la régulation des capacités de synthèse et de maturation des cellules de la granulose que sur la croissance folliculaire proprement dite (Driancourt et al., 1991a). Cette phase de développement folliculaire serait en fait essentiellement assurée par des facteurs de croissance produits localement par les follicules (Bendell et Dorrington, 1990) et agissant de manière paracrine. Parmi ceux-ci, l'activine serait le candidat potentiel (annexe 16).

##### 2. Phase gonadotrope dépendante :

Cette phase, également qualifiée de folliculogénèse tonique par opposition à la précédente appelée folliculogénèse basale (Driancourt 1991a), commence chez la brebis et chez la vache, lorsque les follicules ont atteint une taille limite caractéristique de l'espèce (200 µm chez la souris, 2 mm chez la brebis et 4 mm chez la vache). L'acquisition de cette taille correspond à diverses modifications histologiques et hormonales du follicule: il acquiert une thèque vascularisée qui autorise davantage d'échanges avec l'environnement ovarien du follicule, sa capacité stéroïdogène augmente et se traduit par une augmentation de la synthèse d'œstradiol (annexe 3, 4, 5, 12, 15 et 16), la vitesse de multiplication des cellules de la granulose s'accroît puis se réduit lorsque le follicule atteint le stade préovulatoire.

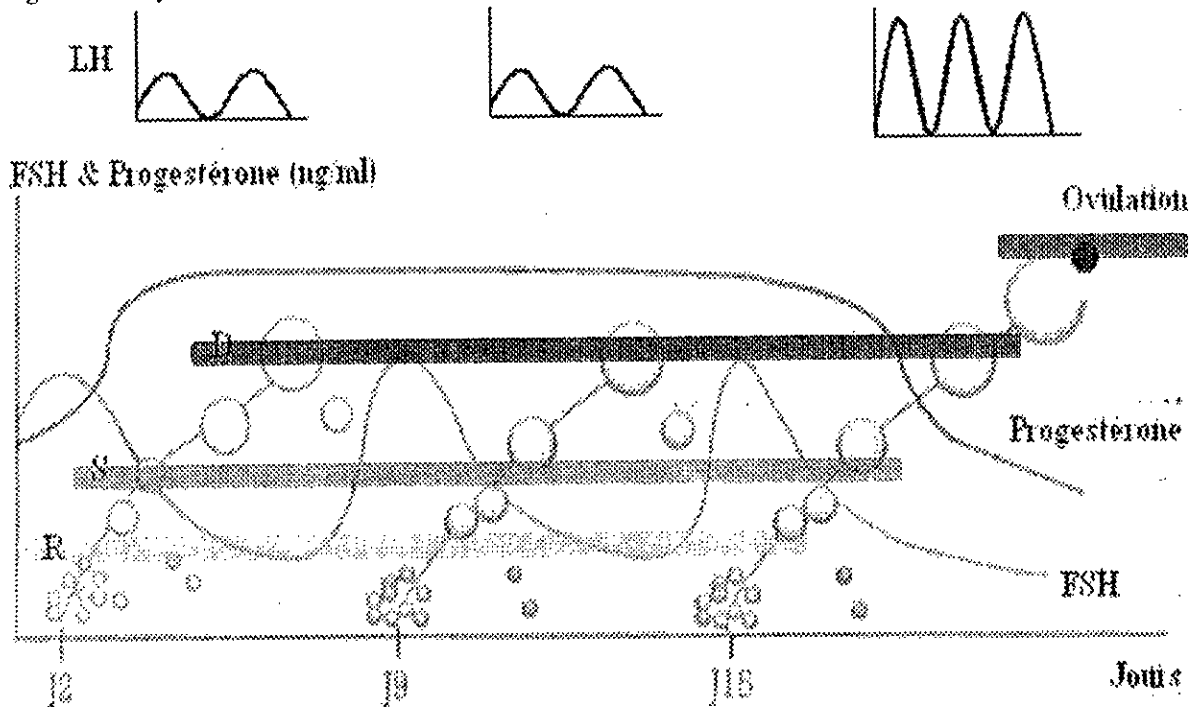
Ces divers mécanismes résultent des interactions synergiques et/ou antagonistes entre, d'une part, les hormones gonadotropes d'origine hypophysaire FSH et LH et, d'autre part, des substances polypeptidiques, les unes exerçant une action stimulatrice (IGFs, activine, TGF-β (Transforming Growth Factor)) et les autres une action inhibitrice (IGFBPs (Insulin Growth Factor Binding Proteins), follistatine, inhibine, interleukine-6, TNFα (Tumor Necrosis Factor)) (Morniaux et Monget, 1997). L'effet de ces substances est à la fois indirect - elles exercent une rétroaction négative au niveau hypophysaire - et directe, de type paracrine, au niveau ovarien (Larson et al., 1991). Le rôle des diverses hormones impliquées est cependant plus complexe. Il s'exerce en effet d'une part sur les mécanismes impliqués dans le nombre de vagues de croissance folliculaire au cours du cycle et d'autre part sur les divers aspects d'une vague de croissance folliculaire à savoir le recrutement, la sélection et la dominance (fig. 2-1).

##### 3. Contrôle hormonal durant le recrutement :

Le recrutement de plusieurs follicules est essentiellement imputable à l'hormone FSH. Des différences entre espèces ont néanmoins été constatées. Chez la vache, différentes observations ont confirmé la relation entre l'hormone FSH et la phase de recrutement. Chaque vague de croissance folliculaire est précédée 2 à 4 jours plus tôt d'une augmentation de FSH (Sunderland et al., 1994), celle-ci apparaissant, en ce qui concerne

la première vague, le jour de l'ovulation. Enfin, l'inhibition du pic de FSH le jour de l'ovulation par du liquide folliculaire renfermant de l'inhibine retarde l'apparition de la première vague de croissance folliculaire et du follicule dominant de 1,9 et 2,7 jours respectivement et augmente, ce faisant, le nombre de cycles ne comportant que deux vagues de croissance folliculaire (Turzillo et Fortune, 1990). Cet effet est d'autant plus net que l'administration de liquide folliculaire est précocement réalisée au cours du cycle (Kastelic et al., 1990 ; Drion et al., 2000).

Figure 2-1 : Cycle oestral chez une vache avec le profil hormonal sérique (Ennuyer, 2000).



R = Recrutement, S = Sélection, D = Dominante.

### a) Rôle de la FSH :

La FSH hypophysaire stimule l'activité de l'aromatase des cellules de la granulosa (Erickson et al., 1978), favorisant ainsi l'aromatation des androgènes en œstrogènes. L'activité de cette enzyme est plus importante dans les follicules dominants que dans les follicules dominés.

Les espèces présentant des vagues de croissance folliculaires en phase metœstrale ou diœstrale, le recrutement pourrait être déclenché par une élévation moins conséquente de la FSH ou être le résultat de l'amplification de son action par des facteurs de croissance. Une telle augmentation de la FSH avant chaque vague de croissance folliculaire a été observée chez la vache. Il lui fait suite une phase de sélection pendant laquelle, la concentration en FSH diminue.

Le rôle de la FSH peut, pour une espèce donnée, dépendre de la taille du follicule. Il s'exercerait davantage sur les follicules de diamètre supérieur à 2 voire 3 ou 4 mm que sur les plus petits follicules présents au sein de la même cohorte de recrutement (Lussier et al., 1994). De même, lors d'un traitement de superovulation, l'effet de la FSH se manifeste davantage et de manière plus précoce sur les follicules de taille comprise entre 2 et 4 mm ou entre 5 et 9 mm que sur les follicules de diamètre supérieur à 10mm.

### b) Rôle de la GH :

L'hormone de croissance (GH : Growth Hormone, STH: Somatotropin hormone) ou ses analogues recombinants, bien connus chez la vache pour leur utilisation en vue d'augmenter la production laitière, améliorent la croissance des plus gros follicules (Lucy et al., 2000) et leur synthèse d'œstradiol (De La Sotà et al., 1993). Ne modifiant pas les taux de gonadotrophines hypophysaires, l'action cellulaire de la GH s'exerce au niveau ovarien par l'activation de la sécrétion de IGF-1 par le follicule, et par une augmentation globale du taux d'ovulation, ainsi que par une augmentation de production de progesterone et d'IGF-1 par le corps jaitière.

L'augmentation de la fréquence des gestations gémellaires associée à l'utilisation de la bST (Bovine Somatotropin). Corrobore son effet sur la croissance folliculaire.

### c) Rôle des facteurs de croissances :

Les facteurs de survie, de prolifération ou de différenciation folliculaire identifiés au niveau ovarien sont multiples. Leur étude est difficile compte tenu, d'une part de leurs divers mécanismes d'action (effet via des récepteurs ou en tant qu'agents modulateurs de l'activité ou de la disponibilité d'autres facteurs) et, d'autre part, de leur structure moléculaire fort apparentée, voire semblable à celles de leurs protéines de liaison comme les IGFBPs (Monget, 1995). Ils se distinguent également par leur site d'action. Ils peuvent en effet agir sur les cellules responsables de leur synthèse (autocrinie), ou sur d'autres cellules du follicule par la voie locale (paracrinie) ou sanguine (endocrinie). Par ailleurs, ils peuvent également agir par des mécanismes additionnels tels, la juxtacrinie (activation de récepteurs sur la cellule adjacente via des facteurs de croissance attachés à la membrane cellulaire) et l'intracrinie (stimulation de la cellule où le facteur de croissance est produit sans production préalable de ce facteur de croissance). Cependant la part respective de leurs sites d'action restant encore à déterminer, il est sans doute plus exact de parler de systèmes de facteurs de croissance que d'un facteur de croissance proprement dit. Quatre systèmes sont à ce jour classiquement distingués: l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF (Insulin like Growth Factor) (Hammond et al., 1991), les TGF (Transforming Growth Factors) et le FGF (Fibroblast Growth Factor) (Findlay et al., 1990). Plusieurs ligands ont par ailleurs été identifiés dans chacun de ces systèmes.

Il a été démontré qu'*in vitro* la plupart des facteurs de croissance stimulent à la fois la survie et la prolifération des cellules de la granulosa. Par contre, certains ont un effet de stimulation (IGFs, activine) et d'autre un effet d'inhibition (follistatine, TNF- $\alpha$ ) de l'activité de la granulosa, évaluée par la présence d'une stéroïdogenèse active ou de récepteurs à la LH. Cette dualité d'action peut dépendre des conditions de culture *in vitro*, de la nature des facteurs qui y sont présents, du degré de différenciation cellulaire au moment de la stimulation ou encore de la concentration intracellulaire des facteurs de transcription (Monniaux et Monget, 1997).

Le rôle du système IGF-1 au niveau ovarien a davantage été étudié ; synthétisé par les cellules de la granuleuse (Mazerbourg et al., 2000), il constitue, *in vitro*, un puissant stimulant de prolifération et différenciation des cellules de la granuleuse de différentes espèces telles que la rate, la truie, la vache, la brebis et la femme (Monniaux et Pisselet, 1992). Il constitue également un des plus importants facteurs de régulation de la dominance folliculaire. Il stimule l'aromatase des cellules folliculaires en augmentant ainsi la production d'œstradiol. Il stimule la stéroïdogenèse des cellules thécales et il joue un rôle autocrine sur sa propre sécrétion par les cellules de granulosa. Enfin il augmente la sensibilité des cellules folliculaires à la stimulation des hormones gonadotropes en amplifiant leur synthèse de récepteurs à ces hormones (Spicer et Echterkamp, 1995). Son action se limiterait aux follicules de petite taille c'est-à-dire de diamètre inférieur à 5mm (Gong et al., 1993b).

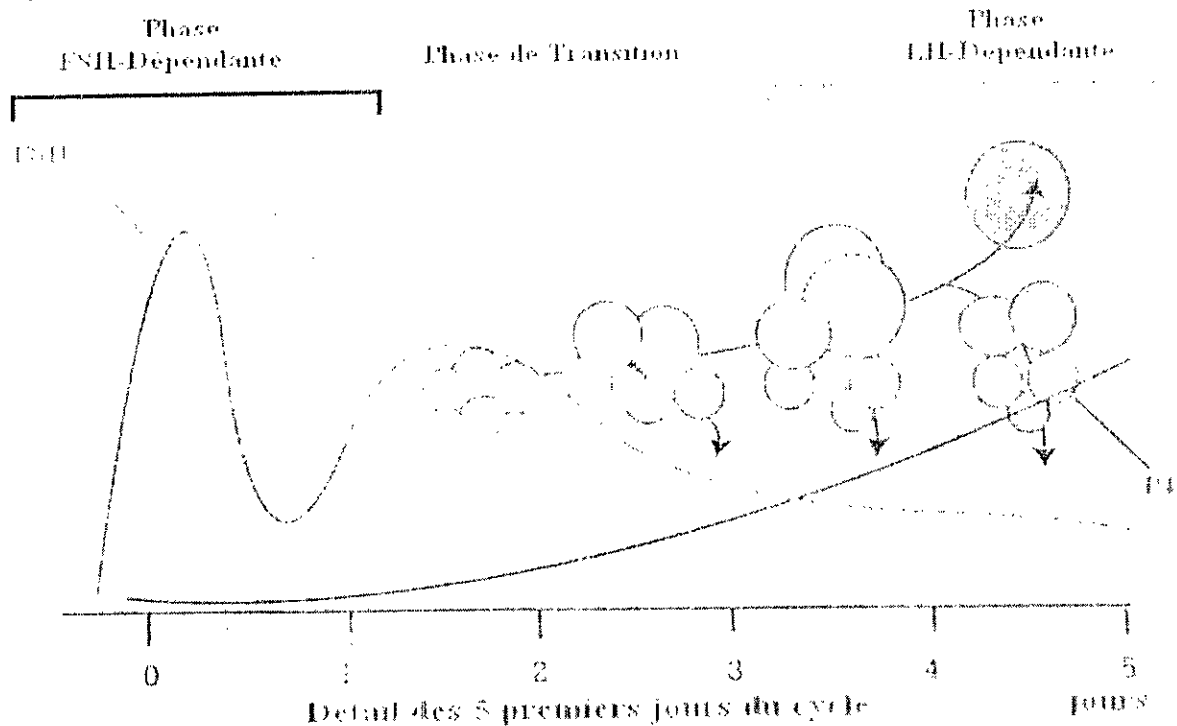
L'IGF-1 pourrait enfin être l'agent médiateur de l'effet de l'hormone de croissance sur le développement folliculaire. En effet, l'injection de la bST entraîne dans les 48heures l'augmentation de la concentration de l'IGF-1 et de l'insuline, non seulement dans le plasma, mais également dans l'endomètre et le liquide folliculaire (Herrler et al, 1994). Enfin, comme rappelé ci plus haut, une relation positive entre la fréquence des gestations gémellaires et une concentration plus élevée d'IGF-1 dans le sang et dans les follicules a été mise en évidence. Par contre, il semble que l'addition *in vivo* d'IGF-1, directement au niveau ovarien, altère la croissance folliculaire et les concentrations en œstradiol au niveau du liquide folliculaire. Ainsi, Spicer et al. (2000), plaçant des mini pompes osmotiques délivrant de l'IGF-1 humaine recombinante (2 mg/h pendant 7 jours), chirurgicalement à l'intérieur d'ovaires de vaches cyclées, ont constaté que le traitement augmentait significativement la concentration en œstradiol mesurée à l'intérieur du liquide folliculaire des plus petits follicules. Par contre, ni la concentration en œstradiol dans le liquide folliculaire des grands follicules, ni les concentrations en progestérone, androstènedione ou IGFBP dans les deux types de follicules n'ont été augmentées (fig. 2-3).

## 4. Contrôle hormonal durant la sélection :

La nature exacte du facteur qui détermine le caractère dominant d'un follicule est à ce jour inconnue. Deux hypothèses ont néanmoins été avancées. La première suppose l'existence d'une protéine régulatrice (FRP: Follicle Regulatory Protein) et n'a pas été confirmée. La seconde envisage la sécrétion par le follicule dominant ou par les follicules appelés à le devenir, de substances inhibitrices de la synthèse hypophysaire de l'hormone FSH et donc responsables de l'atrésie folliculaire de l'ensemble des follicules ispi-ou hétérolatéraux au follicule dominant. Cet effet ne concernerait pas le follicule dominant, le seul qui puisse

continuer à se développer en présence de concentrations minimales de FSH, hormone toujours indispensable pendant la phase de dominance (Turzillo et Fortune, 1993). Récemment, il a été observé que la sélection du follicule dominant se faisait 36 à 48 heures après le début du recrutement. Elle est temporellement liée à l'expression par le follicule de l'ARN messenger des récepteurs à l'hormone LH. Le premier follicule qui acquiert des récepteurs à l'hormone LH devient le follicule dominant car ses cellules de granuleuse sont capables de répondre aux hormones LH et FSH (Bao et Garverick, 1998) (fig. 2-2).

Figure 2-2 : La concentration FSH et P4 durant une vague ovulante (Ennuyer, 2000).



Outre l'œstradiol (Bo et al. 1995) plusieurs substances ont été proposées pour jouer le rôle d'inhibition de la sécrétion FSH, on cite l'inhibine ; l'action de l'inhibine semble se faire de deux manières : La première s'exercerait au niveau du follicule où l'inhibine limiterait, de manière autocrine, la conversion d'androgènes en œstrogènes en agissant sur l'aromatase responsable de cette transformation. La seconde s'exercerait de manière périphérique par inhibition, de manière endocrine, de la sécrétion de FSH et par conséquent de la croissance d'autres follicules. La croissance du follicule dominant en l'absence de FSH est rendue possible grâce à l'intervention de l'IGF-I, synthétisé en grande concentration par le follicule dominant, l'IGF-I amplifierait l'effet de la FSH. L'IGF-I stimulerait l'aromatase des androgènes en œstrogènes. L'œstradiol ainsi produit stimulerait en retour la production d'IGF-I (fig. 2-3). Ce double rétrocontrôle expliquerait l'augmentation rapide de l'œstradiol dans le follicule dominant. A l'inverse, les follicules dominés ne disposant pas de ce mécanisme compensatoire sont voués à l'atrophie (Findlay 1993).

La follistatine (FSP: FSH Suppressing Protein) est un polypeptide isolé du liquide folliculaire porcin et bovin (Ueno et al., 1987). Bien qu'ubiquiste, sa synthèse est surtout assurée par les cellules de la granulosa sous le contrôle de la FSH (Findlay, 1993). Elle serait impliquée de manière autocrine dans les processus de lutéinisation et d'atrophie du follicule (Xiao et al., 1991). En présence de FSH, elle inhibe l'activité aromatasique des cellules de la granulosa et leur production d'inhibine tout en favorisant la synthèse de progestérone, s'opposant en cela aux effets de l'activine. Elle est répertoriée comme «activin binding protein» antagonisant l'effet de l'activine au niveau pituitaire (Nakamura et al., 1990).

## 5. Contrôle hormonal durant la dominance :

La phase finale de la période de dominance, voire la phase finale de la maturation folliculaire préalable à l'ovulation, se traduit notamment par une augmentation très nette des œstrogènes. Cette synthèse suppose la coopération des cellules de la thèque et de la granulosa et l'intervention des hormones gonadotropes LH et FSH, la LH induisant la formation d'androgènes par la thèque interne et la FSH assurant l'aromatase de ceux-ci en œstrogènes par la granulosa (fig. 2-3). Chez la vache, ce processus présente la particularité de

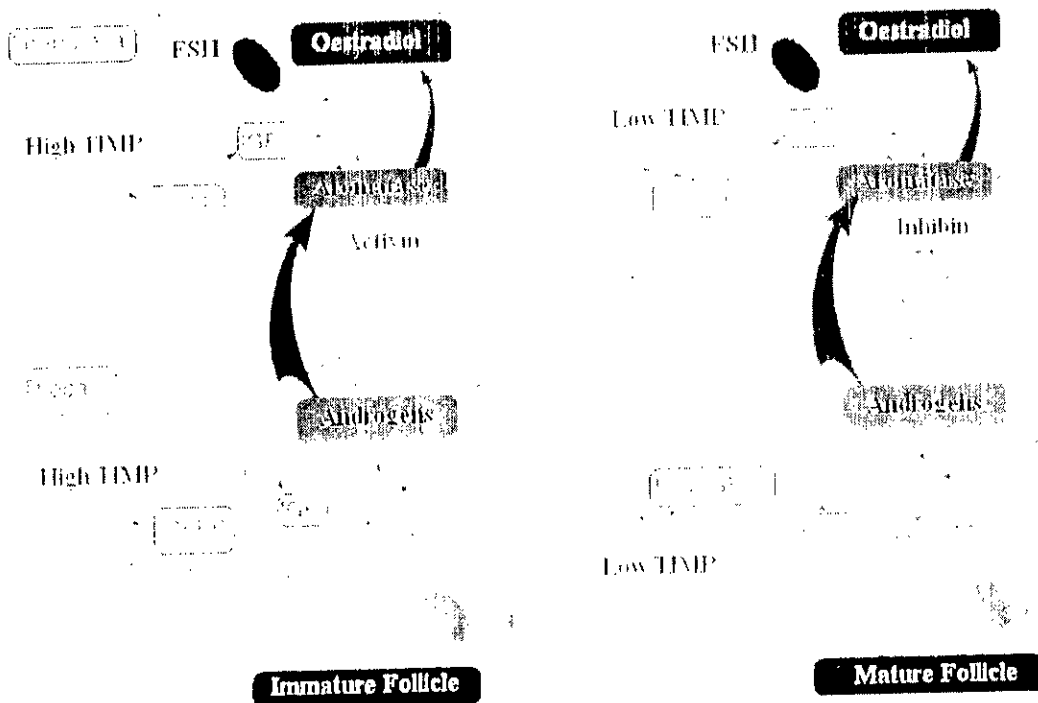


pouvoir être observé à des moments différents du cycle, c'est-à-dire en présence ou en l'absence d'une imprégnation progestéronique (Drion et al., 2000).

Dans le premier cas, la synthèse d'androgènes et leur aromatisation en œstrogènes ne se prolonge pas au-delà du 8<sup>ème</sup> voire du 10<sup>ème</sup> jour du cycle en ce qui concerne le follicule dominant de la première vague (Sunderland et al., 1994). Cet effet, limité dans le temps, est imputable à l'augmentation de la progestérone dont on connaît l'effet inhibiteur sur l'activité de l'aromatase. La fin de la phase de dominance du follicule est précédée de la perte par ce follicule, de sa capacité à supprimer l'effet FSH et à produire des œstrogènes, de même que par la perte de ses récepteurs à LH et FSH. Cette période coïncide avec l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire à nouveau précédée par une augmentation transitoire de la FSH (Roche et al., 1997).

A l'inverse, la lutéolyse induit une augmentation drastique de la synthèse d'androgènes et de leur aromatisation en œstradiol dans le follicule dominant. Cette augmentation résulte d'une sensibilité accrue de la théque à l'action de l'hormone LH dont la concentration basale et la pulsativité coïncident avec la diminution de la progestérone. Ce changement de la concentration de l'hormone LH en présence de concentration basale en FSH est essentiel pour le devenir ovulatoire du follicule dominant (fig. 2-3). Il apparaît donc que c'est la réduction de la pulsativité de l'hormone LH qui serait responsable de l'atrophie des follicules dominants de la première et surtout de la deuxième vague de croissance folliculaire (Lucy et al., 1992).

Figure 2-3 : Stéroïdogénèse dans un follicule en stade immature puis mature (Roche, 1996).



D'Occhio et al. (2000), ont vérifié la possibilité de contrôler la cyclicité des femelles dans des exploitations bovines extensives au moyen d'implant libérant un agoniste de la GnRH. Le principe, déjà largement utilisé en médecine humaine dans le traitement de différentes maladies hormono-dépendantes, l'endocrinologie de la reproduction, la fertilisation *in vitro* et le transfert d'embryons (Hanssens et al., 2000; Tzafettas, 2000), consiste en l'induction d'une «Down- Régulation» des récepteurs à la GnRH - une réduction de leur nombre et une désensibilisation vis à vis de l'hormone stimulatrice (présents sur les cellules gonadotropes hypophysaires), une désensibilisation de l'hypophyse antérieure à la GnRH endogène et consécutivement, une diminution de la sécrétion endogène pulsatile de LH ; appliqué à des génisses, ce traitement prévient l'arrivée d'un pic préovulatoire de LH, empêchant ainsi l'ovulation. Un traitement à base d'agonistes de GnRH durant 4 à 6 semaines restreint la croissance folliculaire à celle de follicules jusqu'à une taille de 2 à 4 mm (D'Occhio et al., 2000; Dufour et al., 1999). Les traitements à long terme quant à eux, contrôlent la cyclicité, plutôt par un manque consécutif en hormones gonadotropes que par une action directe de l'agoniste au niveau ovarien. Ainsi, il est possible de faire redémarrer une croissance folliculaire normale chez des génisses ayant subi un de ces traitements à long terme (6 mois) et ne présentant au niveau ovarien que des follicules d'une taille comprise

entre 2 et 4 mm, par des injections soutenues de FSH suivie de LH. Plus récemment, ces implants ont été introduits dans les protocoles de superovulation et de transfert d'embryons chez les bovins afin de permettre un meilleur contrôle de la croissance folliculaire sur base de FSH exogène et de décider du moment d'ovulation par l'injection de LH (D'Occhio et al., 1998).

## **II. Les facteurs influençant la folliculogénèse :**

A ce jour, 4 groupes de facteurs peuvent être distingués. Le premier, et sans doute le plus essentiel, le second, est spécifique à la vache allaitante, le troisième est lié à l'imprégnation progestéronique alors que le dernier est le plus innovateur. La nature des facteurs régulateurs ainsi que leurs interactions sont loin d'avoir été complètement identifiés. D'importantes découvertes ont néanmoins été réalisées. Elles concernent plus spécifiquement les opioïdes endogènes, l'insuline, et la leptine (Drion et al., 2000).

### **1. Effet de l'alimentation :**

#### **a) Effets sur la croissance folliculaire :**

Diverses observations confirment la multiplicité des influences de la balance énergétique sur la croissance folliculaire au cours du post-partum. Ainsi, doivent être pris en considération, l'aspect quantitatif (modérée ou sévère) de la balance énergétique, l'effet sur le recrutement ou la phase terminale du développement folliculaire, la durée de la période entre le vêlage et le moment où le déficit énergétique est maximal et la durée de la balance énergétique négative.

Une étude échographique a démontré que les vaches en lactation témoignant d'une balance énergétique positive présentaient un nombre plus réduit de follicules de diamètre compris entre 3 et 5 mm ou entre 6 et 9 mm et un nombre plus élevé de follicules de diamètre compris entre 10 et 15 mm. De même des vaches de race laitière non traitées présentent un plus grand nombre de follicules cavitaires que les vaches traitées (De La Sota et al., 1993). A l'inverse, une balance énergétique négative n'empêcherait pas le recrutement de follicules au cours des 15 premiers jours du post-partum. (Beam et Butler, 1997 & 1998). Se succéderaient ainsi 1 à 9 phases de croissance et de régression de follicules dont le diamètre maximal irait croissant jusqu'au moment de l'ovulation (Mc Dougall et al. 1995). En cas d'insuffisance modérée de l'apport énergétique, une injection de GnRH est susceptible d'induire l'ovulation des plus gros follicules (diamètre > 10mm) présents 24 jours en moyenne après le part (Mc Dougall, 1994) dans les 24 à 48 heures, une activité cyclique régulière n'étant que rarement observée par la suite.

Une balance énergétique négative modérée affecterait donc davantage les stades terminaux de la croissance folliculaire. Le pourcentage de follicules dominants qui ovulent est plus élevé lorsque leur développement débute après, plutôt qu'avant, le moment où la balance énergétique négative est maximale (75% d'ovulations vs 24%) (Beam et Butler, 1997). De même, l'ovulation du follicule dominant sera-t-elle, plus fréquemment observée si l'intervalle entre le vêlage et le moment où la balance énergétique est minimale est court (6,9 jours), que s'il est long (15,5 jours) (Beam et Butler, 1997 & 1998). Un état de sous-nutrition avant ou après le part allonge de 4 à 6 jours le moment où le follicule dominant atteint sa taille maximale (14 vs 10 jours). Il retarde également de 4 à 6 jours le moment de l'émergence de la deuxième et troisième vague de croissance folliculaire. Il en résulte un allongement de 3 semaines de l'intervalle entre le vêlage et la première ovulation (77 vs 51 jours) (Jolly et al., 1995). Enfin, il a été démontré que l'intervalle entre le vêlage et la première ovulation est d'autant plus court que le diamètre du second follicule dominant est grand (Mc Dougall et al., 1995).

Si au cours du dernier trimestre de la gestation ou au cours du post-partum, le déficit énergétique est sévère, il est fréquent de constater l'absence de follicules de diamètre supérieur à 8 voire 5 mm sur les ovaires sans que pour autant la stéroïdogénèse des follicules de petite (2 à 4 mm) ou de taille moyenne (5 à 7 mm) en soit affectée (Ryan et al., 1994).

#### **b) Mécanisme d'action :**

Il est bien difficile à l'heure actuelle de proposer un modèle définitif pour expliquer les effets de l'alimentation, en général et de la balance énergétique en particulier, sur la croissance folliculaire au cours du post-partum. Elles ont fait l'objet de plusieurs synthèses (Jolly et al., 1995).

- **Gonadolibérine et gonadotrophines :**

D'une manière générale, il est bien démontré que des états de sous-nutrition s'accompagnant de périodes d'œstrus plus ou moins prolongées, et sont associées à une réduction de la libération de la GnRH par l'hypothalamus et de la pulsativité des hormones hypophysaires LH et FSH. Les effets de la sous-nutrition sur l'hormone LH ont davantage été démontrés que ceux sur l'hormone FSH. La sous-nutrition retarde la reprise d'une libération pulsatile de l'hormone LH naturelle (Wright et al. 1992) ou induite par l'injection d'œstradiol. Chez la vache laitière normalement nourrie, la pulsativité de l'hormone LH coïncide avec le moment où la balance énergétique redevient positive. Comparant deux groupes de vaches, MacDougall (1994) observe pour un stade du post-partum donné, une concentration en œstradiol du follicule dominant plus faible chez les vaches en œstrus que chez celles normalement cyclées, sans que le rapport entre œstradiol et testostérone en soit affecté. Cette observation semble démontrer que la sous-nutrition affecterait davantage une réduction de la synthèse de la testostérone par la LH que l'aromatation de cette hormone en œstradiol. La reprise d'une libération pulsatile de l'hormone LH est une condition nécessaire mais non suffisante au développement folliculaire normal, il est vraisemblable que le processus de libération de la GnRH soit également affecté, cette libération étant indispensable pour assurer une libération maximale de LH et donc l'ovulation (Drion et al., 2000).

#### ▪ L'insuline :

En début de lactation, la présence d'une balance énergétique négative associée à l'utilisation importante de glucose pour la synthèse de lactose se traduit par une hypoglycémie globale. L'implication du glucose dans la fonction de reproduction est réelle. L'administration d'un inhibiteur de son métabolisme empêche l'apparition de l'œstrus et la formation du corps jaune. De même, l'induction d'une hypoglycémie chez des vaches en lactation s'accompagne d'une réduction de l'amplitude des pics de LH. L'hypoglycémie s'accompagne d'une part, d'une hypoinsulinémie, et, d'autre part, d'une activation de l'axe corticotrope et de la synthèse de glucocorticoïdes attribuée à une élévation de la Corticotropin Releasing Hormone (CRH) et donc de l'ACTH. L'hypoinsulinémie exerce divers effets, directs sur le métabolisme, et indirects sur la physiologie de l'hypothalamus et de l'ovaire. Elle se traduit par une augmentation de la lipolyse et donc de la concentration en acides gras libres et corps cétoniques. Ces derniers, en association avec les beta-endorphines, libérées notamment en réponse à la stimulation de l'appétit par les acides gras libres, réduisent la pulsativité de la GnRH hypothalamique.

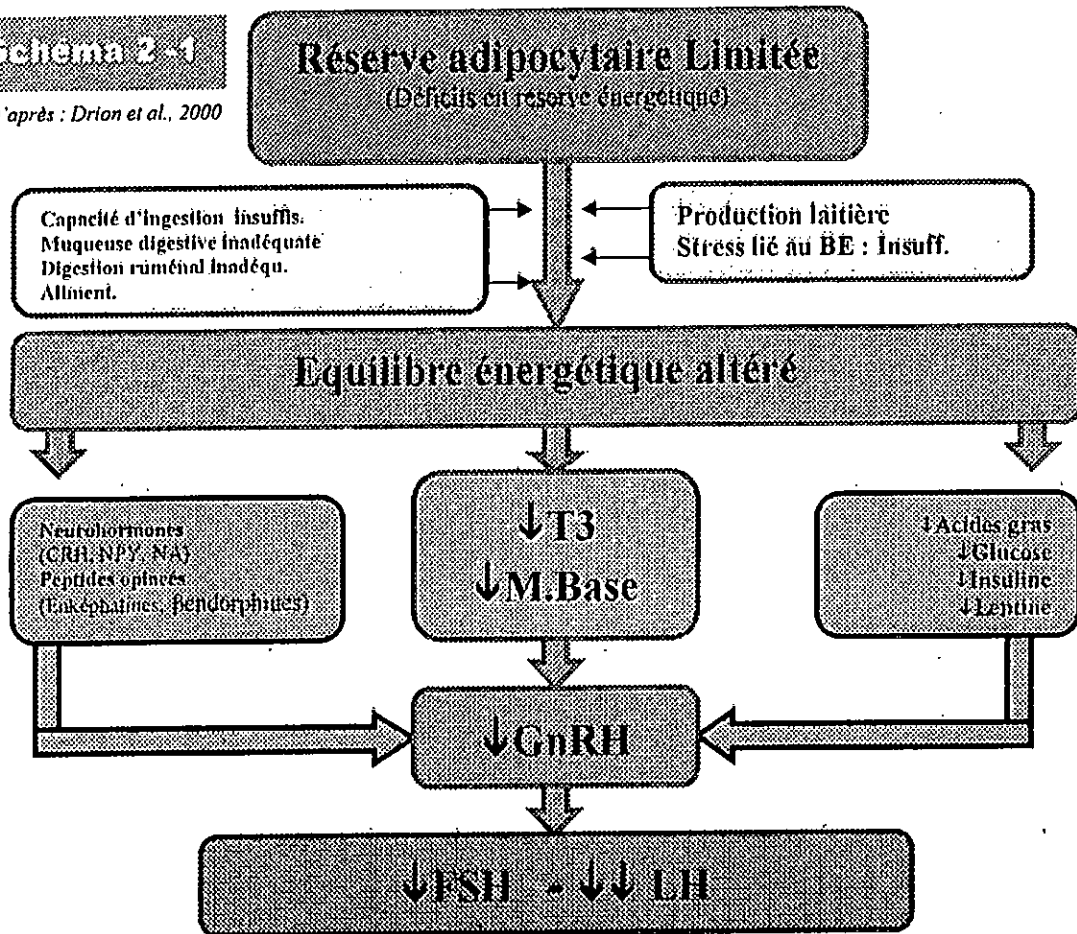
L'hypothèse d'une action directe de l'insuline sur l'hypothalamus a été avancée mais reste controversée. Cette hormone est cependant capable de modifier l'expression du gène ou la libération de diverses substances hypothalamiques intervenant dans la régulation gonadotrope tels que l'IGF-II et le neuropeptide Y ; l'hypoinsulinémie s'accompagnant d'une réduction de la libération de l'hormone LH (Nestler, 1997). Une action directe de l'insuline sur la fonction ovarienne ne peut être exclue. Ainsi, son utilisation lors de superovulation s'accompagne d'une augmentation du diamètre des follicules et des concentrations en œstradiol. Elle est également connue pour stimuler la prolifération des cellules de la granulosa. Les mécanismes de cette action ont fait l'objet d'une synthèse récente (schéma 4 -1). L'insuline réduirait les taux intrafolliculaires de l'IGF-binding-protein 1 (IGEBP-1). Cette protéine de liaison est connue pour inhiber l'activité biologique de l'IGF-I sur les cellules thécales à savoir la transformation des androgènes en œstradiol, l'insuline favorisant la transformation de la progestérone en androgènes par les mêmes cellules. Il en résulterait qu'une diminution des concentrations en insuline en début de lactation serait de nature à rendre les follicules moins sensibles à une stimulation par les hormones gonadotropes (Drion et al., 2000).

#### ▪ L'Insulin Growth Factor :

De multiples études ont confirmé la médiation possible par l'Insulin like Growth Factor des effets de la balance énergétique sur l'activité ovarienne au cours du post-partum (Spicer et al., 1990). Ce facteur d'origine hépatique est connu pour stimuler la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et des théques. Sa concentration plasmatique augmente régulièrement au cours du post-partum (Spicer et al., 1990). Elle est inversement proportionnelle au niveau de production laitière mais positivement corrélée avec le niveau de la balance énergétique (Spicer et al., 1990). Une réduction de sa concentration s'accompagne de celle de libération des gonadotrophines hypophysaires tout comme de celle de la progestérone au cours des premiers cycles du post-partum (Spicer et al., 1990 ; Drion et al., 2000).

## Schema 2-1

D'après : Drion et al., 2000



- La leptine :

Protéine apparentée à la famille des cytokines (Hoesenecht et al., 1998), la leptine (du grec *leptos*: mince) est synthétisée et sécrétée principalement par les adipocytes mais aussi par les tissus placentaires, mammaires et hépatiques (Keisler et al., 1999). L'expression du récepteur de la leptine a été identifiée dans de nombreux tissus cérébraux ou périphériques renfermant des adipocytes: ovaire, utérus, pancréas, testicule, rate prostate (Zamorano et al., 1997). Sa concentration sanguine est corrélée avec la quantité d'adipocytes et l'importance des réserves corporelles en graisse (Saad et al., 1997). Agent satiétogène, elle régule la prise de nourriture et est de ce fait largement impliquée dans toute une série de processus métaboliques tels la thermorégulation et le métabolisme du glucose ou, fonctionnels, comme la reproduction, la croissance, l'activité de la corticosurrénale ou du pancréas (Kiess et al., 1998; Keisler et al., 1999; Bruneau et al., 1999).

La démonstration de son action régulatrice sur la fonction de reproduction a fait l'objet de nombreuses expériences, chez la souris notamment (Bruneau et al. 1999). L'hypothalamus constitue soit site d'action privilégié. Son action sur la sécrétion de la GnRH s'exercerait selon trois mécanismes. La leptine s'opposerait à l'inhibition de la GnRH par le neuro-peptide Y. Elle pourrait également inhiber les effets de l'alpha-MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) et des endorphines, molécules inhibitrices de la libération de l'hormone LH. Enfin son action passerait également par la CRH dont, la diète chez le rat, entraîne la libération et dans un second temps la suppression de l'activité du GnRH puis de la LH, l'action directe de la leptine sur l'hypophyse est également possible puisque la présence de récepteurs spécifiques y a été démontrée, chez le mouton notamment (Dyer et al., 1997). Enfin, une action ovarienne ne peut être exclue puisque, chez la vache, *in vitro*, la leptine constitue un facteur d'inhibition de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa (Spicer et Francisco, 1997; Drion et al., 2000).

## 2. Effet de la succion du pis:

De nombreuses observations hormonales ou zootechniques ont confirmé l'effet inhibiteur de la succion du pis sur la reprise d'une activité ovarienne au cours du post-partum (Hanzen, 1986; Humblot et Grimard, 1996). L'allaitement se traduit notamment par une réduction de la sécrétion de GnRH et de la sensibilité hypophysaire à l'action stimulatrice de cette dernière. Le sevrage s'accompagne d'une sécrétion

accrue de la LH, effet qui dépendrait néanmoins du niveau d'apport alimentaire. Cliniquement, en ce qui concerne la vache allaitante, Humblot et Grimard (1996) ont identifié trois situations possibles : Dans le premier cas, l'animal ne présente aucun follicule de diamètre supérieur à 10 mm. Dans le second, ces follicules sont présents mais n'ovulent pas. Dans le troisième enfin, la croissance des follicules présents se poursuit et aboutit à une ovulation (10% des cas). Chez la vache laitière par contre, le follicule de grande taille apparaît non seulement plus précocement, mais ovule dans 70 % des cas (Savio et al., 1990a). La succion du pis semble donc interférer davantage avec la phase terminale de la croissance folliculaire et l'ovulation, qu'avec la présence potentielle de follicules cavitaires.

Le mécanisme hormonal de l'effet de la succion est loin d'être clarifié. Il ne semble pas cependant que la FSH, la prolactine ou les corticoïdes puissent être considérés comme des facteurs essentiels. L'inhibition de l'effet rétroactif positif exercé par les œstrogènes sur la libération de la LH ; a également été avancé. L'implication de la LH est davantage démontrée et surtout ses relations avec les peptides opioïdes endogènes (EOP: Endogenous Opioid Peptides) (Drion et al., 2000).

### **3. Effet de l'imprégnation de la P4 pendant la gestation :**

Le contrôle hormonal d'une reprise de l'activité ovarienne au cours du post-partum est éminemment complexe et implique tout à la fois les hormones hypothalamiques, hypophysaires, ovariennes voire surrénaliennes. De nombreuses études se sont attachées, dans un premier temps, à identifier les principales variations hormonales chez la vache laitière et allaitante et par la suite à identifier le mécanisme d'effet de deux facteurs impliqués dans la durée de l'anœstrus physiologique du post-partum: l'état en lactation ou allaitant de l'animal, d'une part, et son état corporel, d'autre part.

Sur le plan hormonal, il est classique de distinguer deux périodes au cours du post-partum: la première ou phase 1 s'étend de la parturition jusqu'à la libération préovulatoire de l'hormone LH. La seconde, ou phase 2, est comprise entre le moment de cette libération et le retour à une cyclicité normale (Drion et al., 2000).

### **4. Le caractère dystocique.**

## CHAPITRE III:

### 3. L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-GONADIQUE.

#### I. Introduction :

L'ensemble des mécanismes de reproduction est conditionné par un équilibre neuroendocrinien dans lequel interviennent les hormones hypothalamo-hypophysaires, les stéroïdes ovariens et les prostaglandines.

Ceci expliquerait que la biosynthèse et la libération des gonadotrophines hypophysaires, LH et FSH, sont sous la dépendance directe d'un petit nombre de neurones peptidergiques du système nerveux central : les neurones à GnRH, dont la fréquence de libération est presque exclusivement pulsatile. Toutefois, il existe une dissociation des profils plasmatiques des deux hormones à différentes phases du cycle, ce qui implique une autonomie partielle des systèmes de contrôle. Cette régulation différentielle est assurée pour l'essentiel par des rétroactions d'origine gonadique, agissant directement au niveau hypophysaire, bien que l'existence d'un facteur FSH-RH spécifique ne soit toujours pas totalement exclue (annexe 6).

En conséquence, la compréhension de ces différents mécanismes de régulation revêt une importance particulière puisque les sécrétions gonadotropes et, d'une façon plus générale, la reproduction elle-même, dépendent en grande partie de la fréquence d'apparition des pulses de GnRH (Caldani et al., 1993).

#### II. L'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien :

La fonction de reproduction repose sur l'intégrité des interactions existant au sein de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Les différentes composantes de ce système se différencient très tôt au cours du développement embryonnaire et établissent des relations fonctionnelles *in utero* qui s'avèrent nécessaires pour assurer la maturation sexuelle (annexe 6).

##### **1. Développement embryonnaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire :**

L'hypophyse est composée de 3 lobes, appelés antérieur, intermédiaire et postérieur. L'ensemble des lobes antérieur et intermédiaire constitue l'adénohypophyse.

Dans toutes les espèces, l'organogenèse de l'hypophyse est extrêmement précoce. Pendant longtemps, il a été admis que l'hypophyse antérieure se développait à partir de l'ectoderme oral. Cependant, ce concept a été remis en question au profit d'un modèle selon lequel l'hypophyse prendrait naissance au niveau des crêtes neurales ventrales du tube neural primitif (Thibault et al., 1991). Ce modèle s'accorde avec l'existence des liens morphologiques étroits entre hypothalamus et hypophyse et met en évidence l'origine commune des 2 composants de l'axe hypothalamo-hypophysaire puisque le diencephale dérive de la même région.

##### **2. L'activité de l'axe pendant la période adulte :**

Chez tout les animaux, l'initiateur et le régulateur fondamental de la fonction reproductrice est la GnRH (gonadotrophin releasing hormone ou gonadolibérine), qui est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus. La GnRH se lie alors aux récepteurs spécifiques situés sur les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, ce qui provoque la synthèse et la libération des gonadotrophines, l'hormone follicule stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH).

Les principaux facteurs internes qui régulent la sécrétion de GnRH sont les hormones stéroïdes ovariennes, la progestérone et l'oestradiol (fig. 3-1). La progestérone agit sur les neurones de la GnRH pour diminuer la sécrétion de GnRH en abaissant la fréquence des décharges de GnRH, tandis que les effets de l'oestradiol sur la femelle dépendent de la dose administrée et de la présence ou de l'absence de concentrations de progestérone durant la phase lutéinique. Lors de la phase lutéinique où les concentrations de progestérone sont élevées, l'oestradiol agit en synergie avec la progestérone pour diminuer la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, c'est-à-dire qu'il y a une rétroaction négative sur la GnRH. Lors de la phase folliculaire, en l'absence de progestérone et en présence de fortes concentrations de GnRH, l'oestradiol sécrété par le follicule

pré-ovulatoire a une rétroaction positive sur la GnRH, ce qui provoque la prolongation d'une sécrétion élevée responsable des pics pré-ovulatoires de LH et de FSH.

L'action de la GnRH sur l'antéhypophyse peut également être influencée par des hormones spécifiques produites par le follicule. La plus intéressante de toutes est l'inhibine. Cette hormone supprime sélectivement la libération de FSH par l'antéhypophyse sans affecter la sécrétion de LH. L'activine quant à elle, stimule aussi la synthèse de FSH alors, l'équilibre entre ces deux facteurs peut déterminer le niveau de sécrétion de FSH. Les structures de sécrétion des deux hormones sont extrêmement différentes; cependant ces deux hormones sont produites dans la même cellule sous le contrôle d'une seule hormone libératrice.

La libération différentielle de LH et de FSH par la même cellule gonadotrope requiert des mécanismes de contrôle intracellulaires différents à l'intérieur de la cellule. Les gonadotrophines synthétisées sont stockées dans des granules sécrétoires à l'intérieur du cytoplasme, et sont sécrétées par action différentielle, par exocytose. Il apparaît que le stockage de LH se prolonge durant le cycle œstral, mais le stockage de FSH est bas et de courte durée, la teneur en FSH dans l'antéhypophyse des brebis représentant seulement 2 à 3% de la teneur en LH. Durant le cycle œstral de la brebis, jusqu'à 50% de FSH est libérée chaque jour tandis que seulement 1 à 5% de LH est libérée. Par contre, jusqu'à 70% de la LH totale est libérée durant la montée préovulatoire. Il est à présent évident que la LH est étroitement régulée par la GnRH, mais que la FSH n'est pas seulement affectée par la GnRH, mais aussi par un contrôle local via les interactions de l'inhibine et de l'activine.

La LH est sécrétée de façon pulsatile. La fréquence des décharges de LH est régulée par la sécrétion de progestérone durant la phase lutéinique, le déficit énergétique de la vache en post-partum, et par le stimulus de l'allaitement du veau. Chez la vache en post-partum, les trois facteurs qui diminuent la fréquence des décharges de LH et empêchent par conséquent l'ovulation sont les suivants :

- Mauvais état corporel de l'animal et nutrition (perte supérieure à 10% du poids corporel après le vêlage).
- Allaitement de 4 – 6 semaines après le vêlage,
- Progestérone durant la phase lutéinique du cycle.

Les trois principales fonctions de la LH sont la stimulation de la maturation finale du follicule dominant par la stimulation de la production d'œstradiol, l'induction de l'ovulation, et la stimulation de la sécrétion de progestérone par le corps jaune.

La sécrétion de FSH se produit par pics, mais d'une façon moins marquée, et est régulée par la sécrétion d'œstradiol et d'inhibine par les follicules. L'importance relative de l'œstradiol et de l'inhibine dans la régulation de la FSH n'est pas encore évidente mais on a actuellement tendance à penser que l'œstradiol est un régulateur dynamique de la FSH, tandis que l'inhibine pourrait jouer un rôle plus chronique. Le rôle de la FSH est de stimuler la croissance folliculaire pour atteindre le stade de follicule dominant. Alors, on déduit que la GnRH joue manifestement un rôle pivot dans l'initiation, la régulation et la suppression de la fonction reproductrice.

### a) Les rétrocontrôles de l'axe et la cyclicité :

Deux types d'effets lui sont attribués : une rétroaction positive «*Feedback positif*», dont la mise en route est responsable du déclenchement du pic préovulatoire de gonadotrophines observé dans le sang de tous les mammifères, et une rétroaction négative «*Feedback négatif*», qui peut être modulée par différents facteurs comme la nutrition ou la photopériode. L'étude des rétroactions des stéroïdes sur le GnRH est particulièrement importante pour la compréhension de la physiologie de la reproduction. En effet, les événements ovariens, par la cinétique de leurs sécrétions, vont faire varier les hormones gonadotropes, réalisant ainsi les boucles de régulations qui président à la cyclicité chez la femelle.

#### ▪ Feedback négatif :

**Les stéroïdes :** Actuellement, l'œstradiol et la progestérone chez la femelle, semblent être les stéroïdes sexuels impliqués dans les rétrocontrôles (fig. 3-1). La progestérone peut agir sur des récepteurs membranaires spécifiques, des neurotransmetteurs tels que les acides aminés excitateurs ou inhibiteurs, et pourrait participer par ce biais aux rétroactions.

L'une des premières notions à introduire est l'absence de récepteurs à l'œstradiol sur les neurones à GnRH. Que la rétroaction soit positive (préovulatoire) ou négative, c'est au travers de systèmes intermédiaires

neuronaux, voire de cellules gliales, que s'exercent les rétrocontrôles stéroïdiens. De plus, les récepteurs à la progestérone sont généralement induits par l'œstradiol, et vice versa, ce qui peut expliquer la synergie ou la chronologie des rétroactions stéroïdiennes.

L'œstradiol active les systèmes catécholaminergiques, et notamment ceux utilisant la dopamine qui est inhibitrice de la fréquence des émissions pulsatiles du GnRH. L'œstradiol agit en modulant l'activité enzymatique de ces systèmes : en ralentissant la dégradation du neurotransmetteur par inhibition de la monoamine oxydase, et en stimulant l'enzyme de l'étape limitante de sa biosynthèse, la tyrosine hydroxylase. (Combarnous, 1997).

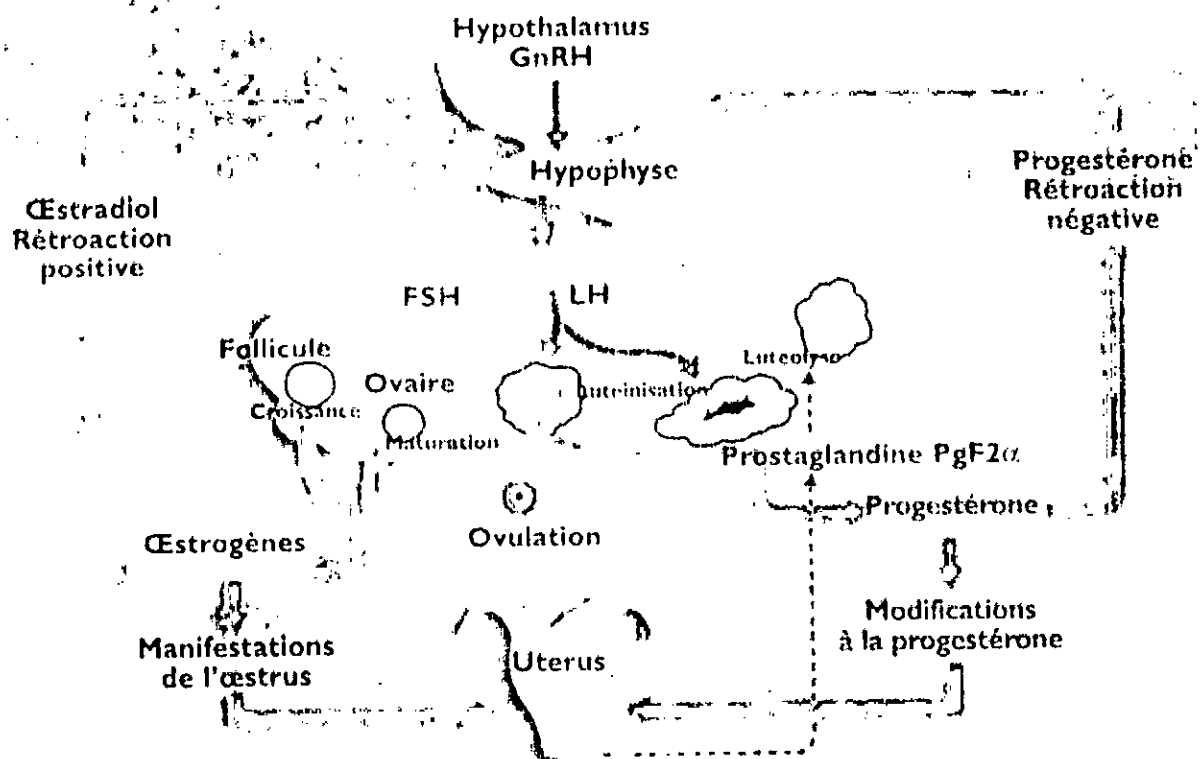
La rétroaction négative de la progestérone sur l'activité gonadotrope s'exerce au travers d'une interaction avec un autre système peptidergique, la  $\beta$ -endorphine.

#### ▪ Feedback positif :

**Les stéroïdes :** L'œstradiol, après une période d'inhibition, induit une très forte stimulation de la sécrétion de GnRH entraînant la décharge préovulatoire de gonadotrophines (fig. 3-1). Alors que la sécrétion de la GnRH est exclusivement épisodique pendant toutes les autres phases de la vie reproductive, elle devient continue pendant le pic préovulatoire. Comme pour le feed-back négatif, l'absence de récepteurs à l'œstradiol sur les neurones à GnRH pose le problème crucial du site et du mécanisme par lesquels le stéroïde induit en quelques heures le pic préovulatoire de GnRH.

Quelques heures avant le pic chez la brebis ou la rate, il existe une activation des opiacées endogènes, et plus particulièrement de la  $\beta$ -endorphine, qui permettrait une accumulation de GnRH dans les terminaisons neuronales (Domanski et al., 1991). Puis, à la chute de  $\beta$ -endorphine, succéderait une activation des systèmes adrénergiques et noradrénergiques, conduisant à la libération préovulatoire de GnRH. Le pic préovulatoire de GnRH résulte donc d'une cascade complexe de différentes rétroactions dont la mise en route temporelle est programmée par l'évolution des concentrations de stéroïdes gonadiques.

Figure 3-1: L'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien et ces différents Feedback. (A.R Peters & P.S.H Ball, 1994).





## CHAPITRE IV:

### 4. LE CYCLE ŒSTRAL.

#### I. Introduction :

La vache est une espèce polyœstrienne de type continu avec une durée moyenne de cycle de 21/22 jours chez la vache multipare et de 20 jours chez la génisse. L'activité sexuelle débute à la puberté, quand l'animal a atteint 40 à 45 % de son poids adulte, puis elle est marquée par cette activité cyclique, caractérisée par l'apparition périodique de l'œstrus. L'œstrus ou chaleur est la période d'acceptation du mâle et de la saillie. C'est la période de maturité folliculaire au niveau de l'ovaire, suivie de l'ovulation. Cet œstrus dure de 6 à 30 heures, et se caractérise par des manifestations extérieures : excitation, inquiétude, beuglements, recherche de chevauchement de ses compagnes et acceptation passive de la monte par un taureau ou une autre vache, écoulement de mucus. L'ovulation ou ponte ovulaire a lieu 6 h à 14 h après la fin de l'œstrus et est suivie par la formation du corps jaune et l'installation d'un état prégravidique de l'utérus, correspondant à la période d'installation de la fonction lutéale.

#### **1. Mécanisme endocrinien du cycle sexuel :**

L'annexe 7 et 9 illustrent l'exemple de la vache ; courbe des profils plasmatiques des hormones hypophysaires (LH, FSH), des hormones ovariennes (œstradiol  $17\beta$  ou E2 sécrété par les follicules mûrs, la progestérone P4 sécrétée par le corps jaune) et de la sécrétion pulsatile de la prostaglandine F2 $\alpha$  d'origine utérine (dosage de métabolite sanguin stable). En abrégé, la sécrétion de l'hormone ovulante LH, est stimulée par la GnRH qui subit une rétroaction «*feedback positive*» par l'œstradiol et «*negative*» par la progestérone. La sécrétion de FSH est à la fois stimulée par la GnRH et contrôlée au niveau hypophysaire par principalement une rétroaction négative due à l'inhibine (INH), sécrétée par les follicules ovariens en croissance.

Un dialogue hormonal très coordonné s'installe durant un cycle œstral, puisqu'au début d'un cycle, l'hypothalamus sécrète la gonadolibérine GnRH qui stimule, juste au-dessous de lui la sécrétion par l'hypophyse de FSH et LH. Ces deux hormones se répandent par le sang dans l'organisme. Réaction de l'ovaire : un follicule (ou plusieurs) se développe et sa thèque interne commence à sécréter l'œstradiol. Cette sécrétion d'œstradiol «*prévient*» l'hypothalamus qu'il doit intensifier sa sécrétion de GnRH (Hormone découverte assez récemment par Guillemain et Schally vers 1971), ce qu'il fait aussitôt : l'hypophyse à son tour renforce la production de FSH et LH (la FSH est ensuite inhibé par une substance appelée inhibine sécrétée par le follicule dominant chez la vache alors que la LH n'est pas influencée), et la thèque interne du follicule intensifie sa sécrétion d'œstradiol «*feedback positif*». Il arrive un moment où ce renforcement mutuel (œstradiol - GnRH - FSH et LH) aboutit à une telle montée du taux de FSH et LH (montée qui sur une courbe forme deux «*pics*») que l'ovulation se produit (annexe 8).

A la place du follicule s'installe donc le corps jaune, qui se met à sécréter activement la progestérone, et aussi l'œstradiol. Mais cette fois, c'est l'action de la progestérone qui domine : alors que l'œstradiol excitait l'hypothalamus, la progestérone freine la sécrétion de GnRH d'où diminution des taux de FSH et LH. L'ovaire, de ce fait, diminue sa sécrétion d'œstradiol et de progestérone : le corps jaune régresse. Lorsqu'il a suffisamment régressé, le frein qu'exerçait la progestérone sur l'hypothalamus se desserre, et la production de GnRH reprend : un nouveau cycle se met en route.

S'il y a fécondation, l'embryon sécrète une hormone d'effet comparable à celui de LH : le corps jaune est stimulé et devient corps jaune gestatif. Et au bout d'un mois, c'est le placenta qui prend le relais des ovaires en sécrétant progestérone et œstrogènes (sauf pour la vache où sa sécrétion est insuffisante alors que le corps jaune persiste jusqu'à la fin de la gestation chez cette espèce).

#### **2. Le cycle œstrien :**

Alors que la spermatogenèse du mâle est permanente, le fonctionnement sexuel de la femelle est cyclique, exemple la vache, tout au long de l'année (la vache n'a pas de rythme saisonnier), l'appareil génital de la vache, des ovaires aux voies génitales, subit des transformations au cours d'un cycle de 16 à 24 jours, en moyenne 20-21 jours. On distingue dans ce cycle quatre phases :

**Le Pro-œstrus :** correspond au développement, sur l'ovaire, d'un ou de plusieurs follicules, et à la sécrétion croissante d'œstrogènes (surtout l'œstradiol). Le pro-œstrus dure en moyenne 3 jours.

**L'œstrus :** (œstrus, du grec oistros, fureur, transport de désir. œstrogène signifie donc « qui provoque l'œstrus ». C'est l'hormone qui stimule le désir sexuel). Ou « chaleurs », correspond à la maturation du follicule et à la sécrétion maximale d'œstrogènes. Il dure en moyenne 1 jour.

**Le Post-œstrus :** Débute par l'ovulation et se caractérise par la formation du corps jaune et la sécrétion croissante de progestérone, hormone qui « prépare la gestation ». Il dure en moyenne 8 jours. Enfin, en cas de gestation, l'embryon et le placenta peuvent sécréter des hormones à action LH, qui entretiendront la sécrétion de progestérone par le corps jaune. On dit que ces hormones sont lutéotropes. Chez certaines espèces, le placenta sécrète également des œstrogènes et de la progestérone, allant jusqu'à prendre le relais du corps jaune. C'est le cas chez la femme, mais également la brebis, et dans une moindre mesure chez les autres espèces.

**Le Di-œstrus :** Voit la régression du corps jaune faute de gestation, et la chute de sécrétion de la progestérone. Il dure lui aussi environ 8 jours.

### 3. Le cycle utérin :

Au cours du cycle, sous l'effet de l'œstradiol puis de la progestérone, la muqueuse interne de l'utérus ou endomètre, et celle du col, évoluent ainsi :

**Pendant le pro-œstrus,** l'épithélium de l'endomètre s'épaissit, se vascularise (des vaisseaux sanguins minuscules s'y développent) et se garnit d'abondantes glandes tubulaires. Dans le col, largement entrouvert (1cm de diamètre) un mucus particulier, le mucus cervical (ou glaire cervicale) commence à se liquéfier.

**Pendant l'œstrus,** l'utérus se poursuit sa congestion, surtout au niveau des cotylédons. Le col s'ouvre davantage (2 cm environ) et le mucus cervical liquéfié apparaît à l'extérieur de la vulve de la vache en longs filaments. Pendant le pro-œstrus et surtout l'œstrus, la paroi musculaire de l'utérus est parcourue de contractions qui deviennent maximales sitôt l'ovulation. Ces contractions ont pour but de favoriser la remontée éventuelle des spermatozoïdes.

**Pendant le post-œstrus,** l'action de la progestérone accentue les modifications utérines dues à l'œstradiol : la muqueuse de l'endomètre se développe au maximum. En fin de période, les glandes tubulaires de l'utérus sécrètent un liquide blanchâtre, le lait utérin, dont la sécrétion s'intensifiera s'il y a gestation, particulier aux ruminants, joue un rôle dans la nutrition du fœtus. Dans le col qui se ferme, le mucus cervical s'épaissit et ne coule plus. A mesure que la progestérone prédomine sur les œstrogènes, les contractions de l'utérus se calment, et disparaissent en fin de période, condition nécessaire pour l'éventuelle nidation de l'embryon.

**Pendant le di-œstrus,** enfin, la chute du taux de progestérone entraîne la régression de l'endomètre, mais sans rupture. Cette chute de la sécrétion de progestérone par le corps jaune est accentuée en fin de cycle par une décharge de prostaglandine PGF2 $\alpha$  sécrétée par l'utérus. (La prostaglandine PGF2 $\alpha$  est l'une des nombreuses prostaglandines, une quinzaine propres à chaque espèce. Leur nom « prostaglandine » vient du fait qu'elles ont été primitivement isolées dans la prostate.) Le col se ferme hermétiquement par un bouchon de mucus cervical épais, qui, en cas de gestation, prend la consistance du caoutchouc.

### 4. Les manifestations de chaleurs :

Les progrès réalisés ces 20 dernières années en matière de maîtrise de la reproduction sont considérables. Certes, la reproduction « naturelle » avec le minimum d'intervention de l'homme persiste-t-elle dans certains élevages. Mais des techniques nouvelles, des plus simples aux plus sophistiquées, sont venues modifier les conditions de reproduction des animaux. Ces techniques, très nombreuses, nous pouvons les classer ainsi :

- Les techniques de détection des chaleurs et d'accouplement.
- les procédés de groupage des chaleurs et de désaisonnement.
- L'insémination artificielle.

- La transplantation embryonnaire.
- Les techniques accompagnant la gestation et la mise bas : diagnostics de gestation, conduite de la gestation, conduite de la mise bas.
- Les techniques de contrôle et d'amélioration de la fécondité et des autres critères de la reproduction (prolificité, fertilité).

**Les chaleurs de la vache :** (18 heures) La vache est une espèce à cycles indépendants de la saison, à ovulation spontanée, c'est-à-dire indépendante de l'accouplement, et à anestrus de lactation plus ou moins prononcé, c'est-à-dire dont les cycles ne reprennent pas sitôt la mise bas. Chez la génisse, les premières chaleurs débutent entre le 7<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> mois, la précocité sexuelle variant selon les races. L'apparition de la cyclicité chez les génisses laitières est conditionnée notamment par le poids. Différentes études montrent que 95% des génisses sont cyclées lorsque le poids de 400 kg est atteint.

Les cycles de la génisse et de la vache sont en moyenne de 21 jours, avec des chaleurs de 18 heures en moyenne, dont le déroulement peut être divisé en 3 phases :

**a) Phase de préparation (de 6 à 10 heures) :**

La vache mange peu, flaire les autres vaches et cherche à les monter. Dans les troupeaux allaitants elle cherche à se rapprocher du taureau, mais ne se laisse monter ni par le taureau ni par d'autres vaches. La vulve est légèrement gonflée, plus rouge et humide, et peut laisser s'écouler de longs filaments muqueux translucides à jaune clair : c'est la glaire cervicale obturant le col de l'utérus, qui se liquéfie.

**b) Phase de chaleurs vraies (de 16 à 18 heures) :**

Mêmes manifestations, mais avec agitation plus prononcée. La vache meugle, cherche à chevaucher les autres vaches et se laisse monter par elles ou par le taureau. Si elle est en lactation, sa production laitière diminue légèrement : c'est l'action inhibitrice qu'exerce la folliculine sur la prolactine, hormone de la sécrétion du lait.

**c) Phase de fin de chaleurs :**

La vache continue à flairer les autres vaches mais ne se laisse plus chevaucher. L'écoulement muqueux peut devenir moins clair, avec parfois des stries de sang.

Donc, on définit l'œstrus comme l'ensemble des modifications physiologiques accompagnant l'ovulation, alors que les chaleurs sont les manifestations extérieures de l'œstrus, manifestations visibles ou non par l'éleveur. Selon les espèces, les chaleurs se manifestent différemment, d'où le grand intérêt de cette étude pour la mise à la reproduction naturelle (monte) ou artificielle (insémination).

## CHAPITRE V:

### 5. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE.

#### I. L'Ovulation :

La durée totale de la croissance folliculaire excède de beaucoup la durée d'un cycle sexuel dans toutes les espèces (annexe 10). Si la croissance des follicules préantraux est très lente, le développement terminal des follicules s'effectue en quelques jours, voire quelques heures. Arrivé au terme de son développement, en réponse à une forte élévation de gonadotrophines (la décharge ovulante), le follicule s'ouvre et libère l'ovocyte : l'ovulation se produit : 11 - 12 heures après chez la lapine, 12 - 13 h chez la souris, 23 - 35 h chez la brebis, 29 - 31 h chez la vache, 35 - 36 h chez la femme et 41 - 43 h chez la truie (Thibault et al., 2001).

La croissance terminale du follicule s'accompagne d'importants changements fonctionnels au niveau des cellules folliculaires et de l'ovocyte. C'est pendant cette phase que le follicule devient capable d'ovuler en réponse à une élévation brutale des concentrations circulantes de gonadotrophines, et que l'ovocyte acquiert de façon très importante, aboutissant à une sécrétion massive d'œstradiol par le follicule préovulatoire (annexe 8). La perte de prolifération des cellules de granulosa observée au cours de la croissance finale du follicule à antrum correspond à l'acquisition progressive par ces cellules d'un état terminal de différenciation, caractérisé par une forte expression des enzymes de la stéroïdogénèse (cholestérol side-chain cleavage et aromatasase), une plus grande sensibilité à l'action de FSH et l'acquisition de récepteurs de LH. Parallèlement, on observe le développement, dans les cellules de la thèque, de l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse d'androgènes (cholestérol side-chain cleavage, 17 $\alpha$  hydroxylase, C17-20 lyase) ; précurseurs des œstrogènes, ils sont sécrétés par les cellules de granulosa. Ces changements fonctionnels sont sous la dépendance étroite de l'action des deux gonadotrophines, FSH et LH. (Combarnous, 1997).

Dans la majorité des cas, l'ovulation se situe en général 30 heures (29 - 31 heures) après la décharge ovulante, de l'hormone hypophysaire LH, soit 10 à 12 heures après la fin de l'œstrus, plus fréquemment sur l'ovaire droit que sur le gauche. L'ovule demeure fécondable 8 à 12 heures après l'ovulation, le spermatozoïde restant fécondant 24 à 48 heures dans les voies génitales femelles.

#### I. Modification cytologique lors de l'ovulation :

La thèque externe devient oedémateuse par diffusion du plasma sanguin, les faisceaux de fibres de collagène de la thèque externe et de l'albuginée se distant. Les cellules du cumulus subissent les mêmes transformations que les cellules de la granulosa mais comme elles sécrètent abondamment de l'acide hyaluronique leur dissociation est totale, l'ovocyte pilote cette sécrétion : le cumulus sans ovocyte ne produit plus d'acide hyaluronique. A l'inverse des autres espèces, la corona radiata disparaît rapidement chez les ruminants, elle ne joue donc aucun rôle dans la fécondation (Thibault et al., 2001).

Peu avant, la rupture folliculaire, la lame basale séparant la granulosa de la thèque disparaît par endroits et des vaisseaux sanguins néoformés pénètrent dans la granulosa entraînant des cellules de la thèque interne préparant ainsi la formation du corps jaune. Au niveau de l'apex les changements sont les suivant :

- L'épithélium ovarien s'étirent et s'aplatissent accompagnant l'extériorisation du follicule à la surface de l'ovaire, puis se détachent.
- Les cellules sous-jacentes de la granulosa, des théques et de l'albuginée se dissocient complètement puis disparaissent (apoptose et nécrose).
- Le liquide folliculaire s'échappe entre les cellules, puis la rupture du follicule s'achève par désintégration complète de l'apex, par contre, l'expulsion de l'ovocyte résulte de la contraction du follicule en réponse à la chute de la pression hydrostatique (Thibault et al., 2001).

## 2. Modification vasculaire au cours de l'ovulation :

Peu après la décharge ovulante (ou l'injection de LH/hCG) se produisent :

- Une augmentation du flux sanguin ovarien associée à une hyperhémie due à une vasodilatation : le diamètre des vaisseaux et la surface des capillaires doublent dans la thèque interne (brebis et ratte).
- Une augmentation de la perméabilité vasculaire par exsudation du plasma sanguin et apparition de fenestrations dans les parois capillaires par où s'échappent également des cellules sanguines.
- Peu avant l'ovulation se produit une vasoconstriction principalement sur l'apex (stigma) où l'ischémie est totale, favorisant la nécrose de cette zone et donc sa fragilité (Thibault et al., 2001).

## II. La Fécondation :

La fécondation ayant lieu dans l'ampoule de la trompe, que l'ovule atteint dans les 6 heures après l'ovulation, l'insémination artificielle doit avoir lieu dans la deuxième partie des chaleurs pour que les spermatozoïdes aient le temps d'atteindre cette zone. La pénétration du spermatozoïde dans l'ovule se fait grâce à un mécanisme enzymatique (hyaluronidase). L'ovule, resté en métaphase de la seconde division méiotique, reprend sa division cellulaire pour former le pronucléus femelle et le second globule polaire. L'œuf descend vers l'utérus et y arrive au bout de 4 jours au stade 8 à 16 cellules (morula).

Durant cette phase, On distingue les principales étapes suivantes de la fécondation :

### 1. L'accouplement :

Durant cette phase la femelle accepte le mâle, et s'immobilise lors de la monte, ce phénomène est caractéristique des élevages extensif, puisque le taureau détecte la vache qui est en chaleurs et s'accouple avec elle. L'accouplement se fait en générale en 4 phases ; le taureau s'approche de la femelle en chaleur il la flaire ; puis la vache s'immobilise pour permettre au mâle de monter, celui-ci chevauche la femelle, son pénis pénètre dans le vagin de la femelle et finalement d'un coup de rein il éjacule à l'intérieur des voies génitales femelle, les deux dernière sont très rapide chez les bovins il ne dure que quelques secondes.

Cette opération du faite de ses risques pour la femelle a été délaissée en faveur de l'insémination artificielle largement répandue dans les élevages laitiers à titre d'exemple 100% des vaches de races laitières sont inséminées au Danemark. Pour les risques des montes naturelles on citera :

- Le risque des maladies sexuellement transmissibles ; puisque un taureau pourrait infecté un grand nombre de femelles d'un cheptel ; puisqu'il peut s'accoupler avec de nombreuses vaches.
- Le risque de fracture de la femelle lors de la monte, surtout par les taureaux lourds.
- L'entretien lourd d'un taureau puisqu'il ne produit rien et il n'est utilisé que pendant la saillie.
- La qualité génétique souvent médiocre des taureaux géniteurs.

### 2. La capacitation des spermatozoïdes :

Les spermatozoïdes éjaculés ne sont pas directement féconds. Ils acquièrent leur fécondance soit, *in vivo*, dans les voies génitales femelles, soit *in vitro*, après diverses manipulations. En général, *in vivo*, l'éjaculat est déposé dans le vagin chez la grande majorité des mammifères ; les spermatozoïdes quittent alors le plasma séminal en traversant le col utérin. Cependant, chez certaines espèces (verrat, étalon, chien), l'éjaculat étant déposé directement dans l'utérus, les spermatozoïdes s'en libèrent complètement dans l'isthme tubaire. Cette maturation progressive du sperme peut toutefois être obtenue dans les voies génitales d'une autre espèce (sperme de taureau chez la brebis, par exemple). Les mécanismes de la capacitation dans les voies génitales ne sont qu'incomplètement compris, ce qui explique les méthodes semi empiriques utilisées *in vitro*. On sait que le plasma séminal présente des substances inhibitrices de la motilité des spermatozoïdes, d'où la nécessité de l'éliminer. Par exemple chez le taureau, il contient une protéine sécrétée par les glandes annexes qui fixe les ions  $Ca^{++}$  nécessaires à la motilité. Les ions  $Zn^{++}$ , sécrétés par la prostate, bloquent l'activité membranaire phospholipase A2 du spermatozoïde utile à la formation de produits déstabilisateurs de la membrane telle que la phosphatidylcholine.

Des modifications importantes de la membrane du spermatozoïde sont également observées au cours de la capacitation qui a lieu, *in vivo*, en 5 à 10 h (taureau, bœuf, verrot) et, *in vitro* entre 2 et 8 h à partir de

sperme éjaculé (homme : 2 h ; taureau, bélier, verrat : 6 h ; lapin : 8 h). La motilité des spermatozoïdes est nettement modifiée. Leurs mouvements de cisaillement deviennent plus favorables à la pénétration mécanique de la zone pellucide. On assiste à la transformation d'un mouvement linéaire du spermatozoïde en mouvement de rotation. Ces changements concernent le flagelle et la pièce intermédiaire. La perméabilité au  $\text{Ca}^{++}$  est nettement augmentée par ouverture des canaux ioniques après disparition de protéines de revêtement et perte de cholestérol. L'activation d'une adénylate cyclase -  $\text{Ca}^{++}$  dépendante augmente la disponibilité en AMPc qui phosphorylerait la tubuline.

### 3. Pénétration du cumulus oophorus :

Chez la plupart des mammifères (dont l'homme), l'ovocyte ovulé est encore entouré de son cumulus oophorus, constitué de plusieurs assises de cellules folliculaires et d'une matrice riche en acide hyaluronique. Mais chez certaines espèces, comme chez les ruminants, les cellules folliculaires sont rapidement dispersées dans l'ampoule de l'oviducte et les spermatozoïdes entrent directement en contact avec la membrane pellucide de l'ovocyte. Lorsqu'il est présent, notamment après maturation *ovocytaire in vitro*, le cumulus n'est traversé que par les spermatozoïdes capités qui sont capables de sécréter de la hyaluronidase.

### 4. Fixation du spermatozoïde et la réaction acrosomique :

D'après ce que l'on connaît chez la souris, le spermatozoïde se fixe d'abord par des liaisons glycosylées de sa membrane acrosomique externe, c'est-à-dire à la protéine ZP3 de la membrane pellucide de l'ovocyte. Cette protéine a la propriété d'induire la réaction acrosomique du spermatozoïde en se fixant à un récepteur spécifique de la membrane acrosomique externe. Cette liaison glycosylée ligand-récepteur est propre à l'espèce, vu qu'il a été démontré que des membranes pellucides dissoutes induisent *in vitro* la réaction acrosomique de spermatozoïdes homologues (souris, vache, femme). Cette liaison ligand ZP3-récepteur activerait une tyrosine kinase et provoquerait une cascade de phosphorylations-déphosphorylations qui entraînerait très rapidement (5 - 10 mn) des modifications profondes du spermatozoïde aboutissant à la réaction acrosomique caractérisée par la formation de vésicules membranaires et la libération d'enzymes acrosomiques par exocytose : notamment la hyaluronidase et l'acrosine. Après avoir traversé la membrane pellucide, les gamètes mâle et femelle fusionnent leurs membranes cytoplasmiques au niveau du segment équatorial du spermatozoïde (fig. 5-1). Au moment de la fécondation de l'ovocyte, les granules corticaux sont déchargés par exocytose dans l'espace périvitellin et provoquent des hydrolyses enzymatiques de la membrane pellucide qui la rendent impropre à la pénétration des autres spermatozoïdes, bloquant ainsi toute polyspermie.

### 5. L'activation de l'ovocyte :

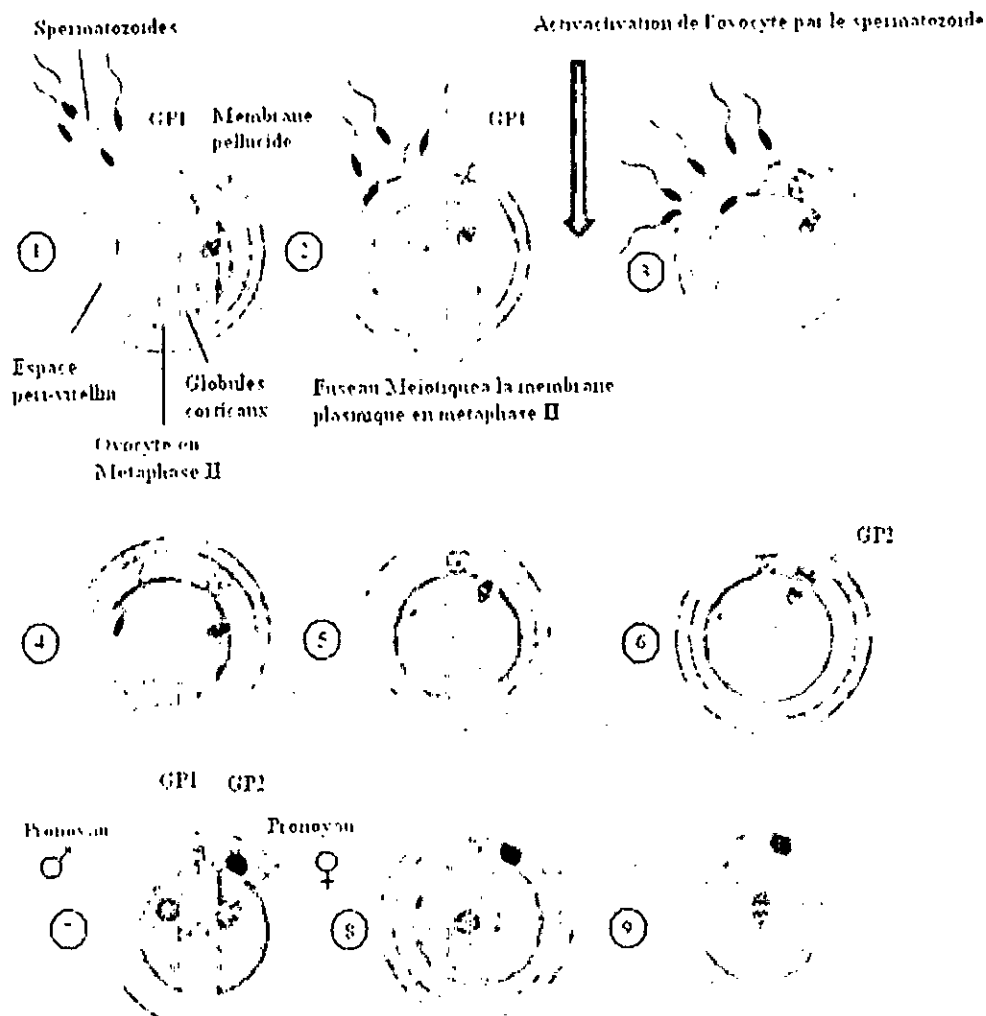
La fusion des gamètes provoque immédiatement (en 10 - 30 s) une décharge massive de  $\text{Ca}^{++}$ , à partir de compartiments intracellulaires de l'ovocyte, puis un accroissement de la perméabilité membranaire en  $\text{K}^+$ , des vagues d'hyperpolarisation avec diminution progressive du potentiel de base : - 20 à - 40 mV chez l'ovocyte de hamster. La vague de  $\text{Ca}^{++}$  débute au niveau du point de pénétration du spermatozoïde, puis se propage dans l'ensemble de l'œuf en quelques secondes. Elle est suivie, à quelques minutes d'intervalle, d'autres vagues de  $\text{Ca}^{++}$ . On peut d'ailleurs activer des ovocytes de lapin sans fécondation en induisant, par des stimulations électriques pulsatiles, l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire : on obtient ainsi très régulièrement (100%) des embryons parthénogénétiques jusqu'au stade blastocyste. On peut encore obtenir une mobilisation de  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaire en injectant dans l'ovocyte de l'IP3 (inositol-1-4-5-triphosphate) (Scriban, 1999). L'injection, dans l'ovocyte de hamster ou de lapin, d'extraits cytoplasmiques de spermatozoïdes provoque également une série d'hyperpolarisations membranaires et toutes les manifestations de l'activation c

Il semble donc, qu'après la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte, qu'un facteur cytoplasmique soluble, appelé récemment oscillo-gène (Scriban, 1999), activerait directement, et sans affecter l'augmentation d'IP3, la mobilisation du  $\text{Ca}^{++}$ , probablement, par une cascade de phosphorylations-déphosphorylations qui aboutirait à la décondensation du noyau du spermatozoïde. A l'achèvement de la 2<sup>ème</sup> division méiotique et expulsion du 2<sup>ème</sup> globule polaire, une migration des pronoyaux au centre de la cellule, puis fusion et divisions successives par activation du MPF s'amorcent (Meiosis Promoting Factor) (annexe I).

## III. Développement embryonnaire durant stade libre :

Cette phase se situe entre la fécondation et la migration du zygote à l'intérieur des trompes utérines, en d'autre terme la période qui précède la nidation et la fixation du blastocyste sur la paroi de l'endomètre en d'autre terme ce stade correspond à l'étape morula. Chez la vache, si deux œufs sont pondus par

le même ovaire, un seul survivra dans la corne utérine correspondante. Si les deux ovaires ont pondu en même temps un ovule, ces deux ovules peuvent survivre, l'un dans chaque corne. Il y aura gestation gémellaire (rare).  
 Figure 5-1 : Les différentes étapes de la fécondation et l'activation ovocytaire (Croset et al, 1991).



L'œuf résultant de la fécondation commence aussitôt à se diviser : deux, quatre, huit, puis seize cellules, toujours entourées de la zone pellucide. Ce petit amas qui n'a fait que diviser le cytoplasme de l'ovule sans augmenter de volume ressemble, au microscope, à une petite mère, morula en latin. Ce stade est atteint au bout de 3 à 4 jours tandis que l'œuf descend lentement l'oviducte vers l'utérus, poussé par les mouvements ciliaires et les contractions. Il l'atteindra (où ils atteindront s'ils sont plusieurs) au bout de 2 à 4 jours chez la brebis, 4 à 5 jours chez la vache. Durant les 15 à 30 jours suivants, selon les espèces, l'œuf va vivre libre dans l'utérus. Durant cette vie libre, l'œuf se nourrit à partir du « lait utérin » sécrété par les glandes de l'endomètre (annexe 11).

### La première différenciation (le stade blastocyste) :

Après ces premières divisions à l'intérieur de la zone pellucide, celle-ci s'amincit puis disparaît, et l'œuf continue à multiplier ses cellules. Bientôt les cellules, jusque là toutes semblables, vont se différencier et s'organiser :

- Quelques cellules plus volumineuses se groupent en une petite masse, le bouton embryonnaire, premières cellules de l'embryon, futur organisme.
- Les autres cellules, plus petites, se placent à la périphérie formant une couche appelée trophoblaste (de *trophin*, nourrir, et *blastos*, bourgeon) : ces cellules donneront naissance aux enveloppes chargées de nourrir l'embryon (En fait seule l'enveloppe externe ou chorion provient du trophoblaste. L'enveloppe interne ou amnios se forme, comme le fœtus, à partir du bouton embryonnaire).

- L'ensemble embryon plus trophoblaste se creuse d'une cavité remplie de liquide et prend le nom de blastocyste (de *blastos*, germe, bourgeon, et *cystis*, vésicule). L'œuf devenu blastocyste poursuit sa croissance, le bouton embryonnaire se développant en embryon, le trophoblaste se développant en enveloppe.

#### a) Les premiers stades de l'embryogenèse :

Après la fécondation, l'œuf ou zygote se segmente. Cette première division au stade 2 cellules survient entre 10 et 20 h selon les espèces de mammifères, ce qui est relativement lent si l'on considère que 3 h après la fécondation, l'œuf de xénope compte 8 cellules et la drosophile 6 000 cellules. Chez la vache, le stade morula a lieu au 5<sup>ème</sup> jour de gestation et le stade blastocyste au 6<sup>ème</sup> jour. Le développement précoce d'un embryon humain est en avance d'environ 1 jour par rapport à celui des ruminants (blastocyste J5) et celui de lapine ou de souris d'environ 2 jours (morula J3, blastocyste J4). La deuxième division (stade 4 cellules) est légèrement asynchrone et se traduit par l'existence d'un stade intermédiaire de 3 cellules pendant 1 ou 2 h. Jusqu'au stade 8 (8 cellules), les divisions sont égales, mais s'effectuent sans régularité (Scriban, 1999).

À partir du stade 8 chez la souris, 16 - 32 chez la vache, des contacts s'établissent entre les blastomères. Des jonctions sont de plus en plus étroites, l'embryon devient une morula compactée à 32 cellules chez les ruminants. On ne distingue plus alors nettement les blastomères. Chaque blastomère présente un axe de polarité qui dépend des contacts et des communications intercellulaires et acquiert une perméabilité sélective aux ions. Du liquide commence à s'accumuler à l'intérieur de la morula de 80 à 100 cellules chez la vache : c'est le début de la formation du blastocyste (J6) avec sa cavité, le blastocoele. C'est aussi le moment où se forme le trophoctoderme à partir des cellules polaires (externes) qui assurent un transport actif de liquide, alors que la masse cellulaire interne ou futur embryon à partir des cellules apolaires (internes) (fig. 5-1).

#### b) La totipotence embryonnaire :

Durant les premiers stades de segmentation de l'embryon, les blastomères sont dites : totipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier en n'importe quel tissu de l'organisme. Au stade 2 cellules chez la souris et 4 cellules chez la brebis, la vache, la chèvre et la jument, chaque cellule blastomère isolée puis introduite dans une membrane pellucide évidée peut reformer un blastocyste et, après transfert, donner un nouveau-né viable. Ces premières manipulations cellulaires, à l'aide d'un appareillage de micromanipulation (de Fombrune, 1949), ouvraient la voie au clonage embryonnaire des animaux domestiques (Scriban, 1999).

En revanche, dès le stade 8 cellules, ces résultats ne sont possibles qu'exceptionnellement. Par la suite, cette totipotence absolue fait place à une totipotence fonctionnelle. Chez la souris, c'est le cas jusqu'au stade 16 (J3 - J4, morula), mais déjà au stade 32 cellules (J4), toutes les blastomères ne sont pas équivalentes selon leur position dans l'embryon : seules les cellules de la masse cellulaire interne, conservent une totipotence voire une multipotence.

#### c) La compaction embryonnaire :

Le phénomène de compaction des blastomères est une phase très importante car il caractérise la première étape de différenciation des blastomères internes et externes correspondant à la séparation de deux lignées cellulaires qui donneront naissance à la masse cellulaire interne et au trophoctoderme. Ce phénomène se produit à des stades différents selon les espèces : 8 cellules chez la souris, 16 - 32 chez le porc, 32 chez la vache, 32 - 64 chez la brebis.

#### d) Les facteurs de reconnaissance d'une gestation :

Vers le 9 - 10<sup>ème</sup> jour, le blastocyste sort de sa zone pellucide, commence sa pré-implantation qui durera jusqu'au 35 - 40<sup>ème</sup> jour chez la vache où elle sera définitive. C'est l'embryon qui indique sa présence à l'organisme dès le 11<sup>ème</sup> jour suivant la fécondation en sécrétant la trophoblastine (Interféron tau) qui empêchera l'utérus de sécréter la prostaglandine F2 $\alpha$  et permettra ainsi au corps jaune cyclique de perdurer et de devenir corps jaune de gestation actif jusqu'en fin de gestation (Chene et al., 1996).

La période critique pour le maintien de la gestation se situe avant l'implantation où nidation définitive. La mortalité embryonnaire précoce (75 % des cas) a lieu avant le 16<sup>ème</sup> jour et se traduit par un retour de chaleur normal 21 - 24 jours après l'insémination artificielle. Une mortalité embryonnaire plus tardive (25 % des cas), entre 16 et 45 jours, se traduit par des retours en chaleurs irréguliers, et ne correspondant pas à un cycle. Après 45 jours, la nidation est effective, le fœtus a de fortes chances d'aller jusqu'au bout de la gestation. Les avortements sont plus rares que la mortalité embryonnaire ; d'ailleurs la très grande majorité des



avortements embryonnaires ont lieu durant la phase libre de l'embryon, c'est-à-dire jusqu'à l'implantation (J16 chez la brebis, J19 chez la vache) et pendant la période péri-implantatoire (de J16 à J22 chez l'ovine, J19 à J25 chez le bovin).

Donc, le contrôle de l'environnement progestéronique utérin, qui est absolument nécessaire au développement de tout embryon de mammifère, a été depuis longtemps appelé par les anglo-saxons «maternal recognition of pregnancy» qui veut dire : la reconnaissance maternelle de la gestation (Chene et al., 1996). Des modèles ont été proposés avant et maintenant ils ont été confirmés par l'avancée technologique dans la détection des facteurs dans le sang à des doses infinitésimales, le mode de «sauvetage» du corps jaune cyclique et sa transformation en corps jaune gestatif, essentiel à l'établissement de la gestation. Cette régulation a été particulièrement étudiée chez les ruminants, principalement chez la brebis. Mais, les résultats obtenus dans cette espèce sont globalement très généralisables à la vache et la chèvre, à quelques détails près.

En dépit des quantités de publications scientifiques relatives à ce sujet, les mécanismes intimes d'inhibition de la lutéolyse ne sont pas encore totalement compris en raison de leur extrême complexité. Néanmoins, des résultats décisifs ont été obtenus ces dernières années et peuvent expliquer, en partie, les difficultés que le praticien peut rencontrer dans la maîtrise de la reproduction, selon les animaux, en raison des très nombreux niveaux de régulation.

Le trophoblaste embryonnaire sécrète une protéine antilutéolytique, la trophoblastine (Martal et al., 1979) ou interféron- $\tau$  (IFN $\tau$ ), qui est capable de bloquer, par un mécanisme local, la sécrétion pulsatile de prostaglandine F2 $\alpha$  maternelle, responsable de la régression cyclique du corps jaune. Le corps jaune, ainsi maintenu, peut donc continuer à produire de la progestérone (P4) indispensable au développement du conceptus (comprend l'embryon ou bouton embryonnaire «BE» ou masse cellulaire interne «MCI», et ces enveloppes, dont le trophoblaste ou trophoctoderme et l'amnios, le sac vitellin et l'allantoïde, ces derniers proviennent des cellules de la MCI qui donnera aussi le fœtus, alors que le trophoblaste constitue l'essentiel du placenta (ou chorion) (Chene et al., 1996).

Donc, le conceptus ainsi formé produit une protéine antilutéolytique à effet hormonal local (paracrine), d'abord appelée trophoblastine (Martal et al., 1979) ou oTP (trophoblastine ovine ; découverte pour la première fois chez de la brebis, le trophoblaste très allongé du blastocyste «prévient» l'endomètre de sa présence en sécrétant une hormone, la trophoblastine, qui s'est avérée être un interféron (IFN $\tau$ )). Ce signal évite la régression endométriale et permet l'implantation vers le 21<sup>ème</sup> jour après fécondation ; cette production est courte, pendant environ 10 jours (de J9 à J21 chez la brebis, de J9 à J24 chez les vache) (Chene et al., 1996).

Injecté dans l'utérus de brebis cyclées à partir du 10<sup>ème</sup> - 12<sup>ème</sup> jours, la molécules d'IFN $\tau$ , provoque le maintien du corps jaune et sa sécrétion de P4. En plus, elle réduit le nombre des récepteurs endométriaux à l'ocytocine (fig. 5-3) (Chene et al., 1996).

Figure 5-2 : Le développement embryonnaire précoce chez le bovin (Scriban, 1999).

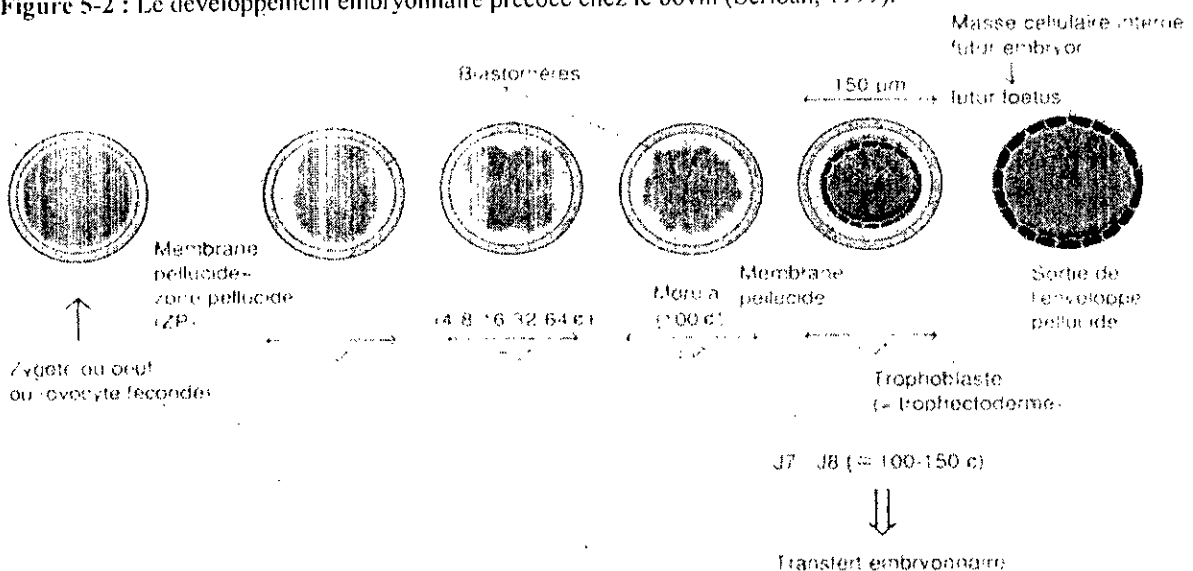
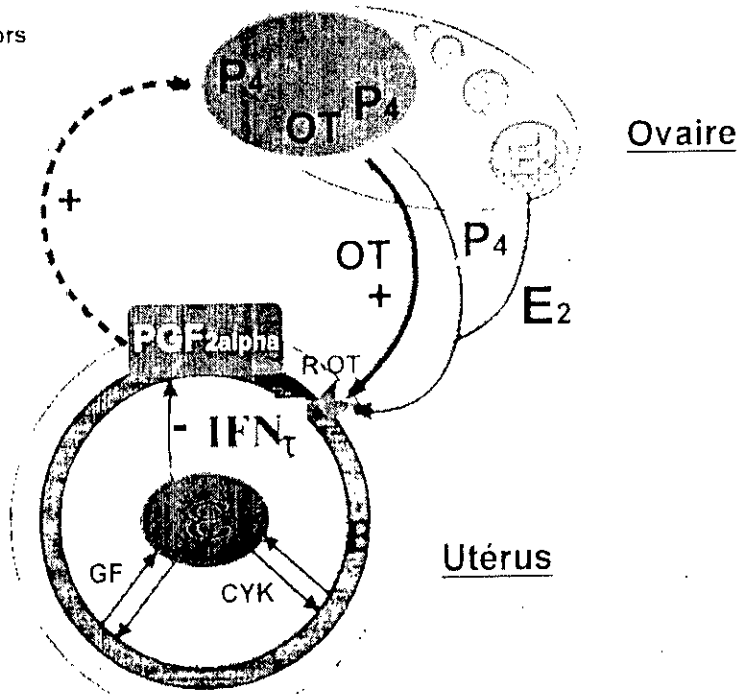


Figure 5-3: Dialogue mère embryon (Scriban, 1999).

GF: Growth factors  
CYK: Cytokines  
OT: Ocytocine  
R: Récepteur



## CHAPITRE VI:

### 6. LA SUPEROVULATION.

#### I. Introduction :

La stimulation ovarienne par les hormones hypophysaires permet d'obtenir une augmentation de la quantité de follicules préovulatoires et, par suite, une augmentation du nombre d'ovulations. Cette technique est surtout utilisée pour obtenir davantage d'embryons lors des transferts embryonnaires. Les hormones gonadotropes sont injectées chez la vache pendant la phase lutéale dont la durée est contrôlée par la PGF $2\alpha$ , chez les ruminants, à la fin d'un traitement progestatif et chez la jument durant la phase folliculaire. On a longtemps utilisé de la PMSG à forte dose chez les ruminants ; actuellement, on préfère l'administration d'extraits hypophysaires dont le rapport FSH/LH est contrôlé. Chez la vache, on obtient en moyenne 5 embryons utilisables par donneuse traitée, mais la variabilité individuelle des réponses reste considérable : 30 % des donneuses ne produisent aucun embryon utilisable en raison d'une mauvaise maturation folliculaire (Scriban, 1999).

Le niveau de réponse ovarienne est lié au nombre et à la taille respective des follicules présents sur l'ovaire au moment de la stimulation : la présence d'un ou deux gros follicules « follicule dominant » (vache : 10 mm ; petit ruminant : 6 mm) étant défavorable, puisqu'on a remarqué que la réponse de superovulation était de 50% inférieure en leurs présences. L'administration d'un agoniste de la GnRH (Buséreline) pendant une longue durée (2 - 3 semaines) élimine tous ces gros follicules. Au moment du traitement de superovulation, tous les petits follicules (3 - 5 mm) pourront être ainsi stimulés, ce qui permettra une réponse accrue et une variabilité réduite (Scriban, 1999).

#### II. Définition :

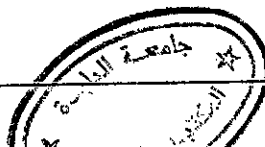
On définit le phénomène de superovulation comme une réaction ovarienne produisant un développement et un nombre d'ovulation au-delà du standard moyen de l'espèce, à titre d'exemple un taux d'ovulation > 2 chez les bovins, de ce fait, on comprend que ce phénomène est provoqué artificiellement. Pour ce faire et spécialement, chez les ruminants domestiques, et plus particulièrement chez les bovins, on a recours aux hormones gonadotropes hypophysaires essentiellement l'utilisation de FSH pour obtenir la superovulation en vue du transfert embryonnaire chez des femelles au potentiel génétique intéressant (Nibart, 1991 ; Saumande, 1995).

#### III. Les différentes méthodes de superovulation :

Deux grandes approches sont exploitées pour donner plus d'embryons, la première consiste par l'utilisation des hormones pour induire une superovulation chez les génisses post-pubères, des vaches adultes et occasionnellement des vêles, la seconde consiste quant à elle, par la récolte, la maturation et la fécondation des ovocytes recueillis directement des ovaires, la première méthode est la plus employée, surtout pour la production d'embryons à but commercial (ET) la deuxième encore à l'expérimentale arrivera bientôt sur le terrain. (Gordon, 1996).

La stimulation de vaches pour produire une superovulation a été sujette à plusieurs recherches durant ces cinq dernières décennies, ces techniques toujours corrigées pour le développement d'une technologie (ET) commercialement acceptable dans l'espèce bovine, à titre d'exemple les descriptions de la technique de superovulation de Smith et Engle en 1927, qui ont enregistré une amélioration du taux d'ovulation après l'utilisation d'extraits d'antéhypophyse de souris et de rat. (Gordon, 1996).

En définitive, deux grandes méthodes hormonales sont employées sur le terrain, ces deux méthodes généralement applicables pour la superovulation des bovins, sont basées sur des traitements hormonaux et ceci, grâce à deux gonadotrophines différentes. L'une des plus simples, est d'administrer par voie intramusculaire (IM), une injection de 1800-3000 UI (habituellement 2000 - 2500 UI) de gonadotrophines chorioniques équine, nommées PMSG (fig. 6-1) ; actuellement appelée eCG (équin chorionic gonadotrophin, extraite du sérum de juments en gestation) le traitement est suivi d'une dose lutéolytique de prostaglandine F $2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ) en IM ou d'un analogue synthétique tel le Cloprosténol, et cela 2 à 3 jours plus tard ; 12 - 24 heures après le premier



PGF2 $\alpha$  on peut redonner une deuxième injection, qui paraît améliorer la production d'embryons. (Seidel et al., 1991).

La deuxième méthode de superovulation est de donner huit à dix injections de folliculine (FSH) en sous-cutanée (S/C.) ou IM à l'intervalle d'une demi-journée (chaque 12h). L'injection intramusculaire est préférée car elle est beaucoup plus fiable : comme avec la PMSG, la prostaglandine F2 $\alpha$  est donnée 48 – 72 heures après l'initiation du traitement, c'est à dire à la 5<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> ou la 7<sup>ème</sup> injection de FSH. Le régime FSH le plus commun est 6 – 6, 4 – 4, 2 – 2, 2 – 2 mg à l'intervalle d'une demi-journée, en plus d'une prostaglandine F2 $\alpha$  donnée à la 6<sup>ème</sup> ou la 7<sup>ème</sup> injection de FSH, par contre, 20 % de plus de gonadotrophines, devraient être données aux vaches qui pèsent plus de 800kg. Quelquefois, de plus hautes doses sont utilisées pour les deux premiers jours, tandis qu'on donne 5 mg pour les doses suivantes (fig. 6-3) (Seidel et al., 1991).

Ces dernières années, la FSH a surpassé la PMSG comme méthode de choix pour superovuler les vaches ; dans la plupart des études comparatives des deux procédures, le traitement par la FSH a donné un nombre plus élevé d'embryons utilisables que celui à base de PMSG. Ceci dit, ces résultats sont en rapport avec la demi-vie élevée de la PMSG (5 jours) par rapport à quelques heures pour la FSH ; produisant ainsi, un recrutement folliculaire continu après l'ovulation (Seidel et al., 1991).

## 1. PMSG comme agent super ovulatoire :

Il y a quelques années, Cole et Hart au USA ont démontré la capacité du sérum de juments gravides à induire une augmentation du taux de l'ovulation chez la rates, établissant ainsi les bases de son utilisation éventuelle et qui est devenue le traitement le plus utilisé pour la superovulation des animaux de ferme, tels les ruminants. Le sérum de juments gravides contient une gonadotrophine de structure glycoprotéique présente dans le sang de juments entre le 40<sup>ème</sup> et 130<sup>ème</sup> jour de gestation (PMSG), qui est l'unique hormone possédant les deux activités biologiques de la FSH et de la LH, de plus actuellement il est connu qu'elle est sécrétée par des cellules spécialisées du trophoblaste qui envahissent l'endomètre maternel entre le 36 et le 40<sup>ème</sup> jour d'où le nouveau nom de eCG récemment proposé. (Gordon, 1996).

Beaucoup d'études, entreprises sur la PMSG (eCG) durant les années 1970 ont conduit à déceler sa présence dans la circulation de la vache après l'ovulation, celle-ci a été néfaste pour les embryons et leurs qualités lors de la récolte. De plus on a trouvé une concentration plus élevée d'oestradiol E2 chez les vaches superovulées avec la PMSG que celles superovulées avec les préparations de FSH, ceci est dû à l'augmentation de l'activité de la 17 $\alpha$ -hydroxylase dans les petits et les grands follicules (Soumano et Price, 1995). On a aussi enregistré que la concentration d'oestradiol est maintenue à des niveaux élevés mais, variable autour du 4 - 5 jours après oestrus chez la vache, en relation avec la demi-vie relativement élevée de la PMSG. (Gordon, 1996).

### a) L'utilisation du sérum anti-PMSG :

Il est connu depuis quelques temps que la PMSG peut induire la formation d'anticorps, d'ici ont démarré des études permettant de trouver la possibilité de prévenir une stimulation excessive de l'ovaire (contenant de nombreux follicules anovulatoires) et secondairement de réduire le taux d'oestradiol par l'utilisation de l'anti-PMSG. Donc pour stopper l'action prolongée de la PMSG, beaucoup de travaux ont utilisé l'administration du sérum anti-PMSG après le début de l'oestrus chez les donneuses superovulées avec la PMSG (fig. 6-1, 6-2).

De meilleurs résultats ont été rapportés, quant à l'utilisation du sérum anti-PMSG entre 5 - 6 h après le pic préovulatoire (Dieleman et al., 1993b) ; la neutralisation de la PMSG a n'importe quel moment avant le pic de LH inhiberait le fonctionnement normal et la stimulation folliculaire (Vos et al., 1995). Pour ces raisons donner de la anti-PMSG à un temps fixe relatif à l'utilisation de PMSG, en plus de l'injection de prostaglandine ou en relation avec le début du comportement à l'oestrus (chaleurs) est non satisfaisant à cause de la variabilité du timing du pic de LH en relation avec ces événements.

Au Canada, Gonzalez et al (1994a) ont administré de l'anti-PMSG 48 ou 60 h après la prostaglandine (donnée 18 h après les 2500 UI de PMSG) et ils rapportèrent que le nombre d'embryons transférables été significativement plus élevé que ce du lot de control. De plus, plusieurs rapports attestent que le temps d'administration de l'anti-PMSG est crucial si on veut qu'il soit effectif et ceci fait que les applications de ces méthodes la rende commercialement difficile sur terrain. (Gordon, 1996).

Figure 6-1 : Protocole de superovulation par la PMSG et Anti-PMSG lors d'un cycle normal, d'après Nibart (1991).

### Superovulation par la PMSG + anti-PMSG

Cycle normal:

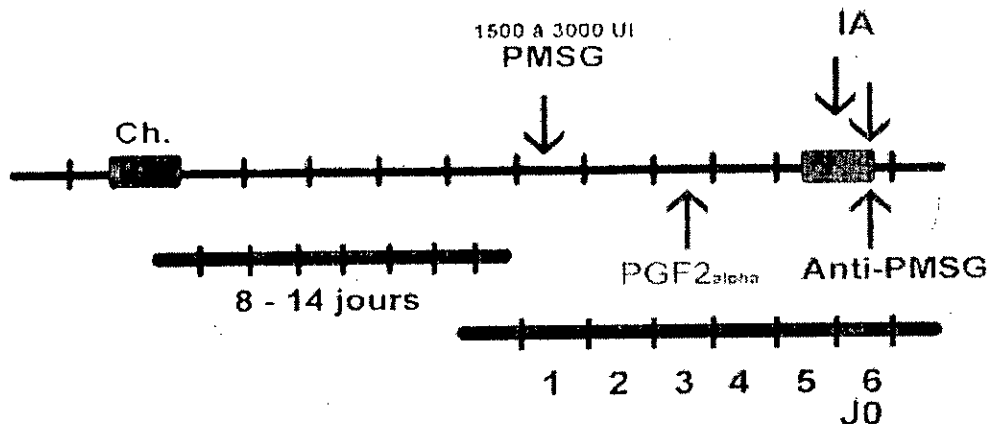
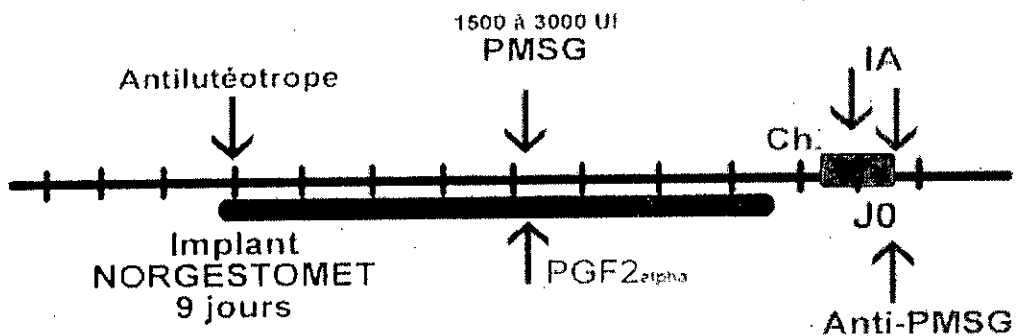


Figure 6-2 : Protocole de superovulation par la PMSG et Anti-PMSG lors d'un cycle maîtrisé, d'après Nibart (1991).

### Superovulation par la PMSG + anti-PMSG

Cycle maîtrisé:



#### **b) L'utilisation combinée de la PMSG et la prostaglandine :**

Auparavant, on avait superovulé les vaches en injectant les gonadotrophines (PMSG) durant les phases folliculaires du cycle oestral, seulement des variabilités sont apparues entre les traitements, donc on devait trouver un traitement capable d'anticiper la régression lutéale après l'utilisation du protocole de superovulation. D'ici est venue l'idée d'utilisation combinée de la  $PGF2\alpha$  avec la PMSG vers les années 70, ce protocole conventionnel, encore utilisé sur l'administration de 2000 à 2500 UI de PMSG en dose unique, ou par les doses décroissantes de FSHp et cela durant la moitié de la phase lutéale du cycle oestral, suivie 48 à 72 h après, d'une injection d'une dose lutéolytique de  $PGF2\alpha$  ou d'un analogue.

Avec la  $PGF2\alpha$ , administrée après 48h de l'initiation du traitement de la superovulation, les donneuses devant exprimées les signes de chaleurs après 2 jours, affirmation que l'intervalle est de 4 jours entre le début du traitement de superovulation et le début de l'oestrus.

En synchronisant toujours avec la PGF2 $\alpha$ , des donneuses avec des receveuses, on permettrait un transfert d'embryons frais seulement il faut savoir que l'apparition des chaleurs est précoce pour les premières alors qu'elle est tardive pour les secondes puisqu'il se situe au 3<sup>ème</sup> jour (72 h) après l'injection de la PGF2 $\alpha$ . (Gordon, 1996).

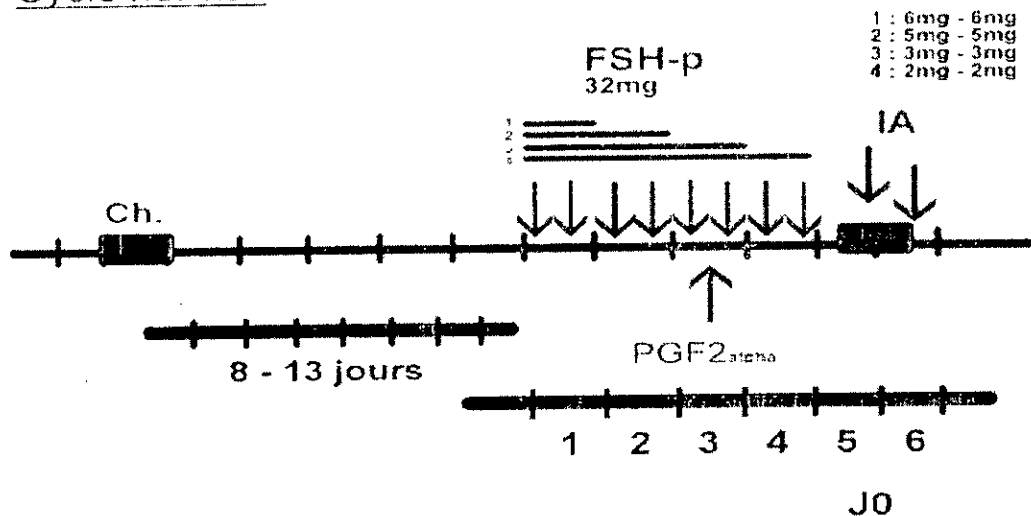
## 2. Follicule stimulating Hormone FSH:

La variabilité de réponses de superovulation représentait le problème crucial dont il fallait le résoudre. L'un des facteurs déterminant, était les préparations d'hormones utilisées dans les protocoles de superovulation. De ce fait, il était évident que des études relativement récentes ont montré de très bonnes réponses aux traitements de superovulation lors de l'utilisation de préparation de FSH que par l'utilisation de PMSG. Actuellement, ces préparations sont largement commercialisées exemple du FOLLTROPIN (Vetrapharm Inc.), FSH-P (Shering Corp.) et PLUSET (Calier Inc.) ; les trois préparations sont hypophysaires d'origine porcine (fig. 6-3), les réponses résultantes de ces préparations sont meilleures, seulement la qualité d'embryons produite est sous influence de la composition de celles-ci (Mapletoft et Pierson, 1993). La gonadotrophine ménopausale humaine (HMG) peut aussi être utilisée comme agent superovulateur chez la vache, comme il a été indiqué par les nombreuses recherches de Mantovani et al. (1994). Des résultats de cinq différentes préparations de gonadotrophines (Folltropin, FSH-P, Laborclin, Antrin et Folitropina) ont montré une similitude de réponses sur des vaches de races Holstein rapporté par Larocca et al. (1995).

Figure 6-3 : Protocole de superovulation par la FSH-p dans un cycle normal, d'après Nibart (1991).

### Superovulation par la FSH-p

#### Cycle normal:



De plus on a démontré que le ratio FSH/LH était important puisque les réponses étaient différentes selon ce même ratio. Actuellement, toute commercialisation de préparation de FSH sont issues de pituitaires d'animaux de ferme (généralement le porc) et contiennent des taux différents de LH. Ceci dit, l'amélioration des préparations de FSH, réputées moins contaminées en LH que les usuelles, ont été favorables d'après des études (Tribulo et al., 1991) sur la qualité d'embryons issus de la superovulation.

Un ensemble d'auteurs ont montré que l'utilisation des extraits de FSH avec un ratio FSH : LH défini pouvait être bénéfique pour éliminer l'importante source de variabilité. Mapletoft et pierson (1993) ont suggéré que le niveau maximal acceptable de contamination par la LH dans les préparations de FSH serait entre 15 et 20 %. (Gordon, 1996).

Les doses totales préconisées varient de 28 mg pour les génisses à 40 mg pour les vaches, en injections biquotidiennes à doses décroissantes (Chupin et Procureur, 1983 ; tab. 6-1).

Tableau 6-1: L'importance de la répartition des doses de pFSH par injection (Chupin et Procureur, 1983).

Doses par Injection	Nombre d'animaux	Corps jaunes (m±sd)	Embryons récoltés (m±sd)	Embryons transférables (m±sd)	Embryons de qualité
Constantes	28	9,3 ± 7,6 a	5,8 ± 6,4 c	2,4 ± 3,6 a	41%
Décroissantes	26	15,9 ± 15,0 b	12,2 ± 12,3 d	5,3 ± 6,2 b	43%

a,v,s,b:P<0,05 ; c, v,s,d:P< 0,01. Dose totale 32 ou 50 mg injectée en 4 jours, 2 fois par jour.

### a) Sources, doses et purification de la FSH :

La FSH est obtenue à partir d'extraits hypophysaires généralement issus de l'espèce porcine (pFSH) et rarement d'hypophyses d'origine équine (eFSH) ou ovine (oFSH). Les doses peuvent s'exprimer en mg équivalents du standard Armour, ou en µg de FSH pure (1 mg correspond à 15 µg de pFSH pure ; Chupin, 1988). Les nombres d'ovulations et d'embryons collectés augmentent en même temps que la dose totale, jusqu'aux alentours de 30 mg (450 µg de pFSH pure), pour atteindre ensuite un plateau. Le nombre d'embryons transférables est maximum pour cette dose car le pourcentage d'embryons transférables est plus faible pour les doses les plus élevées (tab. 6-2 et 6-3 ; Chupin, 1988 ; Donaldson, 1984).

Tableau 6-2 : Effet de la dose FSH INRA-SANOFI sur le taux d'ovulation et la production d'embryons transférables chez les bovins (Chupin, 1988).

Dose totale* (mg Armour)	Nombre d'animaux	Corps jaunes	Embryons récoltés	Embryons transférables	Embryons de qualité
16	18	4,8	2,9	2,2	76,9%
32	17	15,2	13,4	8,1	60,4%
48	18	14,7	11,5	4,7	41,1 %

\*Dose injectée en 4 jours, 2 fois par jour

Les premiers extraits hypophysaires étaient partiellement purifiés (la plupart des hormones hypophysaires étaient présentes) et contenaient des quantités variables de LH avec des rapports FSH/LH variant de 0,1 à 1,5 (Lindsell et al., 1986). Wilmott et al. (1990) et Mapletoft (1993) ont montré qu'une meilleure purification en FSH des extraits hypophysaires permettrait d'augmenter le nombre et la qualité des embryons. En effet, avec de telles préparations, lorsque les doses injectées sont supérieures aux doses optimales citées précédemment, la réponse ovarienne n'est pas augmentée par rapport aux résultats obtenus 381 avec des extraits moins purifiés, mais la qualité des embryons n'est pas diminuée. L'effet détériorateur des fortes doses de FSH sur la qualité des embryons serait donc dû essentiellement aux fortes concentrations en LH dans des extraits insuffisamment purifiés (Mapletoft, 1993).

Tableau 6-3 : Effet de la dose de FSH BURNS-BIOTEC sur la production d'embryons chez les bovins (Donaldson, 1984).

Dose totale *	Nombre d'animaux	Embryons récoltés	Embryons transférables	Embryons de qualité
20	20	2,6 ± 2,8	2,1 ± 2,8	72%
28	20	10,1 ± 7,1	3,9 ± 2,7	47%
40	20	8,7 ± 7,9	2,5 ± 3,4	35%

60

20

6,3 ± 6,0

0,9 ± 1.4

16%

*\*Dose injectée en 4 jours, 2 fois par jour***b) Meilleurs résultats :**

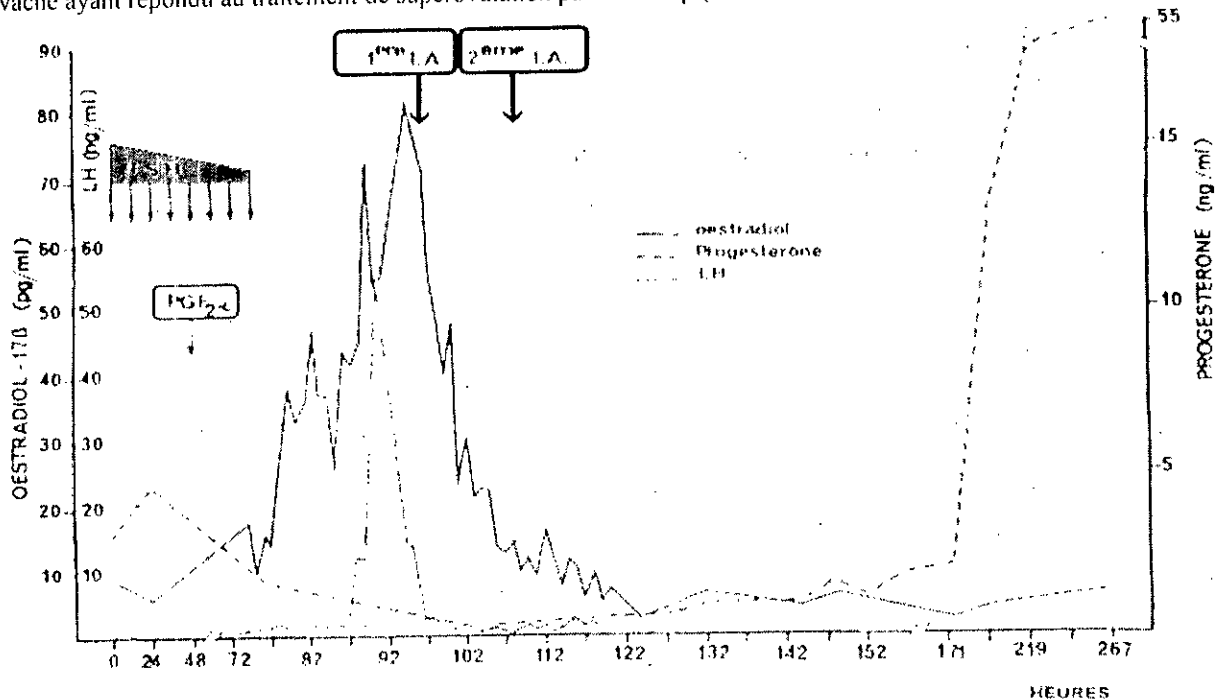
Les réponses de superovulation les plus fortes, sont obtenues par une succession d'injections de préparations riches en FSH, de façon à conduire à l'ovulation la cohorte entière de follicules à antrum. Le soutien de FSH doit être donné jusqu'au moment de la décharge endogène FSH/LH, pour surpasser les processus de sélection et de dominance, qui surviennent normalement à la fin du cycle (Saumande, 1991 ; Purwantana et al., 1993). La mesure de la réponse ovarienne peut être effectuée au cours du traitement de superovulation par le suivi de la croissance folliculaire grâce, à l'échographie journalière des ovaires (Purwantana et al., 1993 ; Keita, 1995). De façon constante, une augmentation systématique du nombre de follicules moyens est constatée chez les femelles traitées par la FSH. Les observations effectuées sur les petits ou gros follicules sont plus inconstantes. Les modifications hormonales faisant suite à l'administration de FSH permettent d'estimer également cette réponse. Chez les femelles superovulées en phase lutéale, l'intervalle PGF2 $\alpha$  - pic de LH est voisin de 45 heures (44,1 ± 8,5). Lorsque la superovulation par FSH est effectuée au cours d'un traitement progestatif, l'intervalle entre le retrait de ce dernier et le pic de LH est proche de 24 heures (26,3 ± 5,1 ; Nibart et al., 1988). Il n'y a pas de différence dans les concentrations maximales des pics de FSH et de LH par rapport à celles d'animaux cyclés non superovulés.

Cependant, les femelles ayant bien répondu (> 10 corps jaunes) présentent, après l'injection de PGF2 $\alpha$ , des pics préovulatoires de FSH et LH plus précoces que celles ayant peu répondu (2 corps jaunes). En outre, tous les animaux répondant aux traitements de superovulation présentent un pic de FSH et de LH au moment des chaleurs (fig. 6-4). Chez les animaux ne répondant pas, les pics de FSH et LH sont le plus souvent absents (Nibart et al., 1988). L'absence de décharge de LH peut s'expliquer par un défaut de réponse hypophysaire malgré la croissance de nombreux follicules et des niveaux élevés d'œstradiol ou, plus fréquemment, par l'absence de croissance folliculaire et absence de stimulation de l'hypothalamus (Nibart et al., 1988a). Enfin, une partie des femelles ne répondant pas, n'ont pas une lutéolyse normale après traitement par PGF2 $\alpha$  et ceci explique l'absence de décharge ovulante de LH (Nibart et al., 1988 ; Humblot et al., 1994).

Les concentrations d'œstradiol augmentent dès 24 h après l'injection de FSH. Le maximum est observé 36 - 52 h après injection de PGF2 $\alpha$  et le retour au niveau de base 12 h après le pic de LH. Après stimulation par FSH, les valeurs maximales varient de 50 à 70 pg/ml. Les concentrations plasmatiques de progestérone (5 à 10 ng/ml) augmentent après l'injection de FSH en fonction des quantités de LH présentes dans les préparations. Celles-ci baissent 24 à 48 h après injection de PGF2 $\alpha$  chez les femelles superovulées au cours de la phase lutéale et ont le plus souvent disparu avant le retrait du progestagène (Keita, 1995) chez celles ayant reçu FSH au cours d'un cycle maîtrisé. Les concentrations de progestérone au moment du pic de LH (j0) ne diffèrent pas selon les modalités de traitement (0,46 ng/ml en moyenne, selon Nibart et al., 1988). On remarque une augmentation de ces concentrations, 48 heures après le pic de LH chez les donneuses présentant une bonne réponse, après 72 heures chez celles dont la réponse est faible (< 2 corps jaunes) alors que celle-ci survient après 132 heures au cours du cycle normal (Combarrous, 1997).



Figure 6-3 : Courbe des concentrations plasmatiques périphériques d'oestradiol, progestérone, LH, chez une vache ayant répondu au traitement de superovulation par la FSH-p (Nibart et al., 1988).



### c) FSH recombinante bovine :

De récents progrès, on permit de produire de la bFSH (bovine FSH) avec des niveaux de pureté élevée grâce, à la technologie de l'ADN recombinante (absence de contamination de protéines et/ou autres gonadotrophines), éventuellement commercialisable. La bFSH recombinante a démontré qu'elle possédait une haute activité biologique d'après l'évaluation de doses faite par Bellow et al. (1991) chez la vache à viande, en induisant chez celle-ci d'excellentes réponses de superovulation, seulement les variations ovarienne et embryonnaire lors de traitement par la bFSH était similaire à ceux rapportés pour les autres préparations de gonadotrophines connues à nos jours. Wilson et al. (1993) ont conclu aussi que les grandes performances de la bFSH étaient similaires aux résultats rapportés avec les extraits pituitaires.

### 3. Le timing de la superovulation durant le cycle oestral :

Le temps le plus favorable pour le traitement, est celui qui peut être initié durant le cycle oestral d'une génisse ou d'une vache, coïncidant avec la période d'interphase entre le jour où le premier follicule dominant arrive à son diamètre maximal et celui de l'émergence du second follicule dominant (9 et 13<sup>ème</sup> jour si le jour de l'oestrus est le jour 0). De plus une injection de PGF<sub>2α</sub> à 48 h, après le début du traitement induirait une régression lutéale, afin qu'il y ait une ovulation et manifestation oestrale (tab. 6-4). Mapletoft et Pierson (1993), ont indiqué que la longueur du cycle est capitale et doit être fournie avec exactitude pour choisir le temps approprié et commencé le protocole de superovulation, exemple chez les vache doit le cycle est de 21 à 23 jours, le traitement devra commencer au 9<sup>ème</sup> jour, alors que celles dont le cycle est plus court, c'est-à-dire 18 à 20 jours, le traitement commencera au 10<sup>ème</sup> jour. (Gordon, 1996).

Tableau 6-4 : Programme de superovulation utilisé chez la vache d'après Mapletoft (1986).

Jour	Temps	Traitement 1	Traitement 2	Traitement 3
10	A.M	2500 UI PMSG	5 mg FSH	5 mg FSH
	P.M		5 mg FSH	5 mg FSH
11	A.M	PGF2 $\alpha$ pour les receveuses	4 mg FSH	5 mg FSH
	P.M		4 mg FSH	5 mg FSH
12	A.M	PGF2 $\alpha$ pour les donneuses	3 mg FSH	5 mg FSH
	P.M		3 mg FSH	5 mg FSH
13	A.M		2 mg FSH	5 mg FSH
	P.M		2 mg FSH	5 mg FSH
14	A.M	IA	IA	IA
	P.M			
15	A.M	IA	IA	IA
	P.M			

#### 4. Effet du follicule dominant sur les réponses de superovulation :

Il est clair maintenant par un ensemble d'études et rapports que le follicule dominant est une contrainte non négligeable, dont on doit tenir compte, lors d'une superovulation, et qu'une diminution des réponses est palpable lors d'un protocole de superovulation avec FSH, en présence de follicule dominant (Lussier et al., 1995).

Un étude faite au Canada, par Guilbault (1991) qui utilisa un suivi échographique du développement folliculaire, montrant que la présence d'un follicule dominant au même temps qu'il y a initiation du traitement de gonadotrophines, réduisait les réponses de superovulation de 40 à 50%. Huhtinen et al. (1992) en Finlande, ont montré lors de l'absence du follicule dominant dans l'ovaire au même temps de la stimulation des gonadotrophines, que les vaches produisaient le double du nombre d'embryons transférables comparé aux animaux traités en présence de follicules dominants; au Canada, Nasser et al. (1993) a montré aussi l'importance du statu des vagues folliculaires chez les donneuses et son influence sur la réponse de superovulation.

En Hollande, De Ruigh et al (1996) ont rapporté que l'élimination du follicule 38 à 46 h avant le traitement de superovulation par aspiration folliculaire ou OPU (*Ovum pick up, C'est-à-dire, ponction folliculaire échoguidée*) augmenté de façon significative le rendement embryonnaire par comparaison à un lot control (9,1 versus 6,7). Par ailleurs, des tentatives ont été faites pour développer des routines de superovulation en présence de follicule dominant, et sa au même temps que l'OPU; l'une de ces voies a menée à la GnRH. Ainsi au Canada, on a montré qu'un traitement avec la GnRH peut être utilisé pour synchroniser l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire, et donc exposé le follicule dominant à une ponction ultérieure (4 jours après la injection de GnRH); indifféremment de la phase oestrale, lutéale ou folliculaire le jour de l'injection de la GnRH. (Gordon, 1996).

#### 5. Synchronisation des vagues folliculaires :

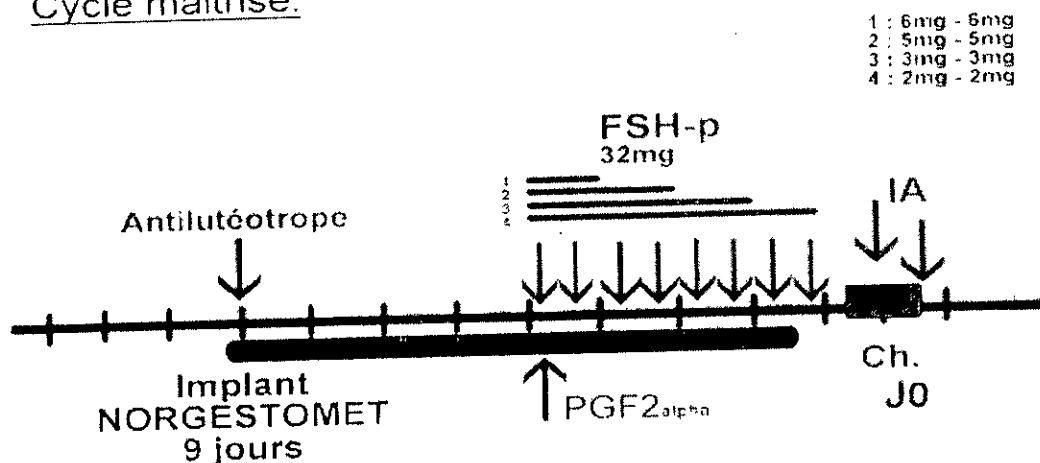
De nombreuses tentatives ont été faites pour induire une superovulation après l'induction d'une synchronisation folliculaire, par différents moyens chez les vaches, parmi eux l'utilisation de GnRH mentionnée ci-dessus (Kohram et al., 1996).

Au Canada, Bergfelt et al. (1994) ont testé avec succès, en induisant une synchronisation à n'importe qu'elle phase du cycle oestrale et au hasard, avec l'utilisation d'une injection d'oestradiol, 1 jour après le début d'un traitement avec des progestagènes; de ce fait ils ont noté qu'un tel protocole éviterai la détection des chaleurs et l'attente de commencer le traitement de superovulation au milieu du dioestrus; le traitement progestatif a été fais avec des implants (fig. 6-5). Néanmoins des traitement moins traumatisants existent actuellement, tel les spiralés ou le CIDR, avec de l'oestradiol de courte action (oestradiol-17 $\beta$ ).

Figure 6-4 : Protocole de superovulation par la FSH-p dans un cycle maîtrisé, d'après Nibart (1991).

## Superovulation par la FSH-p

### Cycle maîtrisé:



Il est connu qu'il en résulte une suppression du follicule dominant et l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire après environ 4 jours du début de l'injection (Bo et al., 1995). Le traitement de superovulation est initié 4 jours après le traitement d'oestradiol chez les vaches implantées, quant aux résultats, il était comparable à ceux traitées par les gonadotrophines de la façon classique, c'est-à-dire au milieu du cycle oestral. Le recrutement des follicules pour la superovulation a été discuté par Mapletoft et al. (1994), qui ont suggéré qu'il était possible de synchroniser (par induction de l'atresie des follicules antraux existants) et d'induire l'apparition d'une nouvelle vague folliculaire, visant une réponse lors du traitement de superovulation, ces auteurs ont mentionné le besoin d'études - ci-dessous - pour déterminer la période optimale entre l'injection d'oestrogène et l'initiation du traitement de gonadotrophines dont le but d'une réponse maximale et d'un nombre supérieur d'embryons viables.

En Irlande, Duffy et al. (Gordon, 1996), ont administré 5mg benzoate d'oestradiol au même temps qu'il y ait initiation du traitement de progestagènes (PRID/CIDR) est l'administration de 2000 UI de PMSG 4 jours après l'initiation. Il est évident que le benzoate d'oestradiol diminue le nombre de follicules larges, lors de la récolte d'embryons, la qualité est améliorée ; il est visiblement claire que le nombre de rapports sur l'utilisation de progestagènes combinées avec le benzoate d'oestradiol font mention d'utilité sur le contrôle et la synchronisation des vagues folliculaires et aussi une voie future qui pourrait être très utile pour améliorer efficacement les protocoles de superovulation. (Gordon, 1996).

### **6. Effet du follicule dominant chez les vaches de lactation :**

Il y a certaines conditions où les réponses de la superovulation ne sont pas affectées par la présence de follicule dominant ; en Suède, Machel et al. (1995) rapportaient des résultats montrant que la superovulation chez des vaches laitières au milieu d'une lactation tardive n'était pas affectée par la présence de follicule dominant ces auteurs ont suggéré que le critère définissant la dominance ou la non dominance folliculaire devrait être redéfini sur les vaches de lactation, à qui les réponses de superovulation apparaissent influencées par d'autres nombreux facteurs.

## **IV. Les différents protocoles de superovulation :**

### **1. Traitement de Priming FSH :**

Selon différentes études, un prétraitement à la FSH avant l'application d'un traitement de superovulation, vise à modifier le niveau sanguin de FSH précocement durant la phase lutéale d'une donneuse d'embryon, ceci selon les uns serait bénéfique, puisque il apportera plus de follicules en croissance avant la superstimulation. Dans ces prétraitements, l'objectif initial est de stimuler la croissance folliculaire et débiter un cycle. Bien que quelques études (Petr et al., 1990) trouvent évident l'effet positif du traitement, d'autres

observations montrent qu'un tel prétraitement de gonadotrophines en général, réduisait plutôt que d'augmenter les réponses de superovulation (Calder et Rajamahendran, 1992), donc il apparaît que ce prétraitement avec la FSH au début du cycle est désavantageux puisque durant ce traitement, on induit une augmentation du développement folliculaire, il en résulte une augmentation de la proportion des follicules anovulatoires, actuellement la cause n'est pas bien comprise. (Gordon, 1996).

## 2. Traitement avec la FSH :

Une étude faite par Roberts et Echtenkamp (1992) qui ont évalué la réponse d'un traitement standard de superovulation, initié au début du cycle oestral (1 - 4 jours après œstrus), lorsque la dominance folliculaire ne s'est pas encore établie, bien que le taux d'ovulation accompli est normal pour la superovulation, le taux de fertilisation et le rendement embryonnaire était bas. D'autres études faites par Roberts et al., 1994 appliquant 8 injections de FSH deux fois par jour au début du cycle oestral (2 - 6<sup>ème</sup> jour) ou au milieu du cycle oestral (10 - 11<sup>ème</sup> jour). Ces résultats ont montré que la superovulation au début du cycle, augmentait la proportion d'embryons transférables par rapport à l'autre période du traitement (8,0 versus 5,4) (Gordon, 1996).

Les extraits hypophysaires de FSH sont généralement injectés 2 fois par jour pendant 4 jours par voie intramusculaire pour obtenir un effet optimum sur la réponse ovarienne. En effet, la demi-vie de la FSH est très courte (70 min), d'où la nécessité d'injections multiples, permettant de maintenir des concentrations suffisantes dans la circulation périphérique (Chupin, 1988).

Des résultats récents démontrent que certaines préparations commerciales (Follitropine N.D., Vetrephann ; Superov N.D., AUSA international) peuvent être injectées également par voie intramusculaire, mais seulement une fois par jour, pendant 4 jours. Des résultats équivalents à ceux obtenus avec 2 injections par jour ont été observés par Bungartz et Niemann (1994). Une injection unique par voie sous cutanée en arrière de l'épaule a démontré son efficacité chez les animaux de type viande (Hockley et al., 1992) et chez les zébus (Tribulo et al., 1993). La présence d'une abondante quantité de graisse sous cutanée à ce niveau chez ces animaux peut expliquer un re-largage lent de la FSH dans la circulation générale. Récemment, des résultats équivalents à ceux présentés précédemment ont été obtenus après l'injection par voie intramusculaire d'une dose unique de FSH diluée dans le polyvinylpyrrolidone (Suzuki et al., 1994).

La FSH peut être injectée en phase lutéale (entre J9 et J13 ; J0 = chaleurs) d'un cycle naturel ou induit. Dans ce cas, à la 5<sup>ème</sup> IM injection de FSH, une administration d'un analogue de PGF2 $\alpha$  entraîne la lutéolyse et permet les ovulations. Il est possible également d'injecter l'hormone de stimulation simultanément avec la PGF2 $\alpha$  au cours d'un traitement de maîtrise des cycles basé sur l'utilisation de progestagènes (CRESTAR® N.D., Intervet ou PRID® N.D., Sanofi). La PGF2 $\alpha$  peut être injectée 24 à 48 h avant le retrait du progestagène (Combarrous, 1997).

Selon certains auteurs, la production d'embryons viables est semblable chez des femelles donneuses superovulées en milieu de phase lutéale ou au cours d'un traitement progestatif. L'utilisation du traitement progestatif associé a même été recommandée lorsque la superovulation est effectuée chez des vaches sub-fertiles (Nibart et al., 1988). Ces résultats ont été confirmés globalement par Boland et Roche (1993) mais ces auteurs ont obtenu plus d'embryons congelables chez les femelles superovulées en milieu de phase lutéale que chez celles ayant reçu un progestatif. En outre, Keita (1995) a obtenu un taux d'embryons viables plus élevé quand le traitement progestatif associé au traitement de superovulation par FSH était initié en milieu de cycle (J9) plutôt qu'en fin de cycle (J16). Ces derniers résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la qualité des ovulations induites est meilleure lorsque la durée pendant laquelle l'animal reste sous l'effet de la progestérone n'est pas trop longue.

### a) Réduction du nombre d'injections de FSH :

De nombreux auteurs, ont simplifié les procédures d'administration de FSH ; au Danemark, Purwantara et al., (1994a), ont utilisé deux lots, avec une dose totale, soit environ 35 mg de FSH, seulement en une seule prise quotidienne, pendant 3 jours pour un lot et deux prises quotidiennes pendant 4 jours pour l'autre, la prostaglandine était donnée 72 h après la première dose de FSH. Les auteurs n'ont pas trouvé de différences entre les deux groupes, dans leurs dynamiques folliculaires et le rendement embryonnaire (Gordon, 1996).

### b) Traitement en une seule injection de FSH :

Les effets du régime des doses et les voies d'administration, employées dans les différentes préparations de FSH, ont été rapportés par de nombreux chercheurs, sur la race taurine (Staigmiller et al., 1994) et sur des Zébu (Tribulo et al., 1993), bien que la réduction du nombre d'injections dans les circonstances

normales pourrait résulter d'une diminution des réponses de superovulation d'après de nombreuses équipes. Au Japon, il a été montré qu'avec certaine formulation, qu'une seule injection peut être utilisée avec succès plutôt que d'utiliser les 8 - 10 conventionnelles, pendant 4 - 5 jours ; une telle simplification serait particulièrement importante dans l'application pratique sur les cheptels bovins et zébus, surtout si on considère que la contention des animaux pour de multiples injections est une source importante de stress (Mapletoft et Pierrson, 1993 ; Rodriguez et al., 1994 ; Gordon, 1996).

- **Formule du polyvinylpyrrolidone :**

La demie vie de la FSH chez la vache est d'environ 5 h, c'est donc pour cette raison que on utilise de multiple injection pour la superovulation. Pour cela une équipe japonaise a employé une macromolécule le polyvinylpyrrolidone (PVP) qui prolonge l'action de la gonadotrophine (FSH) (Suzuki et al., 1994 ; Yamamoto et al., 1995), ceci ont aussi montré que la FSH porcine dissolvait dans le PVP et l'utilisation d'une seule injection de ce dernier en sous cutané était capable d'induire les mêmes résultats que la FSHp en multiples injections. Ils conclure que l'utilisation du PVP comme véhicule (excipient) pour la FSHp est une méthode pratique pour induire une superovulation chez la vache. (Gordon, 1996).

- **Formule d'oxyde de silicone :**

En Ukraine, Dovgopol et al. (1995) ont rapporté lors de l'utilisation d'une injection en sous cutanée d'une préparation de FSH (Prolongone) constituée d'oxyde de silicone, que les résultats de superovulation fournis étaient très satisfaisants.

- **Pulsed Delivery System :**

Une étude de Jimoh et al. (1995) appliquée aux USA, par l'utilisation d'un procédé très développé, d'une microcapsule implantable et qui libère la FSHp de façon pulsatile chez la vache donneuse (cette appareil était capable de libéré 8 pulses de FSH durant une période de 4 jours) a donné des résultats suffisamment prometteurs pour l'application de ce procédé et le raffinement du système dans le future.

- **GnRH est la Down-regulation hypophysaire :**

La down régulation hypophysaire par des GnRH agonistes, pour la stimulation hypophysaire, largement employée depuis quelques années dans les programmes d'IVF humain. De tels traitements visent à permettre la croissance folliculaire uniforme en réponse aux traitements de superovulation (FSH), en Aberdeen, Birnie et al. (1995) utilisés le traitement de GnRH chez des génisses sur une période de 2 semaines avant d'entamer l'induction de la superovulation, se traitements de GnRH se faisait à un intervalle de 24 h, il était évidant que les réponses étaient améliorées (dans le nombres d'ovulations et d'embryons) ; il serait juste et utile d'explorer l'étendue et de tenter cette Down-regulation chez la vache. (Gordon, 1996).

- **Utilisation de la Somatotrophine recombinante Bovine :**

La STH (Somatotrophine ou Growth hormone, GH) est une des hormones sécrétées par l'hypophyse antérieure ou l'antéhypophyse, son rôle très important et évident pendant le jeune age de la vache elle induit la croissance linéaire des os longs, et en plus de son action de croissance sur les épiphyses des os plats. Il est connu que la plupart des effets de la GH sont indirecte et donc l'existence d'un médiateur directe isolé, appelé l'IGF-I (Insuline Growth Factor I) sécrété principalement par le foie en réponse à la libération de la GH. La somatotrophine bovine recombinante (rbST) est devenue disponible ces dernières années et a permis une meilleure compréhension du mode d'action de l'hormone surtout dans les processus de reproductions (Webb et al., 1994).

Il y a différentes raisons de croire que la GH joue un rôle important dans la biologie de reproduction, il y a eu même ceux, qui d'après de nombreuses appréciations, pouvait légitimement classer cette hormone comme une gonadotrophine, évidence actuellement applicable, quoique cette activité gonadotrophique ne se ferait qu'en présence de gonadotrophines conventionnelles FSH/LH, pour cette raison un terme récemment utilisé : Cogonadotrophine était plus approprié.

Willard et al. (1995) ont examiné des changement de GH durant le cycle oestral bovin relatif au développement folliculaire, ils ont trouvé un rôle potentiel de la GH dans le recrutement et le développement folliculaire chez la vache ; cette capacité de la rbST a mené à son utilisation comme co-traitement avec la FSH

Bien que certains travaux, ont trouvé que sa rehaussez les réponses de superovulation, et le rendement embryonnaire chez la vache (Niemann, 1991 ; Herrler et al., 1994) sauf, que se n'est pas tout les auteurs qui l'avantage (Gray et al., 1993).

#### ▪ **Hormone de croissance et l'action de l'IGF-I :**

Il est maintenant clair, que la rBST stimule la synthèse de l'IGF-I, pas seulement dans le foie mais par de nombreux autres tissus. Dans l'ovaire, par exemple l'IGF-I a été trouvé en grande concentration dans le fluide folliculaire, particulièrement dans le follicule dominant. Des études de Spicer et Geisert (1992) ont montré que les petits follicules vésiculaires contenaient significativement moins d'IGF-I que les moyens et les grands follicules ; n'empêche que l'origine n'est pas claire, si c'est une augmentation de la biosynthèse locale ou augmentation de la diffusion de ce peptide à partir du sérum ; il était évident de suggérer l'existence d'un système d'IGF-I intra-ovarien complet avec des ligands, récepteurs et de binding proteins (protéines de transports). Donner de la rBST stimulerait l'IGF-I ovarien qui lui même stimulerait les fonctions cellulaires de la granulosa, il n'est pas déraisonnable d'attendre que cette hormone modifierai et influencerai la réponse de superovulation.

D'autres observations faites par Gong et al. (1991) par exemple ; ont montré que le traitement avec rBST, permet de doubler l'augmentation de la population de follicules vésiculaires de 2 – 5 mm de diamètre chez les génisses. Les auteurs conclurent que la rBST agissait probablement via l'augmentation de la concentration périphérique de l'IGF-I, bien que dans leur subséquent travail (Gong et al., 1993a) un effet direct dans l'ovaire n'a pas été exclu . Des information rapportées ailleurs (Langhoo et al., 1991) prêtent l'idée que la rBST aurait un effet direct sur l'activité ovarienne chez la vache; les cellules de la granulosa des petits et grands follicules augmentaient la synthèse des protéines en réponse à la rBST. Des récepteurs fonctionnels de l'hormone de croissance, ont également été trouvés sur les cellules de la granulosa humaine expliquant, l'effet direct de la GH sur l'ovaire (Gordon, 1996).

## **V. La méthode de l'IA pour les donneuses superovulées :**

Après l'application du traitement de superovulation, la seconde étape à faire est le contrôle de l'oestrus des vaches superovulées, c'est-à-dire le début et la durée de l'oestrus, qui sont des paramètres importants pour déterminer le moment de l'IA. Il est aussi évident qu'ils permettent d'évaluer l'intensité de l'oestrus chez ces vaches, ce qui refléterait aussi l'intensité des événements préovulatoires chez l'animal traité (Callesen et al., 1993) ; celle-ci est spécialement importante lorsque des donneuses montrent de faibles signes d'oestrus ; et puis des lors certaines vaches seront classées mauvaises donneuses d'embryons.

Bien qu'il y ait eu une tendance précoce dans l'étude de la superovulation au travers de l'hypothèse d'une reproduction normale avec une insémination adéquate, ceci pour accomplir un taux de production embryonnaire important, estimées sur ces donneuses (lors de la détection de l'oestrus), les recommandations habituelles sont une insémination à 12 h d'intervalle, commençant 12 h après l'observation du début d'oestrus.

L'usage de la prostaglandine pour le TE en clinique, pour contrôler le timing des périodes de chaleurs permet justement avec une précision de donner des recommandations sur la façon dont l'IA doit être faite. Les donneuses sont attendues pour rentrer en oestrus à environ 2 jours après l'administration de la prostaglandine. Il serait pratiquement normal de suivre une importante règle de l'IA, stipulant que l'IA doit se faire le matin et le soir, à condition que les vaches ont montré des signes de chaleurs tôt dans la journée ; mais, si l'oestrus se produisait plus tard, alors l'insémination ce fera l'après-midi, en plus du lendemain matin.

Un travail en Virginie par Cansco et al. (1992) suggère que la division des 25 mg de la dose de prostaglandine en deux injections, induirait une augmentation des réponses oestralles (87% versus 79%), en plus d'un raccourcissement de l'intervalle du début de chaleur, qu'avec le traitement conventionnel avec une seule injection. De plus, une semence congelée est généralement employée en utilisant deux paillettes de 0,25 ml, après la détection des chaleurs, plus, une à deux autres paillettes après 12h Goulding et al.(1994) ; d'où l'intérêt d'utiliser le protocole d'insémination avec une semence (congelée ou fraîche), pour assurer un haut rendement et donc une meilleure qualité d'embryons. Des études ont permis de constater que deux paillettes lors d'IA suffisent pour inséminer des génisses superovulées (8 – 12 h après le début de l'oestrus et une deuxième 12 h après).

En pratique, le paramètre à prendre en considération, c'est d'éviter dans la mesure du possible d'inséminer des donneuses en retard et après la fin de l'apparition de l'oestrus, cela influerait défavorablement

sur la récolte d'embryons 7 jours plus tard. En France, Slimane et al. (1995) ont rapporté, qu'ils ont retrouvé plus d'embryons quand les donneuses superovulées ont été inséminées deux fois pendant l'oestrus, ou quand elles sont inséminées en une seule fois, à plus de 6 heures après que le pic préovulatoire de LH atteint son maximum (déterminé par LH enzyme immunoassay, ELISA) que celle notée lors, d'une seule insémination des donneuses pendant la période des chaleurs. (Gordon, 1996).

## **VI. Les caractéristiques des follicules préovulatoires et des ovocytes après superovulation :**

Les caractéristiques cytologiques des ovocytes récoltés à partir des vaches superovulées, ont été rapportés il y a plus de 30 ans ; aucun effet contradictoire sur le modèle de maturation nucléaire n'a été trouvé ; cependant, il est devenu évident que beaucoup d'études subséquentes sur le traitement de superovulation employés sur des vaches compromettrait la qualité d'ovocytes ayant ovulé. Des observations faites sur des vaches superovulées, ont montré des résultats anormaux de stéroïdogenèse folliculaire, avec une maturation et ovulation prématurée, en plus d'une déviation des profils hormonaux systémiques. En dépit de tels problèmes, il est à noter que des milliers d'ovocytes produisent des embryons et des veaux en bonne santé chaque année. (Gordon, 1996).

### **1. Asynchronisme interfolliculaire :**

Il y a eu des études, qui ont montré qu'un tiers (1/3) d'ovocytes aspirés en période préovulatoire à partir d'ovaires de vaches superovulées, ont une maturation nucléaire anormale (Hyttel et al., 1991 ; Bousquet et al., 1995), sans oublier aussi les effets indésirables opérés lors du transport du sperme et sa survie. De Loos et al. (1991) ont examiné le niveau de progestérone et oestradiol folliculaire chez la vache superovulée, concluant que l'ovocyte et le développement folliculaire était hors phase, dans certains exemples, ce qui explique les défaillances décelées sur quelques ovocytes.

En Hollande, Dieleman et Bevers (1993a) ont enregistré que les follicules préovulatoires contenaient plus de quatre fois la concentration d'oestradiol chez les vaches superovulées, que ceux non superovulées. Un tel environnement endocrinien inapproprié influencerait négativement sur la qualité d'embryons récoltés. Quelques tentatives pour le contrôle de la libération de la LH, afin que plus de follicules soit capables d'ovuler avec des ovocytes normaux ont été effectués ce par l'application de progestagènes stivés par la GnRH, (Vos et al., 1995) . Les résultats ont montré l'existence d'ovocytes à potentiel de développement en embryons viables réduit, ceci est dû à l'effet du traitement des progestagènes sur l'environnement oviductal plutôt que sur les ovocytes eux-mêmes.

### **2. Défaut dans la prématuration ovocytaire :**

Au Danemark, Greve et al. (1995) avaient montré durant la période avant la maturation (phase de prématuration), que des ovocytes produits durant et après la régression lutéale, n'achevaient pas leurs modifications nucléolaires de façon normale (maturation nucléolaire) chez les vaches traitées aux gonadotrophines. Ce défaut proviendrait de la FSH qui agirait comme suppresseur de la production de LH et donc induirait une stéroïdogenèse anormale impliquant et/ou un raccourcissement de l'intervalle de l'injection de prostaglandine jusqu'au pic de LH, ultime où l'ovocyte doit achever sa maturation normale.

Roberge et al. (1995) ont montré aussi une suppression dans la fréquence et l'amplitude des pulsatilités de la sécrétion de LH, chez les vaches superovulées durant la période du traitement gonadotrophique et après l'administration des prostaglandines. L'injection commercialement disponible de gonadotrophines n'induit pas en elle-même l'effet suppresseur sur la sécrétion pulsatile de la LH, vraisemblablement une telle suppression de LH, serait causée par une augmentation substantielle de l'oestradiol préovulatoire, produit par de nombreux follicules en croissance. Le niveau anormal de stéroïdes résulterait d'une production précoce de tous les événements préovulatoires, incluant, le développement folliculaire et la maturation ovocytaire (Gordon, 1996).

### **3. Caractéristiques des follicules préovulatoires :**

Ces caractéristiques chez une vache normale ont été décrites dans le sens de la production des stéroïdes et les dimensions folliculaires.

Les caractéristiques des follicules ovulatoires et des ovocytes après les différents traitements de superovulation ont été dirigés par Laurincik et al (1993a), puisque la première image chronologique de la vague d'ovulation chez les vaches superovulées avait été fournie par Laurincik et al (1993b), lesquels ont montré que l'ovulation se produisait sur une période de 8 h, et dont la plupart du temps dans les 4 premières heures. Purwantara et al (1994b) ont enregistré une période d'ovulation dans l'intervalle de 4 – 12 h, proportionnelle au nombre d'ovulation, la plupart de ces ovulations se produisaient dans les 4 premières heures, indépendamment de la position de l'ovaire (ovaire droit versus gauche) ou de la parité (génisses versus vaches).

#### **4. Défaut du pic préovulatoire de LH :**

Un des grands problèmes observés avec le protocole de superovulation, c'est l'absence du pic préovulatoire de LH chez quelques vaches donneuses, celui-ci était une des causes de défaut de maturation ovocytaire et donc une anomalie embryonnaire importante.

Pour cette raison il a été cité, que certains investigateurs ont employé la GnRH dans l'effort était d'améliorer la réponse ovulatoire et/ou le timing du pic de LH relative dans la cycle du développement folliculaire. Habituellement, une dose de GnRH est administrée le jour de l'oestrus ; cependant, il n'est pas jugé nécessaire lors de la libération de LH, qu'elle soit dans sa forme caractéristique de pic ; ces auteurs ont employé des kit d'ELISA pour des tests rapides sur la LH (chaque 3 h) déterminant ainsi l'apparition du pic de LH et le moment d'insémination des vaches donneuses qui se faisait 12 – 15 h après le pic.

Il est connu que la fréquence des pulses de LH, se réduisait dans les 8 – 32 h après l'initiation du traitement de la superovulation (utilisant la PMSG ou la FSH) et que durant ceci, il n'y a pas de changement dans les niveaux de progestérone (Gosselin et al., 1995). Dans le cas où le traitement de gonadotrophines a une action directe sur la glande pituitaire donc, sur la libération de la LH, alors il serait utile de le considérer comme un facteur influençant le pic préovulatoire de LH. (Gordon, 1996).

### **VII. La répétition du traitement de superovulation :**

Des contradictions dans la littérature au sujet de la répétition du traitement superovulatoire chez la vache, ont été rapportées sur sa faisabilité sur la même donneuse, telle que celle de Christie et al (Gordon, 1996) qui avaient pris un groupe de 14 génisses, soumises à maintes reprises dans un intervalle de 6 semaines à un traitement standard de superovulation (2000 UI de PMSG avec PG après 48 h) ; plusieurs génisses ont répondu d'une manière satisfaisante et de façon identique du 2<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> traitement.

L'utilisation de l'une ou de l'autre molécule (FSH ou PMSG) avait des réponses similaires au sujet du nombre d'ovulation et des embryons recueillis, ceci entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> traitement de superovulation ; de tels résultats sont équivalents à ceux trouvés dans des travaux réalisés en Allemagne, montrant que la production des anticorps anti-PMSG ; virtuellement, ne causant aucun problème chez la vache (Gordon, 1996).

#### **La répétition du traitement de superovulation :**

Au Brésil, on a constaté que le nombre d'embryons collectés durant 7 fois (intervalle de 50 – 120 jours entre les récoltes) étaient similaires chez la vache zébu superovulée ; Hackett et McAllister au Canada (1992) avaient trouvé qu'une récolte d'embryons était faisable en deux fois successivement dans 112 jours post-partum chez les vaches laitières superovulées, et ceci sans aucune affectation dans la production laitière ou dans les taux de gestation.

En Hollande, De Ruijth et al. (1995) ont enquêté sur les facteurs influençant les réponses de superovulation chez les vaches laitières traitées de façon répétée, et ils ont trouvé que le rendement embryonnaire était principalement affecté par la vache donneuse elle-même. Ils ont noté que lorsque le traitement de superovulation commençait le 12<sup>ème</sup> jour, le nombre d'embryons viables tend à augmenter que quant le traitement commençait dans les autres jours, et que le pourcentage d'embryons viables tend à diminuer avec l'augmentation du nombre de lavement. (Gordon, 1996).

### **VIII. Le rendement embryonnaire lors de la superovulation :**

La littérature a rapporté que le niveau plasmatique d'oestradiol et de progestérone était en relation avec la réponse de la superovulation chez la vache. Il serait évident et intéressant à ce que le programme de transfert embryonnaire, chez la vache, soit capable de prédire la réponse de la superovulation, c'est-à-dire après



avoir donné le traitement de gonadotrophines ; des études Pakistanaïses rapportées par Mehmood et al. (1991) suggèrent que les concentrations des œstrogènes et de la progestérogène peuvent être utilisées pour prédire le rendement embryonnaire après traitement, il est important alors, d'estimer le niveau des stéroïdes dans tout le cycle superovulatoire.

Au Royaume Uni, Scott (1993) suggéra qu'explorer l'ovaire des vaches donneuses et voir la répartition des follicules qu'il contient, pendant quelques jours avant l'administration du traitement de gonadotrophines, serait très utile pour prévoir le rendement embryonnaire et la réponse de la superovulation. Une autre étude faite au Japon, Kawamata (1994) qui a échographié (real time ultrasonics) et rapporté le nombre de follicules de taille 3-6 mm sur les ovaires de vaches Holstein juste avant le traitement superovulatoire et de ce fait, il a prédit sa réponse. En Aberdeen, une autre étude faite par Singh et al. (1995) n'a pas trouvé de corrélation entre le nombre initial de follicules avant le traitement et le nombre d'ovulation après le traitement à la FSH. Au Canada, Desautniers et al (Gordon, 1996) ont conclu que le développement folliculaire scanné avant le traitement était une valeur limitée dans la prédiction de la qualité d'une donneuse d'embryon.

## **IX. Les facteurs influençant les réponses des traitements de superovulation :**

### **1. Sélection de donneuses potentielles :**

De nombreux travaux ont rapporté des méthodes qui sont employées pour choisir des vaches potentiellement donneuses d'embryons, avant même qu'elles soient acceptées pour le traitement de superovulation. En Allemagne, Herrler et al. (1990) ont utilisé un test rapide de progestérogène dans le lait comme outil de sélection des futures donneuses, classées par celles qui avaient le taux de progestérogène le plus bas dans le lait et donc moins de corpus lutéal que celles avec un niveau similaire ou plus que le standard ( $10,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Au Canada, Desautniers et al. (1995) trouvent que suivre le développement folliculaire et le profil endocrinien sur des vaches matures (non utilisées pour la production du lait), était un moyen très limité pour prévoir la réponse de superovulation, ils ont aussi trouvé que la superovulation a révélé des désordres endocriniens et folliculaires chez les vaches matures superovulées, qui seraient imprévisibles lors d'un cycle normal (Gordon, 1996).

### **2. Intervalle post-partum :**

Il y a eu certaines indications que les réponses superovulatoires et la fertilité des vaches seraient influencées par l'ampleur de l'intervalle post-partum. Au Japon Sahara et al (1994), avaient utilisé l'échographie sur l'ovaire des vaches à viande et ils ont noté que les follicules de diamètre  $> 4$  mm diminués d'une façon marquée au 92<sup>ème</sup> jour. Chez la vache laitière Holstein - Frisonne, Kruip et al. (1995) avaient marqué une attention sur la période particulière après le part (près du vêlage autour de 100 jours), lorsque la Holstein était particulièrement moins sensible au traitement superovulatoire que durant d'autres périodes (Gordon, 1996).

Il semble qu'un intervalle de 60 jours entre le vêlage et la collecte soit le minimum à respecter pour que l'utérus ait subi son involution et pour que les ovaires répondent au traitement FSH de superovulation (Nibart, 1991). D'autres études n'ont pas rapporté de différence quant au nombre moyen d'embryons totaux et viables chez les vaches fertiles collectées de 60 à 90 jours ou plus de 90 jours après vêlage. (Combarous, 1997).

Il y a eu une évidence de la part de l'étude de Hoekstra (Gordon, 1996) qui montrés une bonne fertilité et un haut rendement des vaches laitières entre 50 et 70 jours post-partum, avec une diminution entre 90<sup>ème</sup> et 110<sup>ème</sup> jour et le retour à la normale après le 110<sup>ème</sup> jour post-partum.

### **3. Repeat breeders et les problèmes chez la vache :**

La superovulation et la récolte embryonnaire non chirurgicale, sur des vaches laitières normales et repeat breeders en Ireland, ont montrés une diminution significative du rendement embryonnaire chez les repeat breeders, suggérant qu'une telle diminution de fertilité était due à l'environnement utérin hostile ; en accord avec ces derniers auteurs ; Hill et Kuehner (1996) ont observés après ponction folliculaire, que les ovocytes et la production d'embryons issue des donneuses à problèmes superovulées, étaient souvent viables, après la récolte, les mêmes travaux ont démontrés qu'il y a augmentation significative du rendement, chez des vaches fertiles après ponction folliculaire, 2 jours avant l'administration de gonadotrophines (Gordon, 1996).

#### 4. L'âge :

Il est admis que l'âge des donneuses influence la production d'embryons et d'embryons viables. Une analyse des données sur la superovulation de Holstein, âgées de 16 mois à 17 ans rapportée par Hasler et al. (Gordon, 1996), a révélé une différence non significative entre le taux d'ovulation, la viabilité des embryons produits et l'âge. Ces valeurs mentionnent que les ovaires chez les bovins, acquièrent leurs quotas d'ovocytes pour la vie, avant la naissance dans l'ovaire fœtale d'une génisse, et le pool d'ovocytes commence à diminuer presque dès qu'il est établi. Il est connu que le nombre de follicules primordiaux (chacun contient un ovocyte) diminue régulièrement au cours de la vie jusqu'au point zéro atteint vers 20 ans environ ; il n'y a pas de raison, à penser que le nombre de follicules en déclin durant la vie reproductive normale d'une vache jusqu'au point zéro, compromettrait la réponse des donneuses aux traitements de superovulation.

Des chercheurs tel Lerner (Gordon, 1996), ont affirmé que la réponse maximale de superovulation chez les vaches Holstein se situe vers 5,6 ans d'âge, les mêmes auteurs notent qu'une augmentation de la dose de FSH parmi les veilles donneuses Holstein, les aident à augmenter leurs rendements d'embryons, mais sans corriger complètement les effets négatifs de l'âge. La cause de la faible réponse chez les vaches âgées confirmée par Desaulniers et al. (1995) du Canada, qui ont essayé d'améliorer les réponses chez ces dernières. Ces auteurs ont conclu que c'est dû au nombre élevé de désordres dans la fonction reproductive, qui ne sont pas évidents durant un cycle non stimulé (cycle normal) (Gordon, 1996).

#### 5. Pathologie :

L'apparition d'états pathologiques (état infectieux, structures ovariennes kystiques, maladies métaboliques) peuvent également interférer avec la réponse à la superovulation, d'après les données qui ont été obtenues essentiellement au cours de traitements à la PMSG. Les processus génératifs en cause laissent supposer que les effets détériorateurs de ces facteurs sur la réponse s'exprimeraient de la même façon lors de la superovulation avec la FSH.

#### 6. Espèces et races :

La race ne semble pas jouer un rôle sur la production et la viabilité des embryons. Seulement, aux USA, Breuel et al. (1991) ont enregistré un rendement important d'embryons transférables chez des donneuses de race Simmental comparativement à ceux de races Angus, Charolaise et Polled Hereford, en accord avec des études précédentes, de ce fait, ils ont spéculé que la Simmental était plus sensible aux gonadotrophines que les autres races.

Dans le but d'avoir des comparaisons entre espèces, Rodrigues et al. (1988) ont mentionné une différence significative qui est en faveur des vaches taurines sur le nombre total d'embryons récoltés après superovulation comparé entre *B. Taurus* et *B. Indicus* au Brésil. Avant de conclure à la sensibilité génétique aux traitements superovulatoires, il faut noter qu'il y a ceux qui discutent, que l'usage de la superovulation systématiquement, mènerait à l'augmentation de la fréquence des naissances multiples et spontanées, due au changement génétique dans la sensibilité ovarienne aux gonadotrophines (Liboriussen et al., 1995) ; sauf que plus loin, aucune évidence factuelle à l'appui d'une telle étude ne paraît avoir été rapporté.

Globalement, pour les races laitières, on obtient un embryon viable de moins avec les génisses qu'avec les vaches. Chez les femelles de races laitières, il ne semble pas exister de différences dans la réponse à la superovulation par FSH entre les vaches à différents niveaux de production laitière.

#### 7. Nutrition et effets des saisons :

Peu d'études ont été conduites pour évaluer l'incidence exacte de l'alimentation sur la réponse au traitement de superovulation. Cependant, des recommandations pratiques ont été proposées par Scaramuzzi et Murray (1994) pour l'établissement du régime alimentaire et par Atherton (1994) pour évaluer l'influence des éléments minéraux de la ration. Par ailleurs, Delacharlerie et al. (1995) ont obtenu moins d'embryons de bonne qualité chez des vaches de race montbéliarde superovulées par FSH après une alimentation de type extensif, à base d'herbe, que chez des femelles de même race, alimentées de façon intensive (à base d'ensilage d'herbe ou de maïs). Enfin, Mantovani et al. (1993) ont montré, chez des génisses de race à viande, que l'alimentation des donneuses à l'aide d'une ration riche en concentré (*ad libitum*) et pauvre en fibre pendant les 75 jours précédant la superovulation par la FSH n'avait pas d'influence sur la réponse ovarienne et le nombre d'embryons collectés mais pouvait provoquer une diminution importante de leur viabilité. (Combarrous, 1997 ; Gordon, 1996).

Des études ont permis de conclure que la population ovarienne de follicules antraux chez les bovins, pouvait être influencée par le niveau énergétique, imposé pendant le cycle oestral. Des recherches ont conclu séparément, que les donneuses engagées dans les travaux du transfert embryonnaire, étaient aléatoirement gérées, autre que le niveau adéquat de nourriture, bien qu'il puisse y avoir des cas où des vaches très précieuses soient en mauvaise condition corporelle, à cause de quelques-unes des maladies affaiblissantes, de blessures et de vieillesse. Scaramuzzi et Murray (1994) notèrent que des publications dans la littérature à ce jour, révèlent un manque de renseignements sur la relation entre la nutrition et la superovulation.

### 8. La variabilité individuelle :

Selon Chupin (1985), la femelle elle-même est responsable de plus de 50 % de la variabilité de la réponse ovarienne et de la production d'embryons. Cette variabilité peut avoir une origine physiologique ou génétique. Généralement, le taux d'ovulation et la production d'embryons sont relativement constants chez le même individu (Mapletoft, 1993). On pourrait ainsi, après plusieurs collectes successives, classer les donneuses en mauvaises, moyennes ou en bonnes productrices d'embryons (Chupin, 1988). Ces résultats ont été confirmés ensuite par de nombreux auteurs (Van der Schans et al., 1991 ; Mapletoft, 1993 ; Keita, 1995). Il serait même possible de choisir la donneuse avant de commencer le traitement de superovulation en fonction du nombre de follicules de 3 - 8 mm de diamètre comptés par échographie (Bungartz et Niemann, 1994 ; Combarous, 1997).

### 9. L'effet du follicule dominant :

Chez les bovins, quelques follicules ovariens de 3 mm et plus se développent et régressent en 2 ou 3 vagues successives au cours du cycle sexuel (Ginther et al., 1989). À chaque vague, un follicule est sélectionné pour devenir le follicule dominant (8 - 13 mm de diamètre) tandis que les follicules subordonnés de la cohorte subissent l'atresie (Ginther et al., 1989 ; Guilbault et al., 1991).

Selon Grasso et al. (1989), Lavoit et Fortune (1990), Guilbault et al. (1991), Savio et al. (1991), Huhtinen et al. (1992), Bungartz et Niemann (1994), la présence d'un follicule dominant au moment de l'initiation du traitement de superovulation, surtout en phase de croissance rapide, a un effet négatif sur la croissance d'autres follicules à antrum. L'effet stimulant des traitements gonadotropes sur le développement de la cohorte de follicules en début de croissance active pourrait être amélioré par la suppression du follicule dominant (Mapletoft, 1993).

## X. La sélection des donneuses:

En général, le choix des animaux repose sur l'absence ou la réduction des différents facteurs influençant la réponse de superovulation (sus citées). En résumé, deux critères généraux sont employés pour sélectionner les futures donneuses d'embryons, et cela dans la plupart des programmes de transfert embryonnaire :

1. La supériorité génétique des animaux sélectionnés, comme donneuses d'embryons ; qui contribueraient aux objectifs génétiques d'un programme de sélection.
2. Une probabilité élevée de récolter un grand nombre d'embryons utilisables ; c'est à dire une sélection plus rigoureuse sur une excellente donneuse d'embryon.

Une différence réside dans les pays développés, est que la supériorité étant déterminée par la puissance de leur marché, par exemple, des donneuses sélectionnées produisant une progéniture de choix qui peut être vendue à un profit et des bénéfices énormes. Evidemment, c'est peu approprié de produire des animaux, qui ne seront pas vendus et acceptés par les fermiers, surtout lors de l'introduction de nouvelles races bovine dans une région donnée.

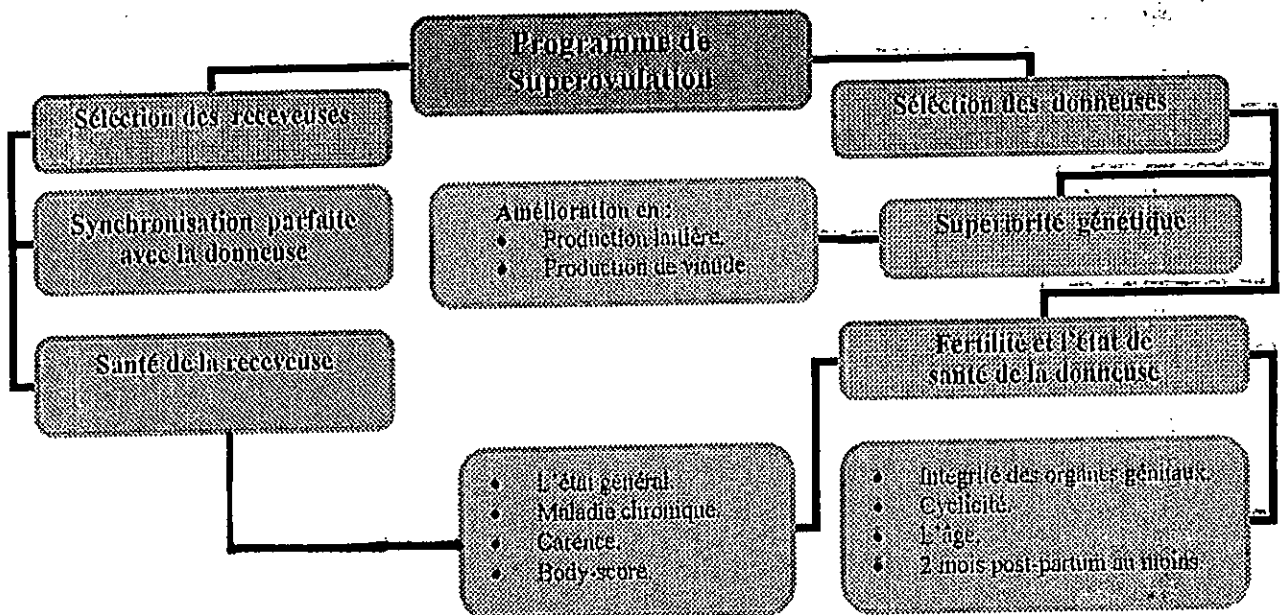
Dans certains cas, le seul critère de sélection pour le transfert embryonnaire est d'augmenter le nombre d'animaux disponibles ; cela peut être exigé pour déterminer si une nouvelle race sera incorporée dans un environnement. Pour le cas de conservation des espèces indigènes par cryopréservation d'embryons (banques embryons), on peut souhaiter une sélection aléatoire d'échantillon de donneuses (et pères) ou s'assurer qu'une gamme de phénotypes dans l'espèce est favorisée.

Dans beaucoup de cas, les mesures objectives de la supériorité génétique peuvent être utilisées, à titre d'exemple : la production de lait, sa composition, le taux de croissance des animaux, le vêlage facile et la résistance aux maladies ; sauf que la supériorité phénotypique n'implique pas forcément une supériorité

génétique, il est habituellement désirable de demander l'aide à un personnel qualifié dans l'élevage bovin, spécialement les généticiens qualifiés qui détermineraient les meilleurs donneuses.

La sélection de donneuse en vue d'une production d'embryon est soumise à des critères draconiens ; en effet, l'utilisation du transfert d'embryon pour cirquer souvent à des troubles de fertilité chez les grandes reproductrices et qui est le plus souvent un paramètre important de la sélection. Bien que la production embryonnaire qualitative et quantitative, doit être secondaire à la supériorité génétique, elle devrait être considérée sérieusement. On peut citer d'autres critères de choix :

1. Des vaches, saines, cyclées et hautement fertile.
2. Des animaux sans problèmes de vêlage, tel que la rétention placentaire.
3. Des donneuses qui sont à deux mois au moins du partum.
4. Les animaux malades ne produisent pas beaucoup de bons embryons.
5. Les jeunes vaches paraissent donner des embryons, légèrement plus utilisables que les génisses (Hasler et al., 1987).
6. La lactation chez les vaches à viande ou les vaches laitières ne diminuent pas réponse de la superovulation à condition que les vaches soient cyclées et qu'elles ne perdent pas du poids.
7. Les vaches très grasses sont de faibles donneuses d'embryons, car elles répondent mal au traitement de superovulation, de plus leurs tractus génital est plus difficiles à manipuler.



Fréquemment, les facteurs décrits ci-dessus, sont au-delà du contrôle du personnel qui travaille dans un programme de transfert embryonnaire, mais les suivants sont suffisants pour ce genre de programme :

1. L'utilisation de donneuses intrinsèquement fertiles, à au moins deux mois du post-partum, autrement dit une bonne santé de leur fonction reproductrice.
2. Encourager la gestion pour minimiser et cerner les problèmes potentiels, genre animaux qui gagnent ou perdent du poids lors du transfert embryonnaire.

Développer des stratégies pour corriger les problèmes induits par le programme du transfert embryonnaire lui-même, par exemple, répéter la superovulation sur la même donneuse sans perturber le cycle annuel de reproduction (Seidel et al., 1991).

### La gestion des donneuses :

Les donneuses peuvent être concentrées soit dans des fermes sous des conditions de production soit au niveau de centres pour le transfert embryonnaire, mais fréquemment elles sont sous la gestion intensive dans des fermes.

Les deux situations ont des avantages et des inconvénients ; les donneuses gardées dans la ferme, coûtent moins chères ; sauf que leurs entrées en production et leurs suivis par le personnel du transfert embryonnaire est plus ou moins difficile, surtout si les donneuses sont en lactation. Cependant, il est extrêmement important d'avoir une bonne coordination entre le personnel du suivi des donneuses dans la ferme et le personnel du transfert embryonnaire donc travail complémentaire ; dans la plupart des cas, le personnel spécialisé des centres de transfert embryonnaire, visitera la ferme pour récolter les embryons ; néanmoins, les donneuses peuvent être transportées au centre du transfert embryonnaire à condition que sa ne diminue pas le taux de succès et ce en évitant le stress de transport ; en principe 3 - 4 heures de voyage, dans des camions ou des wagons ne paraissent pas être un problème. Il est important que des installations convenables soit disponible dans la ferme pour ce type de programme ; cela inclut :

1. Le matériel pour manier le bétail,
2. Un réfrigérateur pour garder les médicaments,
3. Un emplacement approprié pour travailler avec les embryons ;
4. Le personnel à la ferme doit avoir une certaine compétence et en plus de son extrême minutie.
5. Des compétences dans l'insémination artificielle sont aussi exigées.
6. Des compétences dans la palpation pour déterminer la présence des corps jaunes quand les donneuses sont superovulées.

Selon la nécessité, le personnel du transfert embryonnaire peut aller fréquemment à la ferme, soumise au protocole de transfert embryonnaire et cela pour exécuter la plupart des étapes, mais, l'avantage financier d'avoir des donneuses dans la ferme serait alors perdu. En moyenne, le succès estimé avec les donneuses dans ce genre de ferme est moindre que si les donneuses sont dans les centres spécialisés du transfert embryonnaire, parce qu'elles sont suivies au centres plus attentivement ; néanmoins, le succès estimé sur quelques fermes est aussi bon ou mieux que ce des centres du transfert embryonnaire, évidemment, le succès est en très grande corrélation avec la compétence et la bonne gestion du fermier. Dans la plupart des cas la récolte des embryons dans la ferme, exige des installations et des capacités de gestion surtout pour les receveuses.

Si un nombre raisonnable de donneuses (moyenne de 25 - 100) sont réunies dans une installation centrale, la récolte d'embryons, le traitement et le transfert, peuvent être faits efficacement ; il est clair, que sous ces circonstances, des installations pour un grands nombres de donneuses (et receveuses) sont exigées. Sauf que, la concentration du bétail par cette voie prédispose les animaux aux maladies, cela est exacerbé lorsque les animaux sont issus plusieurs sources, ce qui peut introduire des maladies transportées avec eux de leurs régions d'origine ; la solution est qu'une grande attention doit être dirigée sur la gestion sanitaire des troupeaux, pour la prospérité du programme, en particulier quand le bétail impliqué est très précieux, cela inclut la quarantaine d'animaux qui entre dans le cheptel soumis au programme de l'ET, la vaccination systématique et les programmes de dépistages ; si tout se fait méthodiquement et minutieusement, pour la santé du troupeau, alors les programmes de transferts seront efficaces (Seidel et al., 1991).

## **XI. Récolte d'embryons :**

En bref, la donneuse est conditionnée ou non par un traitement hormonal dans le but d'induire plusieurs ovulations ; inséminée avec un mâle ou de manière artificielle. Selon les espèces, les embryons ainsi produits sont récoltés par un lavage de l'utérus de la donneuse entre le 5ème et le 7ème jour suivant l'insémination.

### **1. La récolte non chirurgicale (Flushing) :**

Des travaux de recherche faits pendant les débuts des années 70 sur les vaches superovulées, ont abouti à des appareils utilisés pour la récupération non chirurgicale des embryons. Cependant, il était normal de prendre en considération la santé animale, et les risques encouru lors de la procédure chirurgicale et surtout les problèmes très fréquents d'adhérences (environ 3 fois) sur le nombre possible d'interventions chirurgicales lors de la récolte des embryons, attachant une grande attention au début des années 1970, pour développer des procédures non chirurgicale. Il est aussi clair, que la procédure non chirurgicale, est une méthode atraumatique, facilitant amplement la pratique du TE dans les fermes et spécialement sur certaines catégories de vaches donneuses d'embryons qui sont les vaches laitières hautes productrices (risques opératoires et post-opératoire accrus). Ces méthodes non sanglantes ont été développés et employés sur ce type de vaches hautes productrices, ainsi il était impératif de remplacer les anciennes méthodes à savoir la méthode chirurgicale, par des méthodes pratiques, facilement utilisables sur les vaches superovulées (Gordon, 1996).

### a) Estimation des réponses à la superovulation :

Beaucoup de chercheurs ont actuellement montré que le taux de récupération d'embryons est comparable à ceux accomplis avec la méthode chirurgicale, donc l'efficacité de la récolte non chirurgicale est la même, à condition que les manipulations adéquates sont respectées, en plus des compétences acquises. Par contraste avec la récolte chirurgicale, le taux de récupération d'embryon n'est pas toujours précis, c'est à dire au même nombre des corps jaunes palpés par voie rectale, qui est la méthode principale, utilisée pour estimer le nombre d'ovulations induites. Une étude faite par Robertson et al. (1993); sur des donneuses superovulées par un traitement à base de PMSG, a permis de conclure que la présence de follicules lutéinisés réduisait l'exactitude à identifier des structures dans les ovaires de vaches superovulées.

### b) Filtres et cathéters :

La plupart d'unités commerciales de l'ET sont favorables à la récolte autour de J7 qui coïncide avec le temps d'arrivée des embryons dans la partie supérieure des cornes utérines. Il a été mentionné à cette date aussi que les récoltes non chirurgicales ont été faites sur des donneuses non superovulées avec succès (aux alentours de 70% d'embryons récoltés).

Actuellement, les méthodes de récolte non chirurgicale sont basées sur un type spécial de cathéter, elles peuvent être, un système à 2 voies ou à 3 voies mais toujours avec un ballonnet gonflable. Dans le système à 2 voies (exemple : La sonde Rusch, et la sonde de Foley), le milieu de récolte est introduit et recueilli via la même voie, alors que les systèmes à trois voies ont des canaux séparés pour l'introduction et la récupération du milieu de récolte d'embryons lors du lavage utérin (Sonde de Cassou). Les liquides récupérés après rinçage, sont mis dans des bocaliers stériles et sous une température ambiante convenable (température corporelle). Quelques bocaliers, sont mis près du sol, elles sont surélevées à environ un pied au-dessus de niveau de la terre pour faciliter l'écoulement et donc le drainage du milieu de récolte contenant les embryons hors de l'utérus de la donneuse lors de l'utilisation de la sonde de Cassou. Pendant les années 1980, des appareils de filtrage ont vu le jour, pour retenir les embryons après passage des liquides de récolte issus de l'utérus des donneuses, en laissant passer beaucoup de débris cellulaires. Cette caractéristique bénéfique l'a introduite commercialement dans la scène de l'ET ; de tels filtres étaient particulièrement précieux pour accélérer l'isolement et l'identification des embryons sous microscope.

Plusieurs descriptions du matériel conçues pour la récolte d'embryons chez les vaches superovulées, sont dans la littérature. En l'Allemagne de l'Est des chercheurs ont fourni de façon illustrée différents types de sonde, telle la sonde automatique du Buhner ; conçue pour la récolte embryonnaire par voie transcervicale ; cet appareil a donné un taux de récupération du milieu de récolte de 81 à 100% (Gordon, 1996).

### c) L'anesthésie Epidurale :

L'anesthésie épidurale caudale (basse) est induite en injectant 5 - 10ml d'analgésique (2% procaine ou d'hydrochloride de lignocaïne) dans l'espace intervertébral entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> vertèbre coccygienne. Des soins doivent être pris pour ne pas injecter une dose excessive à la vache récoltée (overdose) autrement elle pourrait perdre le contrôle de ses membres postérieurs, le rectum complètement vidé, la région vulvaire est lavée avec des antiseptiques topiques, ensuite la région est essuyée à l'alcool chirurgical puis séchée (Gordon, 1996).

### d) La procédure de récolte « Flushing » :

Les considérations suivantes doivent être prises pour la récolte de donneuses :

- Le fluide administré doit arriver à la pointe de la corne utérine ; possibilité que la plupart des embryons soient en 1<sup>ère</sup> semaine post oestrus.
- Tout le milieu de récolte injecté dans la corne utérine devra être récupéré.
- La récolte devra toujours être faite avec un minimum de stress et de trauma chez les donneuses.
- Le succès d'une récolte est en rapport direct avec le succès de récupération du fluide de récolte ; une récolte efficace devra faire retourner 90 à 100% du fluide initialement introduit.

Une bonne récolte a pour but de retrouver des embryons au stade blastocyste de développement, qui coïncide normalement à J7 post chaleurs (fig. 6-5). Quelques auteurs ont rapporté que la différence dans le taux résultant de la récupération d'embryon était insignifiant entre la récolte séquentielle des cornes utérines et la récolte utérine totale simultanée (Hay et al., 1990).

### e) Dilatation cervicale chez les génisses :

Un problème qui fait face à la récupération non chirurgicale, à cause de la difficulté rencontrée lors des tentatives de passage des sondes à travers le cervix des donneuses pendant la phase lutéale du cycle oestral, en particulier chez les génisses. Donc une dilatation mécanique simple s'impose, grâce à un outil nommé dilateur cervical, sauf qu'il ne fournit pas toujours une solution, en plus des risques de traumatisme ; pour de telles raisons, il y a eu des essais de dilater le col avec des appareils spéciaux ou par l'application de plusieurs agents, comme le carbachol, celui-ci a démontré son efficacité, par sa facilité d'administration et son coût relativement bon marché (Gordon, 1996).

Figure 6-5 : Développement embryonnaire précoce chez la vache superovulée d'après Mapletoff (1986).

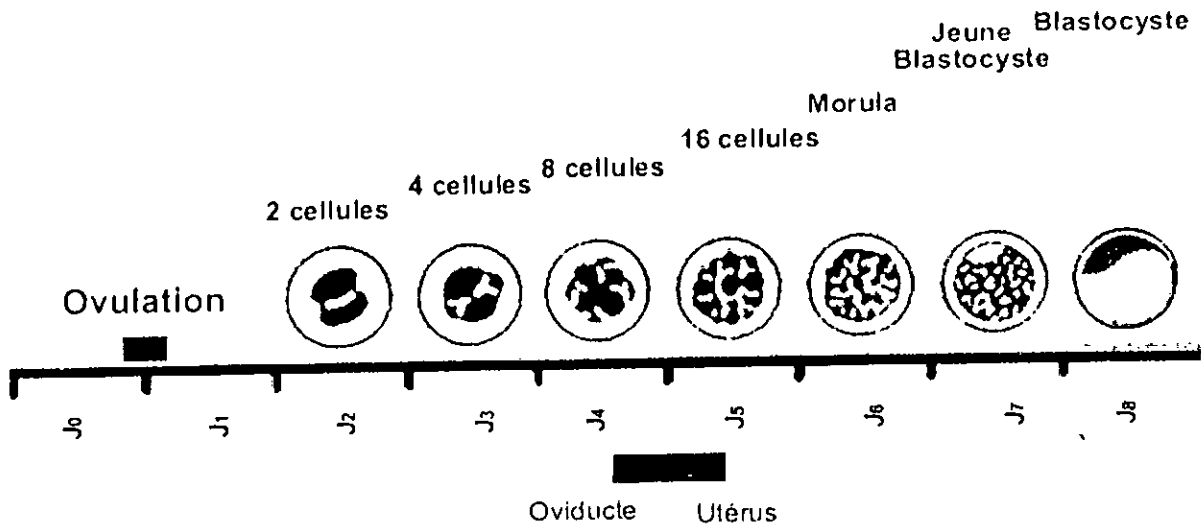
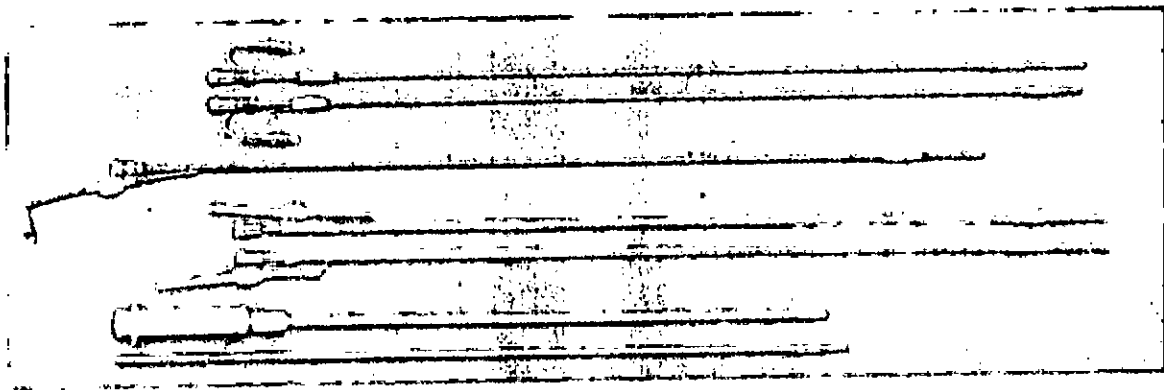


Figure 6-6 : La sonde de Folley (sonde à 2 voies).



### f) Principe de l'intervention :

Cette procédure plus ou moins récente a permis de faciliter la récolte embryonnaire pour les praticiens du TE, en plus de la réduction des risques de complications chez la donneuse (complications opératoires et postopératoires) : (Gordon, 1996).

1. La toute première étape de cette technique est la palpation ovarienne pour estimer le nombre de corps jaunes sur chaque ovaire et donc d'évaluer la réponse superovulatoire (dans certaines circonstances les donneuses qui ont mal ou pas répondu, ne sont récoltées).
2. Une anesthésie épidurale, est recommandée pour la procédure de récolte non chirurgicale. La zone d'élection pour l'anesthésie épidurale est la base de l'insertion de la queue avec le sacrum (épidurale basse se fait entre la 1<sup>er</sup> et la 2<sup>ème</sup> vertèbre coccygienne alors que la haute se fait entre la 2<sup>ème</sup> vertèbre sacrée et la 1<sup>er</sup> coccygienne), celle-ci est tondue puis lavé avec du savon iodé et ensuite badigeonné avec de l'alcool à

- 70° pour prévenir les infection spinale. Il faut éviter d'injecter une trop grande dose d'anesthésie qui fera perdre à l'animal son équilibre et donc, le forcé a se couché ; une quantité de 5 ml d'une solution stérile de 2% de procaïne est suffisante, une aiguille neuves pour chaque animal ; une bonne épurale se constate par la flaccidité de la queue.
3. Lorsque l'anesthésie prend effet, la queue est attachée sur un côté, l'arrière-train de la vache est nettoyé de la bouse et de la boue, le rectum est vidé de toute matière fécale qui gênerait la manipulation.
  4. La zone vulvaire est nettoyée entièrement, par un bon lavage au savon iodé puis un rinçage abondant est pratiqué, enfin elle est badigeonnée avec de l'alcool chirurgical à 70° puis séchée avec du papier hygiénique, surtout au niveau des lèvres vulvaires pour éviter lors de l'insertion de matériel de récolte que celui-ci introduit avec lui de l'alcool dans l'utérus, vu que les désinfectants en général sont extrêmement toxiques pour les embryons.
  5. Il est préférable d'utiliser un dilateur cervical pour ouvrir le cervix avant d'introduire la sonde de récolte.
  6. L'opération proprement dite commence par l'introduction de la sonde de Foley entre les lèvres vulvaires puis le passage de celle-ci à travers les anneaux cervicaux, l'opération est entièrement guidée par l'autre main, placée dans le rectum. Lors du passage de la sonde Foley dans l'utérus ; on a le choix entre deux approches pour positionner le ballonnet ; celles-ci sont nommées « Flushing » du corps ou des cornes :  
La première se fait en gonflant le ballonnet juste après le cervix, 10 – 20 CC d'air suffisent avant de le clamber (certain le font gonflé avec du sérum physiologique mais il est préférable d'utiliser de l'air). Un excès dans le gonflage peut provoquer la rupture de l'endomètre ;  
La deuxième se fait pour une corne à la fois, le ballon positionné à l'entrée de la corne juste après la bifurcation, l'avantage de ce lavage c'est l'utilisation de petite quantité de liquide de récolte donc, on entend de cela un petit volume à traiter et une récupération de liquide plus élevée avec moins de perte, un seule désavantage c'est la durée de l'opération.
  7. La technique se résume à injecter le liquide de récolte préalablement chauffé à la température du corps puis le récupérer (la récupération se fait automatiquement pour les sondes à trois voies «capillarité», car la voie de drainage est différentes de la voie d'injection des liquide de récolte, alors que la sonde à 2 voies, se fait avec aspiration des fluides par la même voie d'administration grâce à une grosse seringue, (fig. 6-6)) ; 50ml ou moins de liquide de récolte est introduite puis retirée en 2 à 3 fois (selon la distension utérine ressentit par l'autre main, pour éviter des dommages au niveaux de l'utérus). Un massage utérin durant l'opération est préconisé pour détacher d'éventuels embryons accrochés ou piégés sur la paroi.
  8. Les liquides récoltés sont envoyés au laboratoire et ils sont laissés pour décompter ou sinon filtrés à travers des filtres spéciaux pour embryons de la taille de 75 µm ; le culot ou le sédiment résultants est examiné sous un bon binoculaire.

## 2. L'influence de la semence mâle « taureau » :

Le taux de fertilité chez les vaches donneuses d'embryons, après insémination avec une semence congelée serait influencé par le choix du taureau (sa semence) et cela d'une façon marquée. Bien qu'il y ait une variation normale dans la fertilité des taureaux d'un centre de l'IA, il paraîtrait que de telles différences sont accentuées dans les élevages de vaches superovulées (Gordon, 1996).

## 3. Défaut d'exhibition des signes de l'oestrus chez les donneuses :

Quelques études ont montré qui peut y avoir de faible réponse ovulatoire, avec un rendement considérablement inférieure des embryons transférables chez les vaches donneuses (superovulées) dont leurs oestrus n'a pas été détecté après le traitement de prostaglandine, avant la superovulation (Walsh et al., 1993). Il a été montré aussi, qu'un traitement de 7 jours avec le PRID®, peut être employé chez de tels animaux pour réaliser des réponses de superovulation satisfaisantes (Gordon, 1996).

## 4. L'effet de l'allaitement sur la qualité d'embryons :

Lors d'une étude menée par Brown (Gordon, 1996) au pays de Galles (Wales), il a enregistré une très faible qualité d'embryons, produite au moment où les donneuses type viande, allaitaient. Dans une comparaison ultérieure contrôlée, entre un lot de vaches à viande tarie et en lactation (Brown et al., 1991), ont démontré l'effet nuisible de l'allaitement sur qualité de l'embryon chez les vaches superovulées.

## 5. Récolte embryonnaire après abattage :

Occasionnellement des embryons sont aussi récoltés après l'abattage de vaches donneuses. En Hollande, De Leeuw (1992) a trouvé que de telles récoltes produisaient une qualité d'embryon considérablement plus pauvre que ceux récoltés par la procédure non chirurgicale conventionnelle. L'auteur a suggéré que la faible



viabilité était causée par l'augmentation du PH des fluides utérins après l'abattage des donneuses (Gordon, 1996).

## 6. Traitement par la Prostaglandine après la récolte :

En Espagne ; Lopez-Gatius (1995) a conclu que la récolte et le lavage utérin n'induisaient pas la lutéolyse chez la plupart des génisses superovulées; les embryons qui restent dans l'utérus étaient capables de produire une gestation normale jusqu'à terme d'où la nécessité d'un traitement lutéolytique post-flushing (prostaglandine) (Gordon, 1996).

## 7. Fertilité après la superovulation :

L'influence de la superovulation sur la fertilité des vaches laitières était le sujet d'une étude par Bonnet et Manciaux (1995) en France; ils ont enregistré que 85,2% des vaches qui ont été observés en oestrus dans le mois après le vêlage et que 73% étaient gestantes après une première et une deuxième insémination. Ils ont trouvé aussi que la fertilité des vaches n'a pas été affectée par le traitement de superovulation et que l'intervalle moyen entre la récolte et la conception était 54 jours. Une certitude est que la superovulation et la récupération d'embryons n'affectent pas la performance reproductrice subséquente tel qu'il a été montré chez des vaches Portugaises allaitantes, par Lopez da Costa et al. (1995).

## XII. Classification des embryons bovins :

Cette phase succédant la récolte, est décisive car elle permet d'éliminer les embryons défectueux (morts ou gravement lésés) et de ne garder que les bons ; les meilleurs sont orientés vers la congélation, pour un transfert ultérieur.

### 1. La terminologie embryonnaire :

Chez les mammifères, les gamètes femelles sont appelées ovule, le terme correcte actuellement employé pour ces gamètes récemment ovulées, est oocyte (ovocyte) ; après la fécondation par une gamète mâle (spermatozoïde), l'ovocyte se transforme en une cellule embryonnaire, appelée zygote, qui est un embryon à une seule grosse cellule, cette embryon commence une série de division mitotique, produisant 2, 4 et 8 cellules, au stade 16 cellules l'embryon prend le nom de morula (du latin mûre).

Les trois 1<sup>ères</sup> divisions embryonnaires sont appelée clivage, engendrant 1 à 8 cellules embryonnaires (phase de clivage) ; durant ce temps l'embryon diminue de poids et c'est seulement au stade morula que celui-ci commence à augmenter de poids. Durant le stade morula, les cellules changent de forme sphérique à polygonale ; ce phénomène est appelé compaction, pendant ce processus des jonctions spécialisées se forment entre les cellules permettant à celles-ci de communiquer entre elles. Fréquemment, la morula compactée est appelée morula compacte « tight morula » (la morula compactée est plus petite que l'embryon pré-compacté), le phénomène de compaction est un excellent signe de développement embryonnaire normal ; le défaut de compaction d'embryon de vache, de 6 jours post-oestrus, indique un retard de développement. Quant la morula poursuit son développement en blastocyste (une cavité se forme), ce stade blastocyste est aussi un indicateur du développement embryonnaire continu et normale ; inversement, un défaut de formation du blastocoele du 7<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour de l'oestrus, signifie un retard de développement.

La zone pellucide est une capsule gélatine-like, qui entoure l'ovocyte et l'embryon durant ces stades précoces. Elle contient des récepteurs pour les spermatozoïdes, ceux-ci sont désactivés après la fécondation ; elle permet de garder les cellules embryonnaires pré-compactées ensemble, et protège ces jeunes cellules du système immunitaire et des agents pathogènes, si la zone pellucide est enlevée lors de la pré-compactation embryonnaire, les cellules vont se séparer lors du transfert et elles dégénèrent. Lorsque le blastocoele devient très large, l'embryon s'allonge (normalement 8 à 9 jour après l'oestrus) diminuant l'épaisseur de la ZP, donc on remarquera son amincissement, cette phase est nommée stade blastocyste en extension « expanded blastocyst » ; après un jour de plus son expansion est si grande que l'embryon éclot hors de ZP (peut être aidé par des enzymes). Le blastocyste éclot est de forme ellipsoïdal au 11<sup>ème</sup> - 13<sup>ème</sup> jour post-oestrus, cette elongation devient plus marquée le 14<sup>ème</sup> - 16<sup>ème</sup> jours post-oestrus (tab. 6-5).

### 2. Les procédures d'évaluation et ces étapes :

Pour le débutants dans l'évaluation, elle leur apparaîtra comme une opération très délicate, se basant sur la morphologie des embryons; évidemment il n'est pas profitable de transférer un ovocyte non

fécondé ou d'un embryon dégénéré, ni dont abandonner les embryons parfaitement normaux. ces deux erreurs sont commune si les personnes débutent dans l'expérience de l'évaluation, alors qu'elles sont peu fréquentes quand le personnel plus expérimenté prend des décisions hâtives ; il y a 3 élément qui font de l'évaluation embryonnaire une réussite: l'entraînement, l'expérience et l'équipement approprié.

L'entraînement inclus ; l'apprentissage correcte de la morphologie embryonnaire à différente période post-oestrus et les déviations de la morphologie normale résultante : l'étude doit comporter aussi la manipulation et l'examen de l'embryon ; l'expérience quant à elle, est acquise avec l'examen de beaucoup d'embryons à différents stades de développement, l'idéale une centaines d'embryons a étudié sous la régie d'une personne expérimentée dans se domaine ; les photographies, les dessins et les slides (diapositives) sur de nombreux et de différents embryons sont d'un grand intérêt pour la formation. Cependant, ils ne peuvent substituer que partiellement les vrais embryons, une personne expérimenté peut évaluer plus de 95% des embryons correctement grâce à un bon stéréomicroscope sous des grossissements de 30X et 40X et 8X à 20X sur l'oculaire) ; les microscopes composés utilisés dans l'évaluation sont spéciaux, (il important de savoir que beaucoup ne sont pas fais pour l'évaluation et l'examen embryonnaire car la distance: embryon – objectif est fréquemment petite, gênante pour les manipulation).

L'embryon récolté au 6<sup>ème</sup> jour post-oestrus, doit être en post-compaction appelé morula compacte « tight morula », il doit contenir 50 – 80 cellules, bien qu'il est impossible de compter les cellules avec précision en post compaction, sans produire des dommages sur l'embryon. Il est plus intéressant de faire une estimation du nombre de cellules ; l'embryon doit être généralement sphérique ou ovoïde, ni de couleur trop claire ni trop sombre, avec des cellules de taille uniforme ; une déviation à la normale inclus : une irrégularité de taille des cellules ; de grandes vacuoles à l'intérieure des cellules ; des zones de dégénération dans l'embryon ; quelque cellules non compactées avec la masse cellulaire principale (englobées sous le terme de blastocytes expulsées ou exclus) et enfin une ZP endommagée.

Presque, 20 à 30% des bons embryons ont quelques anomalies détectables dans leur morphologie, plusieurs de ces défauts sont responsables du grade de classement des embryons, si une partie de l'embryon apparaît dégénérée mais que sa plus grande partie apparaît normale, alors il aura d'excellentes chances de développement en un veau normal, mais une morphologie anormale ne donnera pas un veau anormal ; notant que le taux de gestation des embryons bissectionnés est incontestablement tout à fait bon. ce qui expliquerait qu'une partie de l'embryon peut dégénérée sans diminuer de façon marqué le taux de gestation.

Les embryons prélevées à J7 sont des jeunes blastocystes. ils contiennent une cavité blastocoelique, à J8 l'embryon à un énorme blastocoele et il devrait être en expansion, alors le diamètre devra augmenté et la ZP s'émincée. Au le laboratoire du Colorado une évaluation d'environ 15 000 embryons bovins se fait par an, 1/3 d'entre eux sont non fécondés ou trop dégénérés ; une des seules taches difficile pour les personnes de l'évaluation et la classifications des embryons, est de différencier entre une jeune morula et un ovocyte non fécondé (le terme d'embryon non fécondé est faux et contradictoire), à cause de la grande similitude dans la taille et de la texture ; leurs différences est que l'ovocyte non fécondé à une membrane cellulaire parfaitement lisse alors que la morula « tight morula » à une apparence légèrement en écaille. Avec de l'expérience ces 2 types peuvent être facilement distingués, surtout sous un microscope combiné ; mais parfois ils sont incorrectement classés même par des experts, qui ne prennent pas suffisamment de temps pour l'évaluation correcte de l'embryon (5 – 10 secs). Une seconde erreur beaucoup plus rare dans le classement, quand l'ovocyte non fécondé dégénère en son centre et devient suffisamment clair, ressemblant à un blastocyste au premier coup d'œil. Plusieurs échelles de classifications des embryons selon le degré de distinction sont utilisées, parmi elles : bon, juste (moyen) et pauvre, élaborée par un excellent traité sur la morphologie embryonnaire ovine de Wintenberger Torres et Sevellec, 1987 ; utilisée de la même façon pour les embryons bovins, en effet les embryons bovins et ovins ont une morphologie presque identique.

Tableau 6-5 : Les stades de développement embryonnaire normale en fonction du jour de l'oestrus d'une donneuse (Seidel et al., 1991).

<i>Stade de développement</i>	<i>Jours après le début de l'oestrus</i>
1-cellule	0 - 2
2-cellules	1 - 3
4-cellules	2 - 3
8-cellules	3 - 5*
16-cellules	4 - 5*
Jeune morula	5 - 6
Morula compactée "tight morula"	5 - 7
Jeune blastocyste	7 - 8
Blastocyste	7 - 9
Blastocyste expansif	8 - 10
Blastocyste éclos	9 - 11

\* Embryon en général se déplace de l'oviducte vers l'utérus du stade 8 au 16 cellules.

La procédure convenable pour des embryons, est de les isoler puis d'enlever tout les débris autour (elle se fait automatiquement lors du processus de lavage ; le standard c'est 3 lavages), ensuite sépare les embryons en groupes, un groupe pour les transférables (utilisés aussi pour la congélation et la bissection) et enfin un groupe non transférable (non fécondés et dégénérés), pour cela chaque embryons doit être bien examiné de façon individuel, par un grossissement faible, fort (dans certain cas on le fait rouler sur le fond de la boîte à pétris grâce à une pipette ou par agitation de la boîte) ; une classification incorrecte serait de ne pas placer les embryons dans le bon groupe, dans les cas échéant l'embryon est exploré grâce au microscope combiné.

Quelques uns des laboratoires ont un classement de 6 niveaux ; pour ceux, classé congelables ou transférable est fondé sur une classification finale avant congélation ou transfert, cette étape ce fait par remplissage d'un formulaire à point, détaillant quelques critères suivants : l'âge (jour après l'oestrus), nombre de cellules, couleur du cytoplasme, zone de dégénérescence, nombre de blastomères expulsées, taille de l'espace périvitellin, stade de développement embryonnaire et le nombre de jours de retard s'il existe par rapport à la normale (exemple : un embryon de 4 cellules récolté à 5 jours après l'oestrus aurait 2 jours de retard), après cette notation, les embryon son placés dans les 6 catégories suivantes :

1. *Excellent* ; parfait embryon pour son stade.
2. *Bon* ; imperfections insignifiantes tel que une ZP ovale et un petit nombre de cellules expulsées, ou une forme légèrement asymétrique.
3. *Moyen* ; anomalies peu nombreuses à titre d'exemple : un nombre modéré de cellules expulsées, petite taille, un peu de dégénérescence ou un retard de développement d'un jour.
4. *Pauvre ou Faible* ; dégénérescence considérable, cellules vésiculées, grande variation de taille des cellules, défaut de compaction, très petite et/ou un retard de 2 jours.
5. *Dégénéré* ; de sévère dégénérescence sans valeur transférable.
6. *Non fécondés ou embryons de 2 - 3 cellules*.

Il est souvent impossible de déterminer si un embryon est très dégénéré ou c'est un ovocyte non fécondé, même si l'embryon contient 2 ou 3 cellules, parce que, un ovocyte non fécondé peut être fragmenté.

Le tableau (tab. 6-6) fournit une classification des embryons selon 4 catégories d'embryons transférables, évaluant le meilleurs taux de gestation pour chaque groupe. Il est clair que ce type de système de classification des rangs d'embryons est raisonnable, puisqu'il se base sur des données statistiques.

Tableau 6-6 : Les taux de gestation des embryons classés dans 4 groupes basés sur la morphologie (Seidel et al., 1991).

<i>Classification</i>	<i>Nombre</i>	<i>Pourcentage d'embryons</i>	<i>Taux de gestation</i>
Excellent	275	54	63 <sup>a</sup>
Bon	153	30	58 <sup>a</sup>
Moyen	42	8	31 <sup>b</sup>
Pauvre	42	8	12 <sup>c</sup>

a, b, c Taux de gestation avec différentiels  $P < 0,05$ .

### 3. Evaluation d'embryons de vaches superovulées :

L'évaluation est une partie non amputable de la technologie de l'ET; dans les années 70, il était reconnu que le taux optimal d'achèvement de la gestation estimé chez les vaches receveuses, était particulièrement renseigné lors du développement chronologique et morphologique de l'embryon bovin transplanté (fig. 6-7). Les embryons de vaches ont été décrits pour la première fois en 1931 et les renseignements sur le développement chronologique précoce de ces embryons ont été fournis par des chercheurs du Royaume-Uni et par la suite la France. Durant ces années, beaucoup de méthodes d'évaluation sur la normalité et la viabilité précoce des l'embryons bovins ont été rapportées, beaucoup de ces méthodes sont centrées autour des critères morphologiques de l'embryon lui-même, tel l'uniformité de ses cellules, la forme de l'embryon, la couleur et les dimensions totales.

**L'analyse chromosomique :** l'analyse de la chromatine, d'embryons récoltés sur des vaches superovulées a été traité par plusieurs chercheurs. Sur les bases de données publiées, Sreenan et Diskin (1987) ont considéré l'in vraisemblance d'une grande anomalie chromosomique héritée, qui serait à l'origine de toute augmentation des pertes d'embryons après transfert embryonnaire. Cependant, un travail récent fait au Canada, a montré une plus haute fréquence d'embryons anormaux récoltés sur des vaches Holstein superovulées proportionnelle à ceux normalement attendu.

**Paramètres morphologiques et morphométriques :** Aux USA, le système de classification des embryons de vaches sur une base morphologique, a été proposé par Lindner et Wright (Gordon, 1996); ces auteurs ont classé des embryons en quatre catégories : excellent, bon, moyen et pauvre, les taux de gestation associés à chaque catégorie après transfert sur des receveuses étaient 45%, 44%, 27% et 20%, respectivement. Leurs rapports ont aussi fourni un guide visuel utile à l'évaluation morphologique des embryons, permettant aux embryons d'être classés selon le stade du développement et leur qualité, dans des marges particulières. En Irlande, cinq points d'après une échelle ont été utilisés pour répartir morphologiquement les embryons de vaches avant et après une cryopréservation, celle-ci a été proposée par Kennedy et al. (1983) les détails de ce système de classification sont montrés dans le tableau 6-7 ci-dessus.

Tableau 6-7 : Notation d'embryons de vaches sur des bases et des caractéristiques morphologiques (d'après Kennedy et al., 1983).

<i>Le niveau</i>	<i>La qualité</i>	<i>Caractéristiques typiques des embryons</i>
Grade 1	Excellent	L'embryon parfaitement symétrique, montrant de la granulation égale et un contour précis, distinct ; aucune expulsion du blastomère. L'embryon devra être à l'étape attendue de son développement par rapport à son âge.
Grade 2	Bon	Embryon montrant une granulation égale avec un contour précis et distinct, quelques blastomères expulsés et un nombre mineur de blastomères dégénérées ; parfois de forme un peu asymétrique.
Grade 3	Moyen	Les embryons sont intacts mais avec un contour brumeux par endroits; défauts évidents et apparent tel que des cellules expulsées, vésiculation et quelques-uns des blastomères dégénérés.
Grade 4	Pauvre	Les embryons montrent de la granulation irrégulière, un contour brumeux; beaucoup d'expulsion de blastomères et une dégénérescence évidente ; quelquefois de forme anormale.
Grade 5	Dégénéré	La dégénérescence est donc prononcée avec une impossibilité de déterminer le stade exact de développement ; quelquefois de forme anormale.

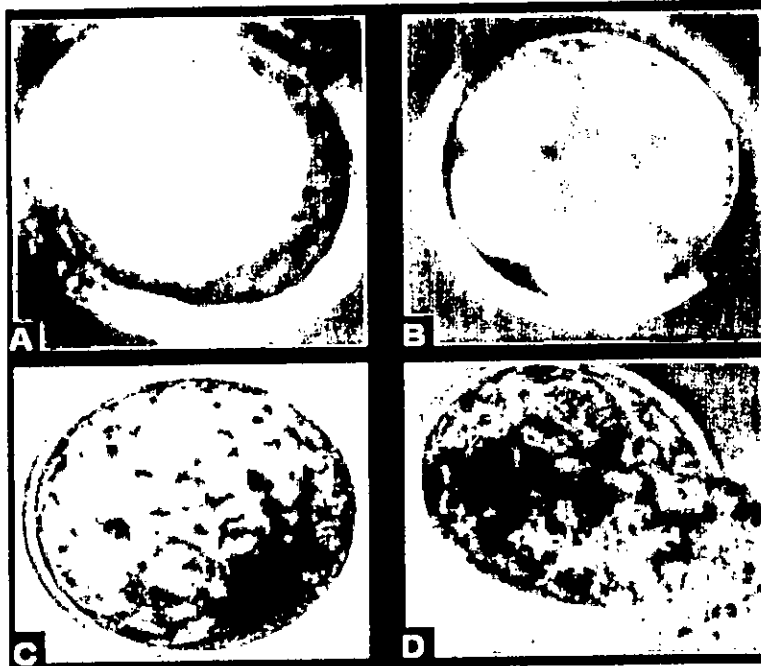
Les plus importants critères de tout schémas de classification des embryons, doivent être basés sur les caractères morphologiques facilement reconnaissables, et devront être retenus en relation aux taux de gestations estimés, et attendues pour chaque grade. Hasler et al.(1987), par exemple, ont travaillé sur un grand nombre de vaches, rapportant des taux de gestation de 83%, 75%, 63% et 46% après transfert d'un seul embryon frais par vaches classées auparavant selon le grade 1, 2, 3 et 4, respectivement. Les études de Farin et al. (1995), qui ont mesuré l'étendue de la classification des embryons, en accord aux expérimentations antérieures des autres chercheurs dans l'évaluation des embryons de vaches. Ces derniers ont montré un excellent standard de classification lors du 7<sup>ème</sup> jour du stade de développement embryonnaire, ou le niveau de qualité est extrême durant cette période, malgré qu'il y avait moins de consonance dans répartition de degré des caractères anormaux ; une échelle de triage simple (niveau 1, plus haute qualité d'embryons ; niveau 2, embryons avec une morphologie anormale; niveau 3, embryons dégénéré) a accru le niveau d'accord parmi les chercheurs.

En Hollande, De Leeuw (1996) a enquêté sur l'uniformité des gradés de classement des embryons bovins, sur un ensemble de transfert embryonnaire fait, par plusieurs équipes de transfert, celui-ci a utilisé des enregistrements vidéo ; de tels enregistrements étaient utiles dans l'évaluation de la capacité des personnes à classer les embryons en plus de la possibilité de recyclage fourni ; le résultat sont deux facteurs considérés comme essentiels pour répartir visuellement l'embryon bovin après récolte:

1. Son apparence générale, observée pour telle caractéristique comme la présence de cellules irrégulières ou dégénérées;
2. Le stade de développement embryonnaire relatif à son âge estimé.

La morphologie et la taille de l'embryon bovin, récolté après superovulation, ont été décrites par plusieurs auteurs. Le diamètre total de l'embryon bovin est estimé entre 150 et 190  $\mu\text{m}$ , y compris une épaisseur de la zone pellucide de 12 – 15  $\mu\text{m}$  approximativement. Le diamètre reste pratiquement inchangé entre le début de l'étape zygote jusqu'à l'étape d'expansion du blastocyste.

Figure 6-7 : Différentes phases embryonnaires, A : Ovocyte non fécondé, B : Morula compactée. C : Blastocyste, D : Blastocyste en éclosion. (Seidel et al., 1991).



Les différents stades de développement de l'embryon bovin, après les étapes précoces de clivage (fig. 6-7) sont donnés par Lonergan, 1992 dans le tableau 6-8 suivant :

Tableau 6-8 : Les critères employés dans l'évaluation des embryons de vaches d'après les traits morphologiques (Lonergan, 1992).

<i>Le stade de développement</i>	<i>Les caractéristiques typiques</i>
Morula	Les blastomères individuels sont difficiles à discerner l'un de l'autre. La masse cellulaire de l'embryon occupe la plupart de l'espace périvitellin.
Morula compacte	Les blastomères individuels se sont unis, formant une masse compacte. La masse de l'embryon occupe 60 - 70% de l'espace périvitellin.
Jeune Blastocyste	C'est un embryon qui a formé une cavité remplie de fluide ou blastocœle avec une apparence générale d'un cachet rond d'estampie. L'embryon occupe 70 - 80% de l'espace périvitellin. La différenciation visuelle entre le trophoblaste et les cellules de la masse interne (le bouton embryonnaire) est possible à ce stade de développement.
Blastocyste ou blastocyste d'âge moyen	La différenciation prononcée de la couche du trophoblaste externe et de la masse cellulaire interne plus sombre, plus compacte sont évidentes. Le blastocœle est très proéminent occupant la plupart de l'espace du périvitellin de l'embryon.
Blastocystes en expansion	Le diamètre total de l'embryon augmente terriblement (1,2 - 1,5X), et en même temps un amincissement de la zone pellucide à environ un tiers de son épaisseur d'origine.

Blastocystes éclos	Les embryons subissent le processus d'éclosion et donc ils commencent à sortir complètement leur zone pellucide.
Blastocystes éclos en expansions	Une ré-expansion embryonnaire avec un grand blastocœle, d'apparence très fragile et parfaitement ronde dans la forme allongée.

#### a) La variabilité du stade des embryons récoltés :

La majorité des embryons bovins sont au stade morula plus tardif ou au stade jeune blastocystes, il peut y avoir des cas de récolte d'embryons beaucoup plus jeunes. Au Canada, par exemple, Bousquet et al. (1993) ont montré que des blastocystes en culture, en retard de croissance (8 - 16 cellules), récoltés au 7<sup>ème</sup> jour sur des donneuses superovulées, peuvent être viables et capables de produire une gestation après congélation et décongélation. L'inconvénient dans les estimations morphologiques de la qualité de l'embryon est la viabilité, surtout quelle est liée à des facteurs subjectifs, en plus d'une grande exigence d'un personnel très compétent et très qualifié, malgré tout ceci, les résultats de laboratoires comparant une évaluation embryonnaire entre des individus égaux sont très difficiles.

Plusieurs auteurs ont fait des rapports sur les stades cellulaires, relatifs à l'âge des embryons bovins récoltés, sur des vaches superovulées ; en Tchécoslovaquie, Holy et al. (1988) ont récolté au 7<sup>ème</sup> jour des embryons et enregistré parmi eux 18,7% qui étaient en morula tardive (vieilles morulas), 47,7% étaient des blastocystes très jeunes, 20,5% étaient des blastocystes jeunes, 9,5% étaient des blastocystes en expansion, 2,1% blastocystes entrains d'éclore et 0,5% de blastocystes qui été éclos. En tenant compte du fait que les ovulations chez les donneuses superovulées peuvent s'étendre sur une période de 8 h (Laurincik et al., 1993b), des degrés de variation dans la progression du développement peuvent être possibles.

#### b) La culture *In Vitro*, secour des embryons :

En effet, les embryons issus des donneuses superovulées et qui ne sont pas arrivées à l'étape où ils peuvent être congelés sans risque, peuvent être secourus actuellement par les méthodes de culture *in vitro* pour les ramener à l'étape où ils peuvent être congelés. En Hollande, Nauta et al. (1994) ont rapporté cette possibilité de sauver des embryons récoltés par cette voie (*in vitro*) ; 13 embryons à l'étape morula non - compactés étaient cultivé sur le foie et la rate bovine (BRL), conditionné pour 48 h jusqu'à l'étape blastocystes avec succès.

### 4. La superovulation et le développement de embryonnaire :

Il est admis actuellement que la fréquence d'embryons anormaux soit plus élevée chez les vaches superovulées que chez les animaux à ovulation spontanée. Au Danemark, Callesen et al. (1995), ont récolté à J7 post-oestrus, 1495 embryons transférables à partir de vaches et de génisses superovulées, après les avoir classés selon cinq stades de développement et quatre niveaux de qualité. Ces chercheurs ont suivi certains facteurs parmi ces facteurs analysés : les donneuses, la race des donneuses, la parité, la préparation des gonadotrophine utilisée, sexe de l'embryon, l'IA « les mâles », la personne qui évalue ces embryons et la saison de la récolte de ces embryons, seule les facteurs évaluation et la donneuse ont été jugé qu'ils avait un effet considérable.

#### a) Le nombre cellulaire :

Il a été rapporté, que les blastocystes bovins contiendraient approximativement 100, 120 et 160 cellules au stade jeune, en expansion et au stade blastocyste allongé, respectivement. Selon Betteridge et Flechon (Gordon, 1996), les jeunes blastocystes bovins contiennent 100 cellules et les blastocystes autour de l'éclosion contiennent approximativement 160 cellules. Quelques auteurs ont enregistré des nombres relatifs des cellules dans la masse cellulaire interne (ICM) et le trophoctoderme ; dans un rapport, établi sur des embryons, récoltés de vaches superovulées, que le nombre cellulaire moyen dans les blastocystes au stade tardif est de 140 approximativement, dont 93 cellules étaient des cellules de trophoblastiques et 47 étaient des cellules de ICM (ratio 2:1).

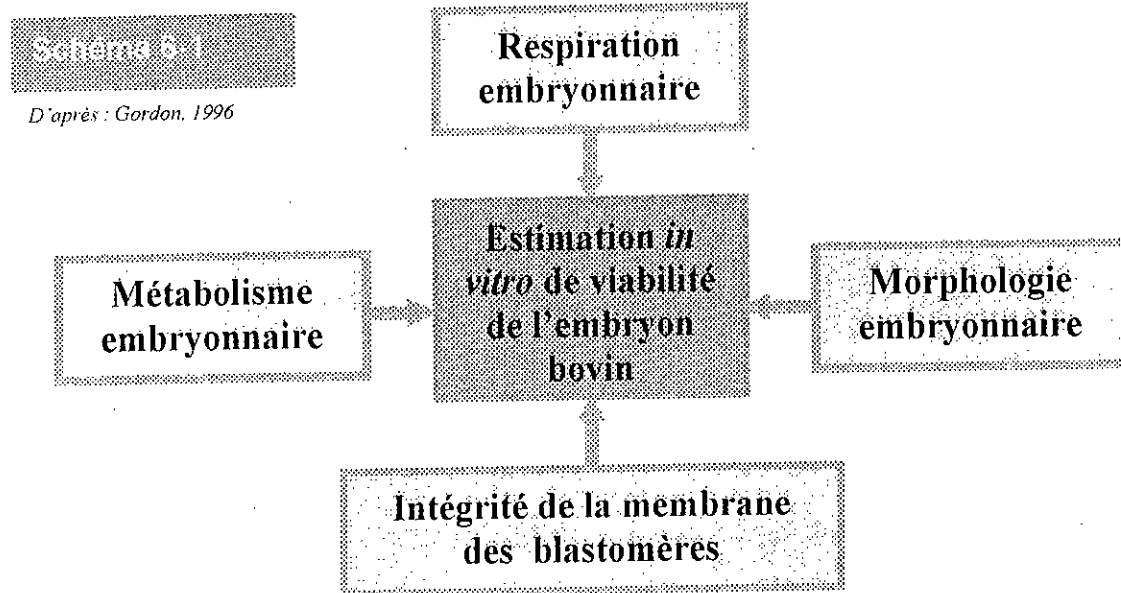
#### b) L'éclosion comme mesure de la viabilité des embryons :

Occasionnellement, au laboratoire quant il est nécessaire de calculer la viabilité des embryons au stade blastocyste après congélation et décongélation, l'éclosion est utilisée car c'est un événement clé du développement embryonnaire, qui se produit vers 8 - 10 jours après l'ovulation et fécondation chez la vache ;

beaucoup de données dans la littérature ont montré que les embryons de vaches superovulées sont capable d'éclore en culture *in vitro*.

### c) Index de viabilité des embryons bovins :

La technique utilisée pour calculer la viabilité embryonnaire d'après Overstrom (1996), et en accord avec d'autres auteurs, grâce à la disponibilité des moyens de mesures objectives et non dangereuses pour l'embryon ; celle-ci jouerait un rôle important dans la classification embryonnaire future, le schéma 8-1 des méthodes employées est le suivant :



## XIII. Augmentation de la qualité et du nombre d'embryons :

### 1. Ponction du follicule dominant sous échographie :

Une reprise de la croissance des petits follicules (Bungartz et Niemann, 1994) est induite lors de l'élimination physique du follicule dominant par ovariectomie unilatérale, De même que son aspiration transvaginale sous échographie, selon la méthode décrite pour l'OPU (ovum pick up) par Pieterse et al (1991), semble être une méthode de choix (tab. 6-9), puisque, la ponction répétée de follicules ovariens ne semble pas diminuer la fertilité ultérieure des vaches (Pieterse et al., 1991).

Bungartz et Niemann (1994) ont rapporté que les nombres moyens d'ovulations, d'embryons totaux et d'embryons viables étaient significativement plus élevés chez les femelles dont le follicule dominant avait été ponctionné 2 jours avant le début du traitement de superovulation que chez celles dont le follicule dominant n'était pas ponctionné.

**Tableau 6-9 :** Influence de la ponction du follicule dominant sur la production d'embryons, viables et congelables, par des génisses charolaises superovulées par FSH (Stimufol, RM) (Coimbarnous et al., 1997).

Critères	Traité*	Témoins**
Le nombre moyen d'embryons.	8,2 ± 5,1	7,6 ± 6,2
Le nombre moyen d'embryons viables.	4,0 ± 4,1	3,1 ± 3,1
Le nombre moyen d'embryons congelables.	2,2 ± 2,6	2,1 ± 2,3

\* Ponction du follicule dominant 2 jours avant le début de la superovulation. \*\* Pas de ponction

### 2. Traitements hormonaux :

L'injection d'hCG à J7 du cycle provoque la lutéinisation ou l'ovulation du follicule dominant, ceci a été testé pour améliorer la réponse ovarienne, mais sans succès (Rajamahendran et Calder, 1993).



L'injection d'œstradiol sous forme de valérate (5mg) à J2 (J0 = chaleurs) du cycle provoque l'atresie du follicule dominant de la 1<sup>ère</sup> vague de croissance folliculaire, mais cette action n'est pas réalisée si l'œstradiol est injecté à J5 ou J7 du cycle (Bo et al., 1992). Ces résultats ont conduit Bo et al. (1994) à contrôler et synchroniser la vague de croissance folliculaire à l'aide d'un traitement associant œstradiol-17 $\beta$  + progestagène (Crestar N.D.). Lorsque l'implant est posé à J2, J5 ou J8 du cycle et l'œstradiol-17 $\beta$  injecté un jour après, les auteurs observent l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire environ 4 jours plus tard. Par examen échographique, ils ont montré également que le diamètre des plus gros follicules diminuait durant les 5 jours suivant l'injection d'œstradiol. Cependant, Mapletoft (1994) n'a pas constaté d'amélioration des réponses après un tel traitement. L'utilisation de traitements associant œstradiol et progestagène peut être une approche possible pour synchroniser les vagues folliculaires, mais des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer leur efficacité dans les conditions de terrain. (Combarnous, 1997).

La réponse au traitement de superovulation par FSH n'est pas augmentée aussi par des injections de GnRH effectuées après l'injection de PGF2 $\alpha$ . Cependant, des résultats plus favorables sont obtenus avec des injections précédant la mise en place de la superovulation par FSH (Saumande, 1995). Il a été montré chez les ovins que l'inhibition temporaire de la croissance folliculaire suivant de tels traitements semble améliorer la réponse ultérieure à la FSH, ces résultats sont en faveur de l'hypothèse d'un effet favorable de la suppression du follicule dominant sur la réponse de FSH (Briois et al., 1992), mais les effets de tels protocoles n'ont pas encore été testés chez les bovins (Humblot et Saumande, 1993).

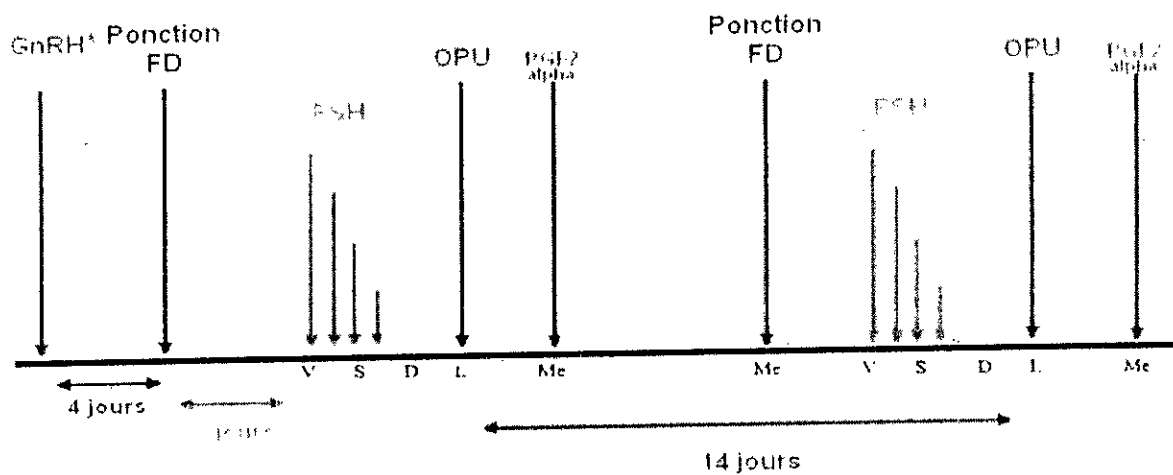
### 3. L'OPU (Ovum pick up, ou Ponction Folliculaire Echoguidée) :

Les premières estimations du coût d'un veau produit par ponction folliculaire échoguidée d'ovocytes (OPU) associée à la FIV étaient deux fois celui d'un veau issu d'embryons produits in vivo (Nibart et al., 1995). En 1998, il a pu être diminué à près de 1,2 fois de celui du veau issu de TE classique (Colleau et al., 1998). Le coût de la production d'embryons bovins in vitro va donc vers une diminution progressive grâce aux systèmes d'organisation de la production et aux améliorations technologiques.

Figure 6-8 : Protocole canadien de la superovulation associée à la l'OPU (Guilbault et al., 1996)

Méthodes Canadienne: Association Ponction du FD et FSH

Traitement de Superovulation pour OPU tous les 14 jours.  
(AETE 1996 Guilbault et al)



\* n'importe quel moment du cycle.

La technique d'OPU, qui dérive directement de la méthode de prélèvement d'ovocytes pratiquée en routine dans l'espèce humaine lors de « FIVETE », a permis de faire des progrès considérables dans la collecte des ovocytes bovins par comparaison à la méthode encore largement utilisée de lavage utérin. La collecte est réalisée à l'aide d'une aiguille introduite dans le cul de sac dorsal du vagin. La sonde échographique permet de visualiser les follicules ovariens de stade III, de 2 à 6 mm, qui seront ponctionnés.

Les sondes utilisées chez les bovins sont généralement des sondes vaginales prévues pour la collecte d'ovocytes chez la femme (sonde sectorielle de 5 ou 7,5 Mhz) : la sonde est insérée dans une gaine de

prolongation et équipée d'aiguilles très longues (30 cm) ou d'un système de prolongation d'aiguille. L'animal reçoit un tranquillisant et souvent une anesthésie épidurale. La sonde est introduite par le vagin et l'ovaire est saisi par voie rectale, puis amené face à la tête de la sonde, les follicules sont alors visibles sur l'écran de l'appareil d'échographie puis placés face à l'aiguille qui traverse alors la paroi vaginale puis celle des follicules. Un système d'aspiration dans du tampon phosphate (PBS) et de l'héparine permet de recueillir le liquide folliculaire et l'ovocyte entouré de son cumulus oophorus, constitué de cellules folliculaires. La ponction transvaginale sous guidage échographique est une technique peu invasive. Elle ne nécessite pas de préparation hormonale de la donneuse. Elle permet la répétition des collectes à une fréquence élevée (jusqu'à deux par semaine pendant 5 mois). Elle permet d'obtenir environ 5 ovocytes par collecte et environ 30 % de blastocystes transférables *in vitro*.

Le protocole canadien (fig. 6-8) illustre les progrès en OPU dans la superovulation, facilité par le développement en parallèle des autres biotechnologies tel que la maturation ovocytaire *in vitro* (MIV), FIV et le développement embryonnaire *in vitro* (DIV) jusqu'au stade J8, les blastocystes ainsi produits sont donc transplantables. L'OPU peut être faite dans les trois premiers mois de gestation des génisses ou des vaches. En pratique, elle est réalisée soit une fois par semaine avec des animaux superovulés, soit deux fois par semaine sans superovulation. Elle permet aussi d'obtenir des blastocystes à partir de femelles considérées comme infertiles ou n'ayant pas répondu à des traitements de superovulation.

## CHAPITRE VII:

### 7. LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE.

#### I. Introduction :

Le transfert d'embryon consiste à transplanter dans une femelle porteuse (appelée receveuse) un embryon issu d'une autre femelle (dite donneuse). En élevage, cette méthode de reproduction est utilisée pour augmenter la descendance d'une donneuse sélectionnée pour ses qualités génétiques, à laquelle on fait produire plusieurs embryons, qui seront portés chacun par une receveuse. Les recherches sur la transplantation d'embryon ont été initiées à l'INRA dans les années 60 et les premiers veaux issus de mère porteuse ont été obtenus en 1971. Chez les bovins, cette technologie a connu un développement rapide, cette extension du transfert d'embryons a nécessité la résolution de nombreux problèmes biologiques et techniques, notamment la mise au point de la congélation des embryons.

Cette maîtrise de la transplantation, de la conservation, puis de la culture in vitro des embryons a ouvert la voie à toute une série de manipulations, telles que le clonage et le sexage des embryons, ou le transfert de gènes (Heyman et al 1996).

#### II. Le concept :

La transplantation d'embryons est une méthode de reproduction qui consiste à faire naître par des vaches porteuses (receveuses) des veaux issus d'une même mère génétique, sélectionnée comme donneuse d'embryons, dans le but d'augmenter sa descendance. Chez les bovins, cette technologie est devenue familière à bon nombre d'éleveurs, qui l'utilisent désormais. Environ 30 000 transplantations d'embryons sont maintenant réalisées chaque année en France. Si l'on considère qu'il y a seulement une vingtaine d'années les veaux nés de transplantation embryonnaire se comptaient encore sur les doigts de la main (Chupin 1985).

#### III. Les différentes procédures du transfert d'embryons :

##### **1. La manipulation des embryons chez les bovins :**

Des études sur les embryons bovins manipulés dans les laboratoires ont montrées que les embryons sont affrontés inévitablement à des contact avec la verrerie, les boîtes à pétris, les paillettes en plastiques et autres objets de labos, donc l'exposition aux facteurs toxiques doit être toujours prise en considération. Par exemple, pour y remédier il est essentiel de fournir une aération adéquate aux paillettes après leur stérilisation pour enlever l'oxyde de l'éthylène « antimicrobien puissant ». Les autres chercheurs ont fait un rapport sur la protection et la sécurité des embryons par toute une gamme de produits employée habituellement sur l'opérations d'ET chez les vaches ; plusieurs articles font référence aux tubes en latex, silicone des sondes de Foley et aux pistons des seringues et dont ils parurent posséder la plus grande capacité pour induire des effets toxiques.

##### **2. La protection des embryons :**

Il y a plusieurs problèmes associés au transfert embryonnaire non - chirurgical chez la vache et qui peut influencer le taux de gestation ; parmi eux on citera qu'à cause de sa dimension microscopique, il est difficile de confirmer que l'embryon a été déposé dans la corne utérine et à son emplacement approprié pour son développement ultérieur. Bien que, dans un cadre de recherche, une paillette de transfert peut être inspectée après sa libération de son contenu pour s'assurer que l'embryon n'a pas été retenu, cette opération n'est pas nécessairement une preuve de transfert, car l'embryon pourrait se déplacer loin de la paroi utérine ou adhérer à l'extérieur de la paillette pendant son retrait de l'utérus puis du cervix.

##### **3. Le nombre embryons transférés :**

Il s'est avéré, il y a quelques années à Cambridge que le transfert chirurgical de 2 embryons plutôt qu'un seul produisait un taux gestation en générale, supérieur chez les vaches receveuses. En plus d'une autre

observation sur un taux élevé de gestation lors de l'utilisation de deux embryons versus le transfert d'un seul embryon (Gordon a utilisé des embryons congelés, montrant ainsi un taux élevé de gestation, similaire au transfert d'un demi embryon).

#### 4. La technique chirurgicale du transfert embryonnaire :

Des travaux prospectant l'ET ont confirmé l'excellent alibi de la technique chirurgicale. Une thèse sur la procédure médio ventrale étudiée à Cambridge a montré que l'opération médio ventrale en générale se faisait juste à la partie antérieure de l'utérus, alors on ramené la corne utérine ipsilatérale au corps jaune où une petite ponction était faite pour accéder à la lumière de la corne, la pipette est introduite puis l'embryon à transférer est déposé. Bien que la procédure médioventrale se faisait sur des génisses, il était clair que la procédure était d'usage clairement difficile en plus des frais élevés de la technique sur la vache, en plus elle n'est pas convenable aux laitières. Beaucoup d'adeptes de la méthode chirurgicale préfère l'approche par le flanc, avec une anesthésie locale (paravertébrale au niveau de la fosse sub-lombaire) et puis le transfert embryonnaire est fait au niveau de la corne utérine ipsilatérale ; seulement avant de pratiquer la chirurgie la localisation par palpation rectale du corps jaune décidera du côté où le transfert devrait être fait (le flanc droit ou gauche). En comparaison avec la procédure médio ventrale, l'approche par flanc a été reconnue comme être la méthode la plus efficace, pratique et rapide pour exécuter les transferts chirurgicaux, et ceci avec un minimum de matériels d'installations et aussi d'efforts.

Une des raisons de l'utilisation de la méthode chirurgicale est de donner à la receveuse et à l'embryon de grande chance de gestation. D'après Coultard (1991), si l'embryon a été congelé puis décongelé ou de classe 2, 10% d'amélioration dans le taux de gestation sont produits lors de l'approche chirurgicale au niveau du flanc, par comparaison avec les méthodes non chirurgicales.

#### 5. La technique non – chirurgicale du transfert embryonnaire :

La voie chirurgicale, est une intervention lourde nécessitant un bloc opératoire pour gros animaux et une équipe vétérinaire chevronnée. Des techniques de prélèvement d'embryons et de réimplantation relativement simples, utilisant les voies naturelles via le vagin et le col de l'utérus (cervix) étaient essentielles, afin de pouvoir intervenir directement dans les élevages. Une première approche, via la voie transvaginale, pour «court-circuiter» le passage du cervix, a permis de réduire considérablement les inconvénients de la chirurgie. En effet il était alors communément admis que le franchissement du col utérin chez la vache était impossible en dehors de la période des chaleurs, et que sa stimulation pouvait provoquer des contractions de l'utérus susceptibles de ré-expulser les embryons, une méthode entièrement non chirurgicale s'est imposée.

Bien que de nombreux instruments étaient conçus spécifiquement pour le transfert non chirurgical des embryons chez la vache, le pistolet de Cassou était l'un des candidats et du fait qu'il a amélioré l'IA, prouvant qu'il était la réponse à ce problème particulier. Depuis la mi 70 ; de ce fait, plusieurs variantes du pistolet standard d'insémination ont été vendus pour ET chez les vaches ; Coultard (1991) décrit sa procédure de transfert au Royaume Uni, où il a utilisé un pistolet d'insémination modifié avec une gaine spéciale doté de 2 voies et un axe métallique.

##### a) Les facteurs influençant le succès du transfert embryonnaire non chirurgical :

Il y a plusieurs facteurs maternels et environnementaux pouvant affecter les taux de gestation chez les vaches receveuses, après que la technique de transfert non chirurgicale soit faite (Sreenan et Diskin, 1987; Hasler, 1992). Avec des receveuses comme génisses, par exemple, il peut y avoir environ 10% de plus de difficulté, si ce n'est pas impossible, de faire l'ET via le cervix (Coultard, 1991). L'embryon doit être toujours transféré dans la corne utérine associée à l'ovaire ovarulatoire (corne ipsilatérale), ou les taux de gestation sont plus élevés que dans la corne controlatérale ; vraisemblablement parce que la reconnaissance maternelle de l'embryon est plus positive quand c'est dans la corne ipsilatérale. Au Japon, Cerbito et al. (1994) ont trouvé des certitudes, que le taux de progestérone et sa distribution au niveau de l'utérus sont dépendantes de l'emplacement et de la fonction lutéale du corps jaune; c'est peut-être du au facteur influençant la survie de l'embryon lors de la reconnaissance précoce. En France, les effets de la saison ont été enregistrés par Lonergan et al. (1995) avec une différence considérable entre le transfert d'été (52%) et celui fait en hiver (21%).

##### ▪ L'effet de la qualité des embryons :

C'est le seul parmi la plupart des facteurs, affectant de façon importante le succès du transfert, surtout démontré par une étude en Allemagne de Janowitz et al. (1994), qui ont fait une analyse portant sur 2478

transferts d'embryons frais et congelés. Un autre travail fait dans le même pays par Piturru (1994), et qui a enregistré des gestations estimées à 59% lorsque le transfert concerne des embryons frais chez la race Piedmont.

#### ▪ La compétence de l'opérateur :

Un facteur important, qui influencerait le taux possible de gestation; c'est la compétence et l'expérience de l'opérateur du transfert, concerne surtout la manière d'éviter de traumatiser l'endomètre. Une étude sur 6 ans par Park et al. (1991) ont montré qu'un programme ET peut être conduit par les propriétaires, mais seulement après une formation antérieure appropriée. Dans ce sens, on ne doit pas oublier, que le transfert est fait pendant un temps où l'environnement utérin est d'une façon très marquée différent de celui d'une vache en oestrus, par sa susceptibilité à l'infection et aux blessures. Dans certaines espèces (par exemple hamsters), il est connu que des taux bas de gestation après une ET, soient principalement dus aux traumatismes de l'endomètre et à la libération consécutive de la prostaglandine.

#### ▪ L'intérêt de l'asepsie :

Le succès du transfert non chirurgical dépend aussi du maintien d'une asepsie adéquate, pendant la déposition de l'embryon dans la corne utérine qui est beaucoup plus susceptible à une infection, en effet il faut qu'elle soit au niveau plus bas d'infection dans la semaine après l'oestrus, que au moment des chaleurs. Il y a plus de 40 ans passées ou des chercheurs de Cambridge, ont attiré l'attention sur le facteur d'infections utérines, qui pourraient s'installées aisément pendant la phase lutéale et durant le cycle oestral de la vache, mais qu'elles pourraient être contrôlées par une couverture antibiotique appropriée, lors du transfert embryonnaire cela veut dire aussi l'utilisation de certains antibiotiques : la pénicilline et la streptomycine dans les milieux de transfert.

## IV. La synchronisation donneuses – receveuses :

Il est considérable et évident par le cumul d'information pendant ces dernières années, sur l'importance de la synchronisation des stades du cycle entre donneuses et receveuses (fig. 7-1). La synchronisation exacte doit être le 1<sup>er</sup> objectif, mais les receveuses déphasées par  $\pm 1$  jour peuvent être jugées comme acceptables, bien que quelques réductions dans les taux de gestations sont attendues. Les vaches qui ne sont pas synchronisées par exemple : 2 jours de décalage, ne seront pas utilisées à cause des taux gestations réduits ; une réflexion particulière a été faite sur le facteur de multi-ovulation (superovulation) chez les brebis ayant des attitudes additionnelles à la désynchronisation et qui n'est pas retrouvée chez ceux ayant une seule ovulation. La même discussion peut bien s'appliquer sur les vaches superovulées ; des chercheurs ont aussi noté avec certitude que l'ovulation unilatérale chez les brebis provoquée de grande perte embryonnaires que chez des brebis ayant ovulé de façon bilatérale ; une possibilité était que les embryons ovins migrant à travers l'utérus pourraient être particulièrement sensible à la désynchronisation utérine, lors de leur rentrés vers la corne controlatéral.

### 1. Son importance :

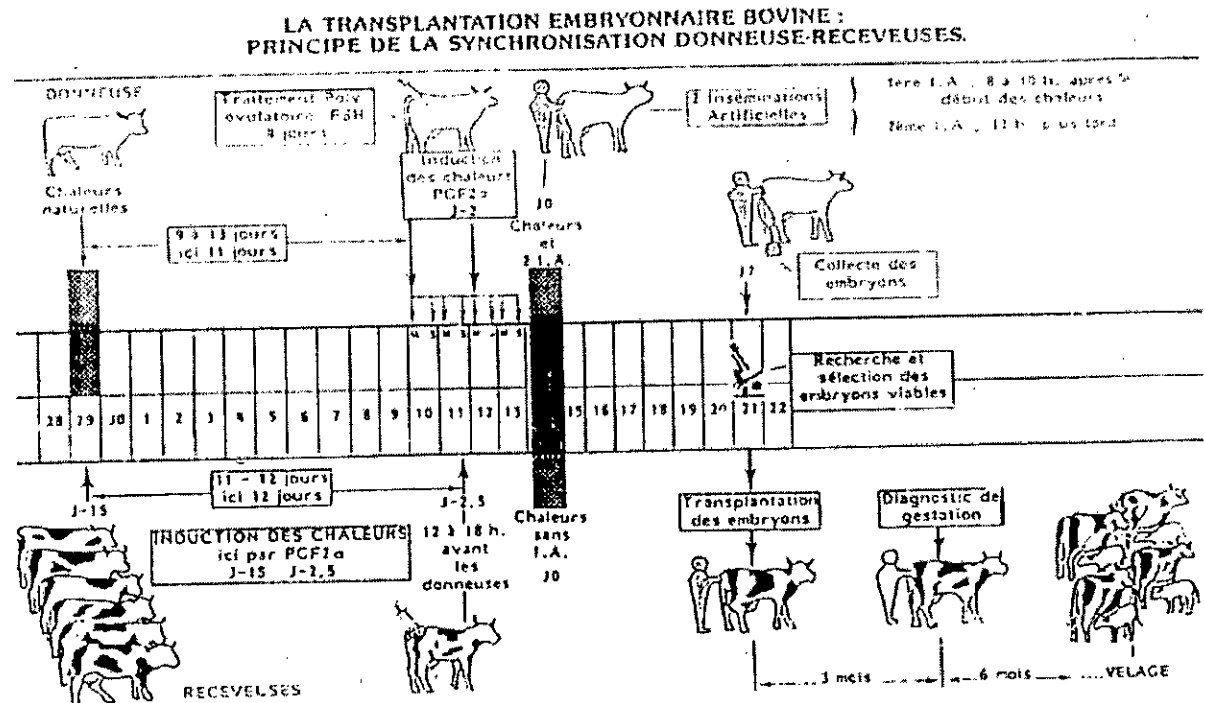
Des chercheurs à Cambridge, ont été parmi les premiers à montrer l'intérêt de la synchronisation exacte entre l'âge de l'embryon, et la phase du cycle de la receveuse, qui induirait des taux de gestation optimums avec un degré de variation toléré, entre la donneuse et la receveuse de  $\pm 1$  jour. Au début du transfert chez le bovin et jusqu'à ces dernières années, l'objectif étant toujours la synchronisation exacte (Hasler, 1992). La synchronisation doit être considérée comme essentiel parce que l'embryon et les tissus utérins maternels formeront un système de communication complexe qui impliquera aussi bien des sécrétions de l'embryon et de l'endomètre utérin, de telles sécrétions stimulerai et servirai de médiateur des changements précoce durant gestation chez la vache. En Allemagne, dans une analyse par Janowitz et al. (1994) sur 2478 transferts, ont conclu que les événements d'oestrus chez les receveuses sont déviées de -48, -24, 0, +24 ou +48h (le signe moins indique que les oestrus chez les receveuses étaient précédés par ceux des donneuses) le taux de gestation était de 23,8%, 52,2 %, 58,2 %, 49,5% et de 44%, respectivement.

### 2. La sélection et la gestion des receveuses :

Pour l'ET bovine, des génisses sont habituellement préférées pour ces opérations ; saines de tout les genres de problèmes consécutifs aux gestations antérieures, et en plus de tels animaux sont bon marché et plus facile acquérir que les vaches. Cependant, sur les vaches il y a un avantage évident, Coulthard (1991) en Grande Bretagne a enregistré environ 10% des génisses receveuses qui rendent difficiles le transferts par la voie cervicale (procédure de l'ET non chirurgicale). Au Danemark, Callesen et al. (1994) ont sélectionné des vaches laitières pouvant être de convenable receveuses d'embryons, bien qu'elles aient un taux de la gestation inférieur,

mais lorsque le veau survivait et ayant été pris en considération, le taux final de succès était le même que chez les génisses.

Figure 7-1 : Synchronisation donneuses-receveuses pour le transfert embryonnaire (Soltner, 1993).



### 3. Les niveaux des hormones chez les receveuses :

La progestérone sécrétée par le corps jaune, est le stéroïde majeur qui influencerait le stade physiologique de l'utérus chez la receveuse ; cependant, le rapport entre le niveau sanguin de progestérone et la survie embryonnaire, après un transfert embryonnaire dans une vache, n'a pas bien été résolu. Il y a quelque vérité, qu'un niveau bas de progestérone peut induire un très fort mécanisme acquis prédisposant quelques vaches à une perte précoce d'embryon (Lamming et Mann, 1993). Donc, il peut être parfois utile de chercher à s'assurer que les receveuses sont au stade prévu du cycle et que la progestérone est sécrétée en quantité prévue durant cette période.

### 4. Les races indigènes, receveuses d'embryons importés :

Il y a actuellement beaucoup d'exemples de race indigène, utilisée comme receveuses, pour des embryons importés de pays étrangers, il a été estimé que dans l'année 2005, la population bovine de race Frisonne espagnole sera remplacée par la Holstein; par l'ET chez la vache aussi bien que l'IA, jouant un rôle significatif dans ce type de changements radicaux.

Par ailleurs, ils pourront être des moyens puissants pour l'introduction de races grandes productrices de lait par exemple, dans un pays où les races indigènes sont de faibles productrices ; A Cuba, on a conclu que l'utilisation de la vache Zébu comme receveuses d'embryons de races européens, fourniraient de grandes opportunités pour le transfert embryonnaire sous des conditions tropicales. À l'Ouganda, Cumming et al. (1994) ont rapporté le transfert d'embryons importés Holstein sur des vaches receveuses synchronisées, de race indigènes.

## V. L'intérêt du transfert embryonnaire :

Le commerce des animaux domestiques entre continents se pratique depuis plus de 100 ans et continue d'être très présent dans les activités internationales; le transfert d'embryons a toutefois permis une avenue plus pratique pour l'exportation ou l'importation d'espèces désirées. Le principal avantage vient du fait que c'est le moyen le plus sécuritaire du point de vue sanitaire pour lutter contre l'introduction de nouvelles maladies dans un pays souhaitant tout de même l'introduction de meilleures lignées génétiques ou de nouvelles espèces animales. Cet aspect est très important pour le Canada qui, grâce au transfert d'embryons, conserve un

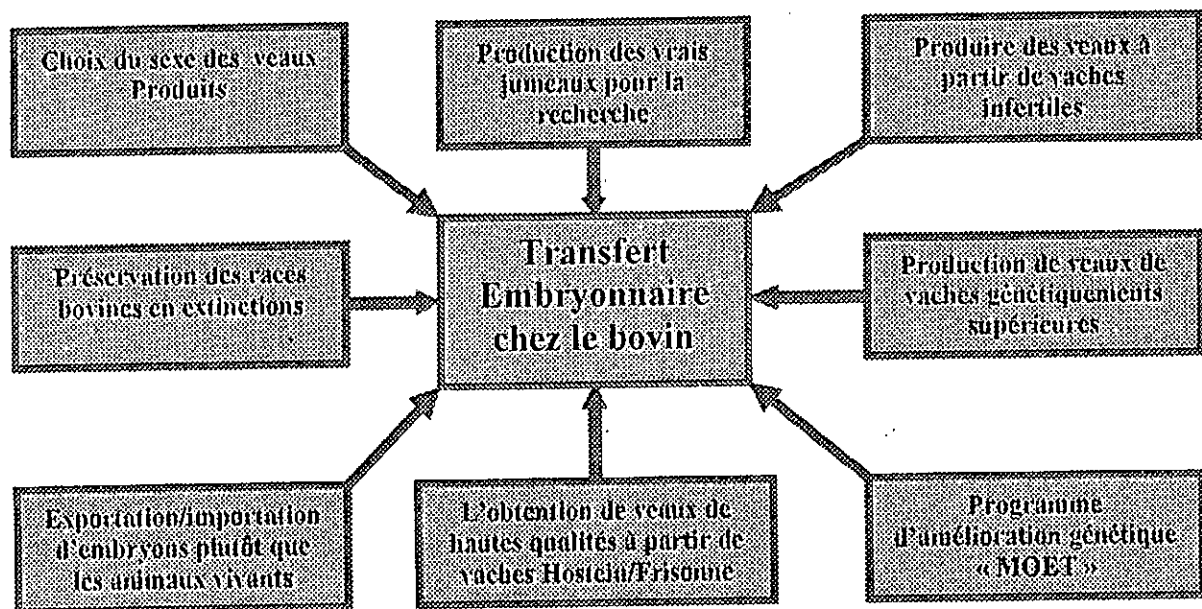
bas niveau de maladies contagieuses tout en permettant l'introduction de nouvelles valeurs génétiques commercialisables.

Les avantages sont multiples (schéma 9-1). Selon plusieurs recherches et l'expérience vécue par les éleveurs, les receveuses n'ont aucun effet génétique sur le veau résultant; ainsi, le transfert d'embryons est un excellent moyen de tirer avantage d'une femelle à haute valeur génétique, accouplée à un mâle qui engendre lui aussi des caractéristiques recherchées chez une race en particulier. Un autre avantage est certainement la survie d'une race en permettant la production d'embryons, qui sont transférés dans des femelles de race différente, mais de même espèce ou d'espèces compatibles.

Irrémédiablement, des tares soupçonnées, généralement héréditaires peuvent être identifiées plus rapidement chez des parents en produisant un certain nombre de sujets issus d'un croisement donné; si la tare est identifiée chez les rejets, le parent responsable sera alors éliminé afin de ne pas propager cette tare dans la race, évitant ainsi des pertes économiques importantes pour les éleveurs de race.

Schéma 7-1

D'après : Gordon, 1996



## 1. Aspect sanitaire du TE :

En raison de la diffusion mondiale de la technologie de TE, il est de la plus haute importance de considérer les risques de contaminations des animaux receveurs par les embryons transplantés. D'après une étude synthétique de la Société internationale de TE, on peut considérer que la « capacité des embryons à transmettre des maladies infectieuses est considérablement moindre que la probabilité de transmission par la semence ou par les animaux vivants ». Encore faut-il respecter les règles sanitaires de lavages des embryons : lavages, utilisation d'embryons dont leur zone pellucide intacte et exempte de débris cellulaires, ajout d'antibiotiques aux milieux de collecte, de lavage et de transport des embryons, transplantation utérine dans de bonnes conditions sanitaires. Un nombre suffisant de transferts a été effectué avec des embryons de doinitaises infectées par le virus de la leucose bovine, de la rhinotrachéite infectieuse bovine et de la maladie des muqueuses, pour affirmer que ces virus ne sont pas transmis par les embryons, à condition qu'ils soient manipulés correctement (Scriban, 1999).

## 2. Rénovation des schémas de sélection :

La transplantation embryonnaire mise au point chez les bovins depuis la fin des années 70 a créé incontestablement, depuis le début des années 1980, des opportunités nouvelles pour la rénovation des schémas de sélection. En effet, malgré les handicaps dus au nombre relativement faible d'embryons utilisables par traitement, et malgré le fait qu'une partie des femelles donneuses ne produit aucun embryon; la technique contribue à augmenter de plus de 70 % la prolificité des femelles qui répondent le mieux au traitement. Elle permet aussi de réduire notablement l'intervalle de génération puisque les collectes précoces d'embryons sont

possibles sur des génisses de 15 mois ; alors qu'avec la reproduction naturelle, une vache produit en moyenne 3 veaux à l'âge de 6 ans, ce même résultat peut être obtenu dès l'âge de 2 ans avec la transplantation (Colleau et al., 1998).

La transplantation embryonnaire peut donc être mise à profit pour intensifier la sélection des mères des taureaux d'insémination. En effet, le rajeunissement des mères permet de tirer parti plus rapidement du meilleur niveau génétique moyen des jeunes générations. L'amélioration de la prolificité permet de sélectionner les mères plus intensément pour assurer les besoins de renouvellement. Au total, ces deux facteurs contribuent à augmenter le progrès génétique annuel de l'ordre de 20 à 30 % pour un critère comme la production laitière (Nicholas et Smith 1983, Nicholas 1996) et d'une proportion encore supérieure en ce qui concerne les programmes de sélection des bovins allaitants.

Nicholas et Smith (1983) ont proposé d'utiliser la transplantation embryonnaire en apportant des modifications aux schémas de sélection classiques : sélection des reproducteurs dans des troupeaux spécialisés et sélection des taureaux à l'âge de 4 ans et non plus de 6 ans, à partir des performances de leurs collatérales (demi-sœurs et pleines sœurs). En fait, ceci n'est justifié que si le contrôle de performances en ferme est peu fiable ou s'il existe un traitement préférentiel des femelles (par exemple utilisation non déclarée d'hormones) ce qui est encore peu fréquent dans les pays développés (Lohuis 1995 ; Colleau et al., 1998).

### a) Schémas de sélection génétique MOET :

Toutefois, ce n'est pas tant le nombre de transplantations effectuées qui donne aujourd'hui son importance à cette technologie, que la place qu'elle occupe désormais dans la filière de la sélection bovine : près de 95 % des taureaux laitiers actuellement mis en testage sont en effet issus d'embryons transplantés (le plus souvent congelés). Ce chiffre illustre bien l'impact de cette biotechnologie dans la conduite des programmes de sélection. Nicholas (1979) est le premier à avancer le concept de l'utilisation du MOET en combinaison avec l'IA, comme une nouvelle méthode de reproduction pour la vache laitière, aussi il a été montré, que le MOET utilisé dans la technologie du ET, fournissent un plus grand taux génétique que celui permis par le progeny test. Les principaux éléments du schéma proposé par la superovulation et l'ET, sont les génisses d'un troupeau de lactation, avant que leur première lactation ne commence (méthode juvénile), des modifications de Nicholas et Smith (1983) ont permis la même chose pour les génisses qui ont complété leur 1<sup>er</sup> lactation (méthode adulte).

Ces schémas de sélection génétique, basés sur l'ascendance, ont été proposés en France par Colleau : il s'agit de créer des unités « noyaux de sélection » en élevage fermé, capables d'être des sources d'amélioration génétique, au niveau national. Des progrès génétiques rapides peuvent être ainsi réalisés grâce à la superovulation des femelles donneuses à tester et la transplantation de leurs ovocytes. Ces vaches donneuses sont sélectionnées sur leur ascendance. On choisit ainsi les meilleures reproductrices et on diffuse leurs embryons. On observe un progrès génétique plus rapide avec ces schémas de sélection utilisant la superovulation et le TE qu'avec les méthodes conventionnelles de testage sur descendance. L'intervalle de génération passe d'environ 6 ans à 4 et 3 ans, voire 2 ans, selon les divers systèmes MOET (Scriban, 1999).

### b) Les gains génétiques du MOET :

La technologie MOET en reproduction est actuellement utilisée, ainsi elle est déterminée par la formation de troupeaux centraux d'élevage (troupeaux noyaux) ; avec une extensive superovulation des donneuses sélectionnées aussi bien que des génisses que de jeunes vaches (Smith, 1990). De tels schémas de reproductions dans les élevages seront vraisemblablement supérieures aux programmes traditionnels d'insémination artificielle, en augmentant le taux d'amélioration génétique, ceci est permis par la l'intensité élevée de sélection parmi les femelles, et par le rétrécissement de l'intervalle des générations. Selon différents auteurs le taux de gain génétique peut s'élever de 30% à 50% avec l'utilisation du MOET chez les femelles laitières d'un an, pour la production de jeunes taureaux et potentiellement des taureaux issus de transfert (Gordon, 1996).

Des expériences opérées sur le MOET dans les troupeaux Danois de vaches laitières pendant une période de 6 ans, avaient été décrites ; autre utilisation du MOET a été dirigée en Australie, par Evans (1991). Beaucoup d'auteurs ont décrit l'utilisation du MOET sur l'élite du troupeau noyaux qui a aussi permis substantiellement, une augmentation du taux de gain génétique chez les vaches à viandes ; le MOET est actuellement utilisé pour accélérer la génétique dans l'élevage Simmental au collège agronomique d'Écosse à Aberdeen, (Tregaskes et al., 1994).



Au Canada Lohuis (1995) a décrit les avantages des technologies de manipulations des embryons bovins dans les programmes d'améliorations génétiques ; une simulation par ordinateur des programmes de MOET a prédit des taux d'améliorations génétiques entre 8 – 9,5%, plus élevés que ceux des programmes courant du progeny test. Les avantages de la sélection de jeunes aussi bien que les taureaux adultes et les vaches de stocke d'élevage, est prédit à 12%, quand la FIV est utilisée au même temps, sur des embryons récoltés sur des veaux de 1 – 5 mois, le taux d'amélioration génétique est de 22% d'augmentation, d'après ces mêmes prédictions. (Gordon, 1996).

### 3. Aspect économique du TE :

Le transfert d'embryons, qui s'est d'abord développé par transposition des méthodes chirurgicales proposées par la recherche vétérinaire, n'est véritablement devenu une pratique d'élevage qu'avec la mise au point d'une méthode de transplantation adaptée de l'insémination artificielle (IA), consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus, par voie vaginale. Avec cette approche, en moyenne 60 % des femelles deviennent gestantes après transfert d'un embryon et 56 % mettent bas, un rendement identique à celui de l'insémination artificielle (52 % après une IA, Boichard et Manfredi 1995).

Le nombre de transplantations d'embryons bovins connaît ces dernières années une progression régulière en Europe et en France, mais ce nombre reste très faible par rapport à celui des inséminations artificielles (23 millions en Europe, dont 5 millions en France en 1995 ; Malafosse 1995). La transplantation d'embryons est maintenant étroitement associée à la congélation, le plus souvent au stade blastocystes, par des méthodes compatibles avec une décongélation réalisée juste avant la transplantation.

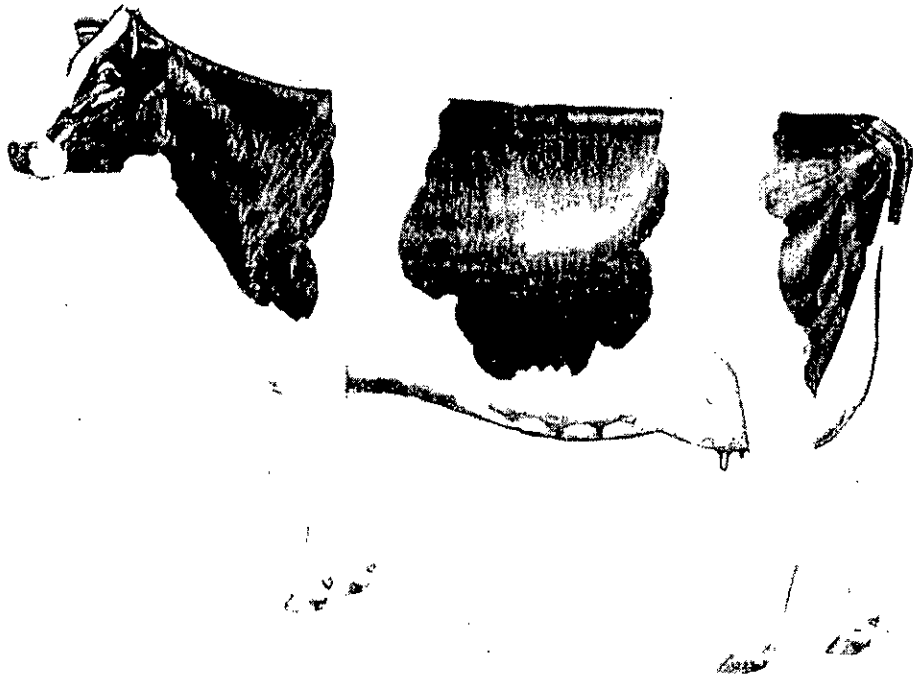
Le typage génétique des embryons avant leur transplantation peut être réalisé en prélevant par micromanipulation 1 à 4 cellules sur des embryons au stade morula ou jeune blastocyste (J6 et J7). Le « sexage » a pu devenir une réalité grâce à l'isolement de sondes génomiques spécifiques du chromosome Y dont la présence est détectée sur le génome des cellules isolées d'embryons mâles. Le diagnostic du sexe peut être porté pour 95% des embryons biopsies et son exactitude est voisine de 100%. Deux facteurs limitent aujourd'hui l'efficacité de la transplantation : le nombre relativement faible d'embryons que l'on obtient après un traitement hormonal de superovulation et la variabilité de production entre femelles traitées.

## Conclusions :

Les biotechnologies de la reproduction représentent un enjeu économique majeur pour les progrès de la biologie et de la médecine, parce qu'elles sont à la base des technologies les plus modernes du vivant. Elles touchent l'Homme dans son existence, dans son Evolution. Elles sont au cœur de la Vie et des mécanismes les plus complexes de régulation, les applications les plus prometteuses dépendent souvent à la fois de nouveaux développements des biotechnologies anciennes et des développements les plus récents. Elles s'appuient sur des avancées scientifiques fondamentales qui repoussent continuellement les limites de la connaissance. Elles reposent aussi sur quantité de petits bricolages qui permettent ou non le décollage de toute une série d'applications. Les biotechnologies de la reproduction sont au carrefour de la biologie de la reproduction, de la biologie moléculaire, de l'immunologie, de l'agronomie, de la médecine vétérinaire et humaine. Les questionnements philosophiques actuels au sujet du clonage ou de la transgénèse, par exemple, sont le recommencement de ceux déjà rencontrés en 1939 ou 1946 sur l'insémination et qui avaient déclenché des débats médiatiques passionnants.

Les progrès de la maîtrise du cycle sexuel ont ouvert la voie à des bouleversements socioéconomiques considérables. Les points de départ étaient pourtant la découverte du microscope, du spermatozoïde, la description des cycles sexuels de la lapine et de la rate. La congélation du sperme a permis le développement de l'insémination artificielle après la guerre mondiale de 39 - 45. Elle a autorisé un progrès génétique important en élevage et notamment en élevage bovin, permettant par la même de répondre à des besoins alimentaires considérables de l'après guerre. Ces techniques d'IA se sont développées depuis dans toutes les espèces en fonction des besoins économiques du moment. La technologie a été maîtrisée dans l'espèce animale et humaine aussi pour résoudre des problèmes de fertilité.

# Partie Expérimentale



## **I. Introduction :**

Au cours de la vie reproductrice d'une femelle, il existe un gaspillage considérable entre la réserve de départ et le nombre d'œufs émis. La superovulation permet de réduire fortement cet écart et ainsi d'augmenter remarquablement la production d'embryons au cours de chaque cycle de récolte. Actuellement la plupart des étapes du transfert embryonnaire sont bien mises au point. Toutefois, l'induction de la polyovulation et le rendement en embryons viables ne sont pas complètement maîtrisés (Amstrong, 1993; Mapletoft et al, 1994), car les réponses aux traitements sont variables et peu prédictibles et deviennent dès lors les principaux facteurs limitants les programmes de transfert embryonnaire.

La maîtrise de la folliculogénèse pourrait représenter une étape capitale pour la réussite du transfert embryonnaire. Ainsi de nouvelles méthodes rationnelles sur le contrôle de la croissance folliculaire (échotomographie, ponction du follicule dominant, traitements hormonaux) sont actuellement appliquées lors des traitements de superovulation afin d'optimiser la production d'embryons et d'atteindre des réponses prévisibles. La phase lutéale représente la phase pratique d'intervention des traitements de superovulation, étant donné que la date de la venue en chaleurs pourrait être maîtrisée par l'injection de prostaglandine.

Le test des hormones gonadotropes sur la moitié de la phase lutéale (J9 - J13) n'a pas apporté de différence significative sur le taux d'ovulation des vaches. Il est également possible d'intervenir sur cycle maîtrisé par les progestagènes, où des résultats similaires, en comparaison à des traitements de superovulation effectués sur cycle synchronisé par la PGF $2\alpha$  ont été obtenus. Une diminution ou un accroissement (Mapletoft et al, 1994) dans la production d'embryon étaient également rapportées en comparaison avec des lots de contrôles.

## **II. Objectif du travail :**

La mise en place de traitements de superovulation basés, sur l'utilisation d'hormones gonadotropes FSH sur cycle maîtrisé par les progestagènes (PRID ND) sur des vaches.

L'étude consiste en la collecte d'un certain nombre d'évènements physiologiques et leur évaluation :

- **Délais d'apparition de l'œstrus.**
- **Quantification des chaleurs.**
- **Evaluation des structures ovariennes.**
- **Comptage et classification des embryons.**

### **III. Matériels et méthodes :**

#### **1. Cadre de l'étude :**

L'étude a été réalisée grâce à une parfaite coopération d'une ferme privée dénommée « EAI Tergaoui » et l'institut des sciences vétérinaires de l'université de Blida, elle se situe à environ 15 Km de l'université, dans la commune de Beni-Mered, wilaya de Blida, celle-ci est à 40 Km de la mer et à quelques kilomètres (environ 4 à 6 Km) de l'aéroport militaire de Boufarik.

Cette ferme possède un effectif de 80 têtes majoritairement des vaches laitières, les vaches sont mises en stabulation semi entravée; les animaux étaient logés dans des bâtiments battis en dur (bétons), le sol cimenté, les mangeoires sont construits à une hauteur d'environ 1m du sol, les abreuvoirs sont automatiques.

Après, la récolte des embryons, les liquides des récoltes sont transportés jusqu'à l'université de Blida, exactement au laboratoire de biotechnologie de l'institut des sciences vétérinaires, celui-ci est disposé de microscopes et d'un micromanipulateur en plus du nécessaire de congélation des embryons.

#### **2. Période expérimentale :**

Noter travail a commencé au début de l'année 2001, ceci par le contacte avec différents laboratoires pharmaceutiques spécialisés dans la production des gonadotrophines utilisées pour la superovulation des bovins, ainsi le laboratoire Calier d'Espagne nous a répondu favorablement par son don gracieux de son produit PLUSET (gonadotrophines porcines), après une année nous avons reçu le produit après de longue transaction bureaucratique, en même temps on s'est engagé dans une prospection des site expérimentaux sur des fermes privées.

Après la réception de PLUSET ; nous avons commencé notre protocole expérimental qui s'est étalé sur 3 mois, du mois de mars au mois de mai 2002, cela durant la saison printanière ou, la température ambiante pendant cette période était un peu au delà de la température saisonnière normale, entre 20 et 26°C le jour alors que les nuits variait entre 15 et 18°C, en plus de la sécheresse qui s'est répercutée sur l'alimentation et donc, l'herbe arrivait à maturité de façon précoce.

#### **3. Animaux et lots :**

Tous les animaux de la ferme avaient un embonpoint relativement moyen au début de l'étude, toutefois leur embonpoint ayant relativement chuté vers la fin de l'étude, suite aux perturbations notées dans les rations alimentaires.

La ferme regroupe des vaches dans leur majorité laitières, pie noire en deuxième position pie rouge, dans la majorité sont croisés de plus on a noté la présence de 3 vaches de races brunes dans l'une d'elle est croisée.

Les animaux sont maintenus en semi stabulation, sauf pour les vaches des lots choisis pour l'étude, qui ont été exceptionnellement maintenu en stabulation complète pour des raisons de commodité expérimentale. Les animaux sont élevés dans de grands bâtiments en béton d'une hauteur de 8 mètres, la température était plus ou moins stable à l'intérieur grâce à une bonne aération.

Pendant, la période du traitement les vaches étaient nourries à l'herbe verte (période printanière), l'herbe était prélevée dans les champs de la ferme; cependant il n'y a pas eu de supplément alimentaire avant l'étude, ni un complément (ration, concentré, etc.)

Le travail a débuté le 4 avril 2002, et comprenait dans ces débuts la sélection des animaux admissibles dans les lots à traiter, 14 vaches ont été sélectionnées d'après des critères extérieurs :

1. Anamnèse sur chaque vache.
2. L'état d'embonpoint.
3. L'état de santé.

Puis on a procédé à l'examen spécial de l'appareil génitale par

- Exploration vaginale en vu de détecter d'éventuelles sécrétions ou lésions pathologiques.
- Exploration rectale et une bonne palpation des organes génitaux internes (utérus, cornes, oviducte et l'activité des deux ovaires).

#### **4. La sélection des donneuses :**

Le travail préliminaire consistait en la sélection des donneuses, qui seront sujettes au traitement gonadotrope pour la superovulation, le traitement de sélection s'est fait sur la base de plusieurs critères :

1. Les animaux étaient en parfait embonpoint, ni trop gras, ni maigres, ces appréciations se sont faites selon les règles du code chair.
2. N'ayant pas eu des antécédents ou problèmes gynécologiques, c'est pour cela qu'on s'est penché sur des génisses et des primipares.
3. Ayant des ovaires parfaitement fonctionnels, apprécier par la palpation des deux ovaires (tab. 6)
4. Pour les primipares ; une période de repos post-partum entre 50 – 70 jours et/ou supérieur 110 jours (Hockstra 1989).

Après, avoir choisi les donneuses d'embryons et aussi après avoir déterminé les 4 lots, on a commencé à administrer par voie parentérale des suppléments vitaminiques, pour éliminer d'éventuelles possibilités et risques de carence (Shaw et al., 1994).

**Tableau 6 :** Résultats de la palpation ovarienne des vaches présélectionnées.

<i>C. Chair</i>	<i>Race</i>	<i>Matricule</i>	<i>Parité</i>	<i>Ovaire</i>	
				<i>Droit</i>	<i>Gauche</i>
3	Brune	00006	Génisse	-	Follicules
2,5 - 3	P R	20002	Génisse	-	CJ
2,5	P N	00008	Génisse	-	Follicules
2,5	P N	96600	Génisse	Follicules	-
2 - 2,5	P N	092022/98005	Génisse	-	Follicules
2,5	P N	96300	Génisse	-	Follicules
2 - 2,5	P N	260479/00032	Génisse	-	CJ+Follicules
2,5 - 3	P N	3251/35	Primipare	-	CJ
2 - 2,5	P N	4501/97007	Primipare	CJ	-
3 - 3,5	P R	99021/200	Primipare	-	Follicules
2,5 - 3	P N	99008	Primipare	Follicules	CJ
2,5 - 3	Brune	99015	Primipare	Follicules	-
2,5	P N	96001	Primipare	-	CJ
2 - 2,5	P N	7940/95000	Primipare	-	CJ
2 - 2,5	P N	98001	Primipare	-	Follicules
2 - 2,5	P N	96001	Primipare	-	CJ
2 - 2,5	P R	3910	Primipare	Follicules	CJ
2,5 - 3	P R	99011	Primipare	-	Follicules

Les animaux présélectionnés sont les suivants :

<i>Code chaire</i>	<i>Robe</i>	<i>Matricule</i>	<i>Parité</i>
3	Brune	00006	Génisse
2,5 - 3	Pie Rouge	20002	Génisse
2,5	Pie Noire	00008	Génisse
2,5	Pie Noire	96600	Génisse
2 - 2,5	Pie Noire	092022/98005	Génisse
2,5	Pie Noire	96300	Génisse
2 - 2,5	Pie Noire	260479/00032	Génisse
2,5 - 3	Pie Noire	3251/35	Primipare
2 - 2,5	Pie Noire	4501/97007	Primipare
3 - 3,5	Pie Rouge	99021/200	Primipare
2,5 - 3	Pie Noire	99008	Primipare
2,5 - 3	Brune	99015	Primipare
2,5	Pie Noire	96001	Primipare
2 - 2,5	Pie Noire	7940/95000	Primipare
2 - 2,5	Pie Noire	98001	Primipare
2 - 2,5	Pie Noire	96001	Primipare
2 - 2,5	Pie Rouge	3910	Primipare
2,5 - 3	Pie Rouge	99011	Primipare



## 5. Formation des lots :

Une deuxième et une dernière sélection a été réalisé, celle-ci a permis de former des lots expérimentaux, ces lots ont été au nombre de 4 ; chacun des 4 lots comportait 3 vaches, ces lots sont décrits comme suit :

- Le premier lot :

Code chaire	Race	1 <sup>er</sup> lot		
		Matricule	Numéro	Parité
2,5	Pie Noire	96600	1	Génisse
2,5 – 3	Pie Rouge	20002/00021	2	Génisse
2 – 2,5	Pie Noire	092022/98005	3	Génisse

- Le deuxième lot :

Code chaire	Race	2 <sup>ème</sup> lot		
		Matricule	Numéro	Parité
2,5	Pie Noire	96300	1	Génisse
2 – 2,5	Pie Noire	260479/00032	2	Génisse
2,5	Pie Noire	00008	3	Génisse

▪ **Le troisième lot :**

Code chaire	Race	3 <sup>ème</sup> lot		
		Matricule	Numéro	Parité
2,5 – 3	Brune	99015	1	Primipare
2,5 – 3	Pie Noire	99008	2	Primipare
2,5 – 3	Pie Noire	3251/35	3	Primipare

▪ **Le quatrième lot :**

Code chaire	Race	4 <sup>ème</sup> lot		
		Matricule	Numéro	Parité
3	Brune	00006	1	Génisse
3 – 3,5	Pie Rouge	99021	2	Primipare
2,5 – 3	Pie Rouge	99011	3	Primipare

**6. Le protocole expérimental :**

**a) Synchronisation et la superovulation :**

Après avoir choisi notre échantillon de 12 vaches pour l'expérimentation, on a formé des lots de donneuses (4 lots de 3 vaches chacuns) ; puis nous avons commencé à instaurer notre protocole expérimental de superovulation ; en effet nous avons opté pour un traitement superovulatoire sur cycle maîtrisé en d'autres termes, nous avons utilisé une synchronisation par les progestagènes (Bo et al, 1996 ; Picard-Hagen et al., 1996) sous forme de spirales. En effet, on a utilisé des spirales de progestérone ; PRID® (Sanofi Santé Nutrition Animale, France) qui est un dispositif en acier inoxydable, en forme de spirale, recouvert d'un élastomère en silicone inerte avec une capsule de gélatine contenant 10 mg de benzoate d'œstradiol, 1,55 g de progestérone est uniformément réparti dans l'élastomère.

Après introduction, l'hormone est libérée selon un taux prédéterminé, celui-ci est déposé par la voie vaginale grâce à un applicateur en plastique, après que les organes génitaux externes (vulve et vestibule) ont été lavés au préalable puis séchés. Le pistolet désinfecté au permanganate de potassium, et lubrifié avec de la vaseline, il est chargé avec une spirale de PRID®, sur l'animal bien contentonné on introduit délicatement le dispositif dans le vagin après écartement des lèvres vulvaires et une inclinaison de 45°C du pistolet (pour éviter de léser par accident le méat urinaire).

Le pistolet est ensuite redressé en ligne droite après le passage du quart de sa longueur celui-ci est poussé par des mouvements de rotation de chaque côté, vers le fond du vagin où finalement sera déposée la spirale, ceci grâce à une pression sur le piston de l'applicateur, le fil de retrait de la spirale, toujours maintenu entre les doigts lors de l'introduction est laissé suspendu entre les lèvres vulvaires. La progestérone ainsi libérée est absorbée au travers de la paroi vaginale (muqueuse vaginale), permettant de maintenir le taux de progestérone sérique à des niveaux lutéiniques pendant la période de traitement, la synchronisation des 4 lots c'est fait en tandem avec 1 jour de décalage pour chaque lot, ceci pour des raisons de commodité lors de l'opération de récolte des embryons, de ce fait on a procédé comme suit :

1. Le 1<sup>er</sup> lot de 3 vaches a été traité avec le PRID® dans la matinée du 16 avril 2002, pour 10 jours (short-term, traitement : court terme) (Picard-Hagen et al., 1996).
2. Le 2<sup>ème</sup> lot est traité 24h après le 1<sup>er</sup> lot, soit le 17 avril.
3. Le 3<sup>ème</sup> lot a été traité 2 jours après le 1<sup>er</sup> lot et 1 jour après le 2<sup>ème</sup> le 18 avril.
4. Quant au 4<sup>ème</sup> lot il a été traité à 1 jour après le 3<sup>ème</sup> lot, le 19 avril.

## 7. Le programme superovulatoire :

Après la pose du PRID® pendant 8 jours, on a commencé le protocole thérapeutique de la superovulation, celui-ci consiste en un protocole très précis d'injection d'hormones gonadotrophiques (fig. 0-1). Pour cela, on a employé une association préparée d'hormones gonadotrophines purifiées à partir d'hypophyses porcines, cette préparation nous a été attribuée par son fabricant au travers d'un don, cette association est formée par deux importants principes actifs de nature glycoprotéique ceux sont la FSHp (follicle stimulating hormone, d'origine porcine) et la LHp (Luteinizing stimulating hormone d'origine porcine) qui a fait objet de recherche auparavant (staigmiller et al., 1992). Le mélange est commercialisé sous le nom de PLUSET® (Laboratorios Calier, S.A., Espagne), celui-ci se présente en 3 flacons, 2 d'entre eux contiennent l'association FSHp/LHp sous forme lyophilisée et le dernier flacon contient 20 ml de solvant : solution physiologique apyrogène.

Le produit PLUSET®, est préparé en mélangeant les 2 flacons dans les 20 ml du solvant ce qui donnerait une concentration de 1000 UI de FSHp et de 1000 UI de LHp pour un rapport FSH/LH égal à 1. La solution préparée est mise au frais à une température de 2°C – 8°C (comme c'est préconisé par la firme) ceci grâce à une glacière contenant des piles de glace ; celle-ci est transportée à la ferme pour démarrer le protocole superovulatoire selon un timing très précis :

▪ **Le premier lot :**

Le 1<sup>er</sup> lot, a reçu sa 1<sup>ère</sup> dose de PLUSET® le mercredi 24 avril 2002, ce qui correspond au 8<sup>ème</sup> jour de l'instauration du traitement progestagène. En effet, on lui a administré 4 ml de solution FSHp/LHp par voie intramusculaire IM (au niveau de l'encolure de l'animal) à 8 AM, le rythme des injections se faisait selon la modalité de 2 injections de PLUSET® par jour avec un intervalle de 12 heures entre les injections et selon des doses décroissantes pendant les 4 jours de traitement superovulatoire. Sauf que lors du 3<sup>ème</sup> jour de traitement superovulatoire qui concorde avec le 10<sup>ème</sup> jour du dépôt du PRID®, on a procédé durant la matinée, au retrait des spirale progestatives en plus d'une injection de 2 ml de l'analogue synthétique de la PGF2 $\alpha$  soit 15mg de Luprostiol (PROSOLVIN®, INTERVET SA, Pays Bas) en IM. Le timing précis de ce traitement s'est fait comme suit :

**Tableau 7:** Le programme superovulatoire du 1<sup>er</sup> lot.

Jours	Modalité de la superovulation du 1 <sup>er</sup> lot
<b>Mercredi 24.04.2002</b>	
8 Heure AM	4 ml FSHp/LHp (200 UI FSHp/ 200 UI LHp)
8 Heure PM	4 ml FSHp/LHp (200 UI FSHp/ 200 UI LHp)
<b>Judi 25.04.2002</b>	
8 Heure AM	3 ml FSHp/LHp (150 UI FSHp/ 150 UI LHp)
8 Heure PM	3 ml FSHp/LHp (150 UI FSHp/ 150 UI LHp)
<b>Vendredi 26.04.2002</b>	
	Retrait le matin du PRID® +2 ml (15mg) PROSOLVIN® en IM
8 Heure AM	2 ml FSHp/LHp (100 UI FSHp/ 100 UI LHp)
8 Heure PM	2 ml FSHp/LHp (100 UI FSHp/ 100 UI LHp)
<b>Samedi 27.04.2002</b>	
8 Heure AM	1 ml FSHp/LHp (50 UI FSHp/ 50 UI LHp)
8 Heure PM	1 ml FSHp/LHp (50 UI FSHp/ 50 UI LHp)
<b>Dimanche 28.04.2002</b>	
8 Heure AM	--
8 Heure PM	IA
<b>Lundi 29.04.2002</b>	
8 Heure AM	IA
8 Heure PM	--
<b>Dimanche 05.05.2002</b>	Collecte d'embryons le jour 7 après l'oestrus.



▪ **Le troisième lot :**

Idem au lot précédent seulement avec un décalage de 48 heures par rapport au 1<sup>er</sup> lot.

**Tableau 9:** Le programme superovulatoire du 3<sup>ème</sup> lot.

<b>Jours</b>	<b>Modalité de la superovulation du 3<sup>ème</sup> lot</b>
<b>Vendredi 26.04.2002</b>	
8 Heure AM	4 ml FSHp/LHp (200 UI FSHp/ 200 UI LHp)
8 Heure PM	4 ml FSHp/LHp (200 UI FSHp/ 200 UI LHp)
<b>Samedi 27.04.2002</b>	
8 Heure AM	3 ml FSHp/LHp (150 UI FSHp/ 150 UI LHp)
8 Heure PM	3 ml FSHp/LHp (150 UI FSHp/ 150 UI LHp)
<b>Dimanche 28.04.2002</b>	
	Retrait le matin du PRID® +2 ml (15mg) PROSOLVIN® en IM
8 Heure AM	2 ml FSHp/LHp (100 UI FSHp/ 100 UI LHp)
8 Heure PM	2 ml FSHp/LHp (100 UI FSHp/ 100 UI LHp)
<b>Lundi 29.04.2002</b>	
8 Heure AM	1 ml FSHp/LHp (50 UI FSHp/ 50 UI LHp)
8 Heure PM	1 ml FSHp/LHp (50 UI FSHp/ 50 UI LHp)
<b>Mardi 30.04.2002</b>	
8 Heure AM	--
8 Heure PM	IA
<b>Mercredi 01.05.2002</b>	
8 Heure AM	IA
8 Heure PM	--
<b>Mardi 07.05.2002</b>	
	Collecte d'embryons le jour 7 après l'oestrus.

▪ Le quatrième lot :

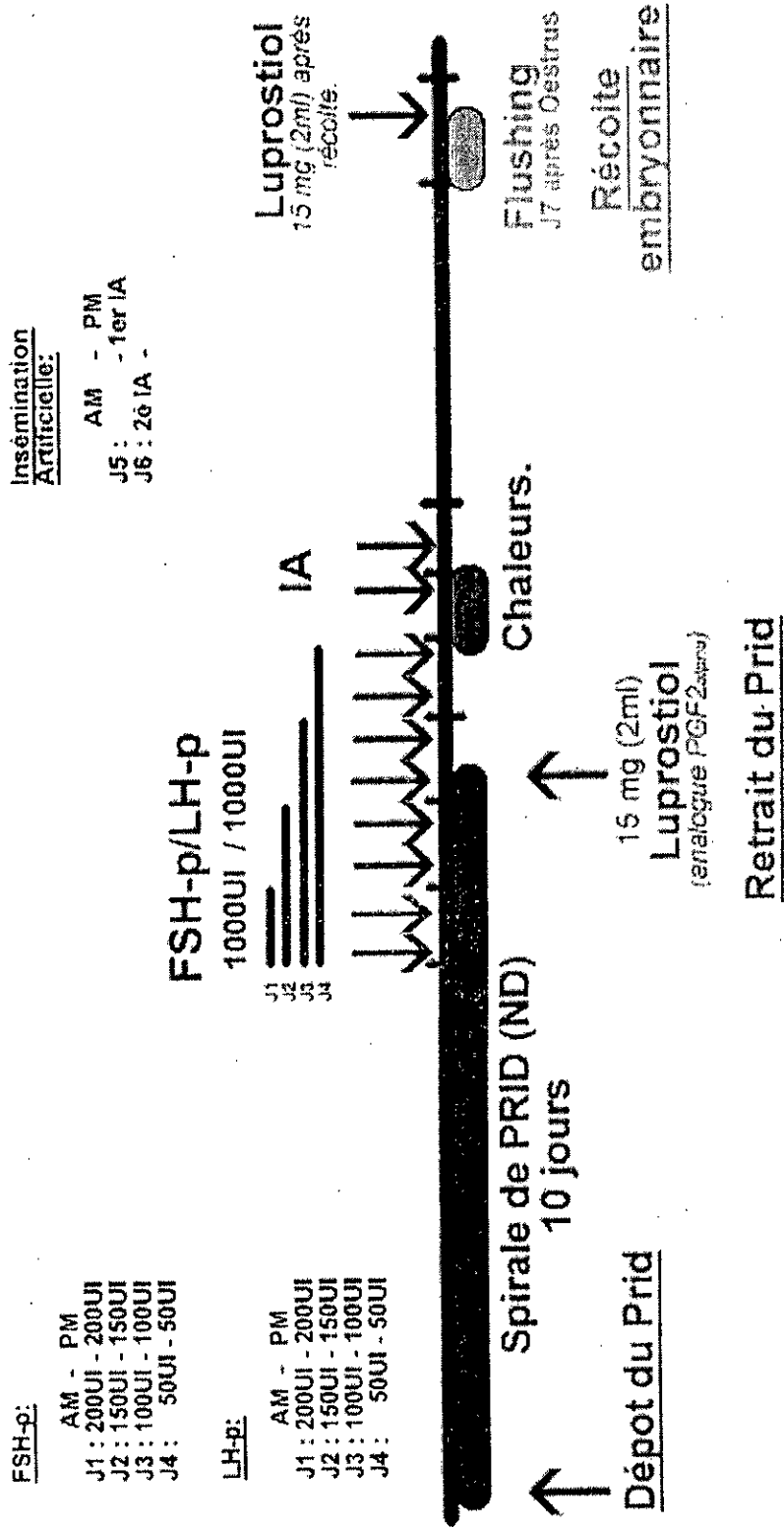
Le 4<sup>ème</sup> lot et le dernier, toujours idem au précédent avec un décalage de 72 heures du 1<sup>er</sup> lot (3 jours).

**Tableau 10:** Le programme superovulatoire du 4<sup>ème</sup> lot.

Jours	Modalité de la superovulation du 4 <sup>ème</sup> lot
<b>Samedi 27.04.2002</b>	
8 Heure AM	4 ml FSHp/LHp (200 UI FSHp/ 200 UI LHp)
8 Heure PM	4 ml FSHp/LHp (200 UI FSHp/ 200 UI LHp)
<b>Dimanche 28.04.2002</b>	
8 Heure AM	3 ml FSHp/LHp (150 UI FSHp/ 150 UI LHp)
8 Heure PM	3 ml FSHp/LHp (150 UI FSHp/ 150 UI LHp)
<b>Lundi 29.04.2002</b>	
	Retrait le matin du PRID® +2 ml (15mg) PROSOLVIN® en IM
8 Heure AM	2 ml FSHp/LHp (100 UI FSHp/ 100 UI LHp)
8 Heure PM	2 ml FSHp/LHp (100 UI FSHp/ 100 UI LHp)
<b>Mardi 30.04.2002</b>	
8 Heure AM	1 ml FSHp/LHp (50 UI FSHp/ 50 UI LHp)
8 Heure PM	1 ml FSHp/LHp (50 UI FSHp/ 50 UI LHp)
<b>Mercredi 01.05.2002</b>	
8 Heure AM	--
8 Heure PM	IA
<b>Judi 02.05.2002</b>	
8 Heure AM	IA
8 Heure PM	--
<b>Mercredi 08.05.2002</b>	
	Collecte d'embryons le jour 7 après l'oestrus.

Figure 0-1 : Protocole expérimental.

**Protocole de superovulation avec FSH-p/ LH-p PLUSET (ND) pour les 4 lots de donneuses sous cycle maîtrisé par le PRID (ND):**





**a) L'insémination artificielle ou l'IA :**

L'insémination artificielle s'est faite le soir du 5<sup>ème</sup> jour et le matin du 6<sup>ème</sup> jour à compter de la 1<sup>er</sup> injection de superovulation, elle a débuté sur le 1<sup>er</sup> lot, le dimanche 28.04.2002 et fini le jeudi 02.05.2002 avec le 4<sup>ème</sup> et dernier lot, c'est-à-dire le :

- Le dimanche soir, le lundi matin pour le 1<sup>er</sup> lot.
- Le lundi soir, le mardi matin pour le 2<sup>ème</sup> lot.
- Le mardi soir, le mercredi matin pour le 3<sup>ème</sup> lot.
- Le mercredi soir, le jeudi matin pour le 4<sup>ème</sup> lot.

Les 4 lots ont été inséminés en deux fois à 56 heures et 68 heures de l'injection d'un analogue synthétique de la PGF2 $\alpha$  à action lutéolytique, qui est le luprostiol (Prosolvin ®, Intervet S.A., Netherlands) ; pour cela on utilisé 4 paillettes par animal superovulé et cela en 2 fois (56 et 68 h), la semence employée était de type congelée, fournie par le CNIAG (centre national de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique).

La semence des taureaux utilisés c'est :

- Pander -ET (10395373), Allwis (10665677) pour les races pies noires.
- Amigo (4624973), Jaboto (10743480) pour les races pies rouges.
- Dotray (00078475) pour les races brunes.

**b) La récolte embryonnaire :**

Le timing de la récolte s'est fait comme il a été indiqué dans les tableaux, c'est-à-dire en tandem pour les 4 lots avec un décalage de 24 heures pour chaque lot, durant cette récolte on a utilisé :

▪ **Du matériel jetable :**

- PBS (Phosphate Buffered Saline) de Dulbecco stérile, 1litre par récolte.
- Milieu de conservation des embryons, PBS enrichi avec 4 % de BSA (Albumine Bovine Sérique fraction « V » 4gr/litre) en plus d'antibiotiques et d'antifongiques.
- Anesthésie : Lidocaïne à 2 %.
- Seringues de 10ml et de 50ml.
- Boîtes à pétries carrées et rondes à carreaux ; pour la recherche des embryon.
- Permanganate de potassium pour la désinfection du matériel.
- Vaseline liquide pour lubrification, gants pour le fouillé rectal, alcool chirurgicale.

### ▪ Du matériel non jetable :

- Sondes de récolte (la Cassou à 3 voies, la Folley à 2 voies) stérilisées ou désinfectées.
- Dilatateur cervical.
- Bouteilles et les différentes verreries de laboratoire, stérilisés et séchés.
- Binoculaires pour la recherche d'embryons.

La 1<sup>ère</sup> récolte a eu lieu le 05.05.2002, elle a touché les 3 vaches du 1<sup>er</sup> lot, les donneuses étaient récoltées une à une ; la donneuse était mise dans un endroit spacieux, bien éclairé et maintenue par une bonne contention. Après avoir vidé son rectum des éventuelles matières fécales, on a procédé à une palpation ovarienne d'appréciation de la réponse ovarienne à la superovulation par un comptage de corps jaunes ; puis on a commencé à laver la zone du périnée et la région urogénitale, après on les a désinfectées avec une solution de permanganate de potassium, bien séché avec du papier hygiénique. La vache est anesthésiée localement par 2 – 3 ml de la Lidocaïne à 2%, pour cela l'injection est pratiquée dans le 1<sup>er</sup> espace intervertébral, entre la 1<sup>ère</sup> vertèbre coccygienne et la dernière vertèbre sacrée (épidurale haute), cela après une très bonne asepsie avec de l'alcool chirurgical ; l'animal est laissé quelques minutes, juste le temps pour que l'anesthésie commence à agir, ensuite l'opération de récolte (Flushing) est amorcée :

L'opérateur commence par la donneuse contentonnée et anesthésiée, celui-ci avec la main gauche dans le rectum entoure le col, et grâce avec la main droite il introduit la sonde préalablement lubrifiée (vaseline) dans le vagin comme s'il allé inséminer ; (d'abord avec un angle de 45° pour éviter le méat urinaire ; puis il redresse la sonde en direction du col utérin ; il pousse le col vers l'avant pour déplier les plis du vagin et puis il ramène le col vers la sonde et commence à l'emmanché sur la sonde) ; dans le cas où le cervix est difficile à passer, voire impossible (les génisses surtout) l'opérateur retire la sonde et introduit le dilatateur cervical (outil métallique ressemblant au pistolet d'insémination non creux), celui-ci préalablement bien lubrifié forcera l'entrée du col ; en utilisant des mouvements vers la gauche et vers la droite avec délicatesse sans pour cela traumatiser le col. Après avoir bien dilaté mécaniquement le col, la sonde est réintroduite, lorsque l'opérateur sent la sonde dans le corps utérin, il l'oriente vers l'une des deux cornes, un peu au-delà de la vraie bifurcation, il gonfle le ballonnet (attaché à la sonde) avec 3 à 5 ml d'air selon la taille de la corne, celui-ci évitera la fuite des liquides de récolte avec les embryons en arrière de la sonde.

On a utilisé la sonde de Cassou (fig. 0-2) pour le 2 premiers lots (sonde métallique à 3 voies, de 6 mm de diamètre munie d'une tête télescopique) son principe est simple on injecte le liquide de récolte par une voie, quand la corne est remplie et que le ballonnet bloque leur sortie vers le corps puis le col, les liquides coincés passent dans la deuxième voie de drainage de la sonde (par la force des pressions) la 3<sup>ème</sup> voie est celle du ballonnet, on fait aussi passer de temps en temps des liquides de récolte dans sa tête télescopique, qui peut être déplacée jusqu'au fond de la corne, ainsi après la récolte de la première corne, on déclame le ballonnet et sans ressortir totalement la sonde on reprend l'opération avec la corne suivante.

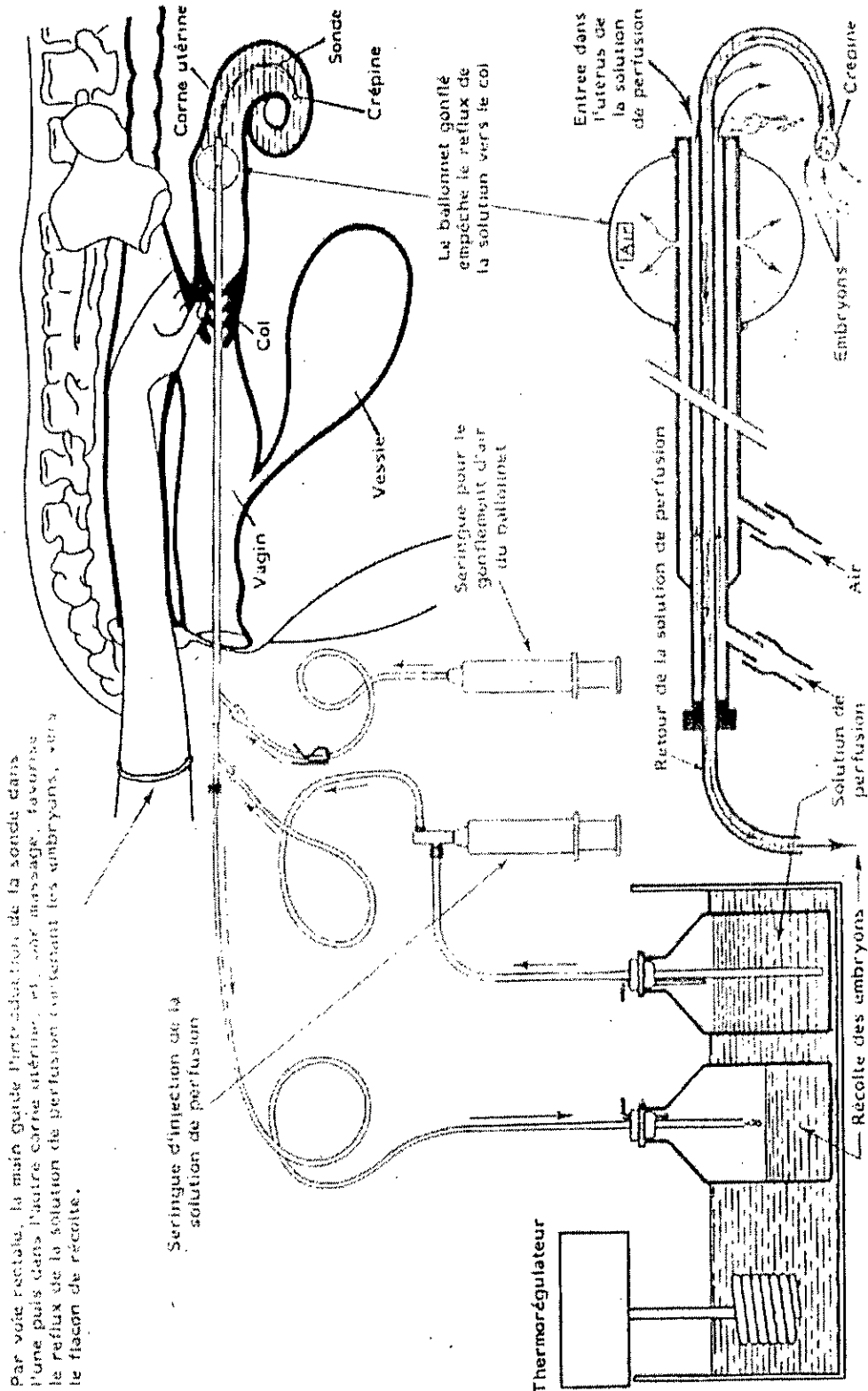
Pour les 2 derniers lots on a utilisé la sonde Allemande (fig. 0-3) qui est une variante de la sonde de Folley (sonde en silicone ou plastique mou munie de 2 voies avec un stylet métallique en son centre, d'un plus gros diamètre que la Cassou). Celle-ci est introduite comme la Cassou arrivée à l'emplacement voulu, on gonfle son ballonnet par l'une de ses voies spécifiques (3 à 5 ml d'air avec une seringue) puis on clampé, on retire ensuite le stylet pour libérer la voie centrale pour le passage des liquides de récolte, en utilisant une grosse seringue de 50 ml ; on injecte le liquide de récolte et on le retire grâce à une aspiration par la même seringue via la même voie, on répète l'opération 5 à 6 fois, sauf pour la dernière on injecte 30ml d'air avec le liquide, ceci pour aspirer totalement les liquide restant. on termine ainsi avec la corne en dégonflant le ballonnet. On répète les opérations avec l'autre corne.

Une évaluation des structures ovariennes par échographie a été entreprise sur un échantillon de vaches prises au hasard. Après le Flushing les vaches ont reçu 3 ml de Luprostiol, pour inciter la lyse de tout les corps jaunes présents sur les ovaires (issus du traitement de superovulation) et le réamorçage d'un autre cycle.

Les liquides récoltés ont étaient mis dans des bocaux stériles en verre, marqués avec un feutre indélébile du numéro de la vache récolté (chaque récolte d'une vache est mise dans son propre bocal). Ces bocaux sont maintenus en immersion dans de l'eau chauffée pour maintenir les embryons dans une température proche de celle de l'utérus maternel, après la récolte de tout le lot les bocaux sont transportés à l'université de Blida, exactement dans le laboratoire de biotechnologie de la reproduction dans l'institut des sciences vétérinaires.

Dans le laboratoire les containers de récolte sont laissés pour décantation durant environ 30mn (les embryons plus lourds que l'eau plonge au fond du bocal), ensuite on retire le surnageant par siphonage, on ne laissera que quelque centimètre au-dessus du fond du bocal le culot ainsi nommé et mis dans des boîtes à pétries tracées de carreaux (pour rendre la recherche des embryons plus aisée), les boîtes à pétries contenant le culot sont mises sous binoculaire. A partir de cet instant on commence l'exploration carreau par carreau jusqu'à les finir tous, en générale les embryons apparaissent comme de petits ballons brillons et translucide au fond de la boîte. Ils ont une masse plus ou moins sombre en leurs centre, ils peuvent être déplacés et roulés facilement, ensuite ils sont retirés et isolés dans de petites cupules contenant du liquide de conservation (PBS enrichi) pour bien les évaluer et les classer ; les embryons étaient jugés et classés selon des critères morphologiques de qualité et viabilité retenus par l'I.E.T.S «International Embryo Transfer Society», (Tableau 1)

Figure 0-2 : Procédure de Flushing avec la sonde de Cassou (sonde à 3 voies).



Par voie rectale, la main gantée introduit la sonde dans l'une puis dans l'autre corne utérine, et, sous massage, fait passer le reflux de la solution de perfusion contactant les embryons, vers le flacon de récolte.

Figure 0-3 : Procédure de Flushing avec la sonde de Folley (sonde à 2 voies).

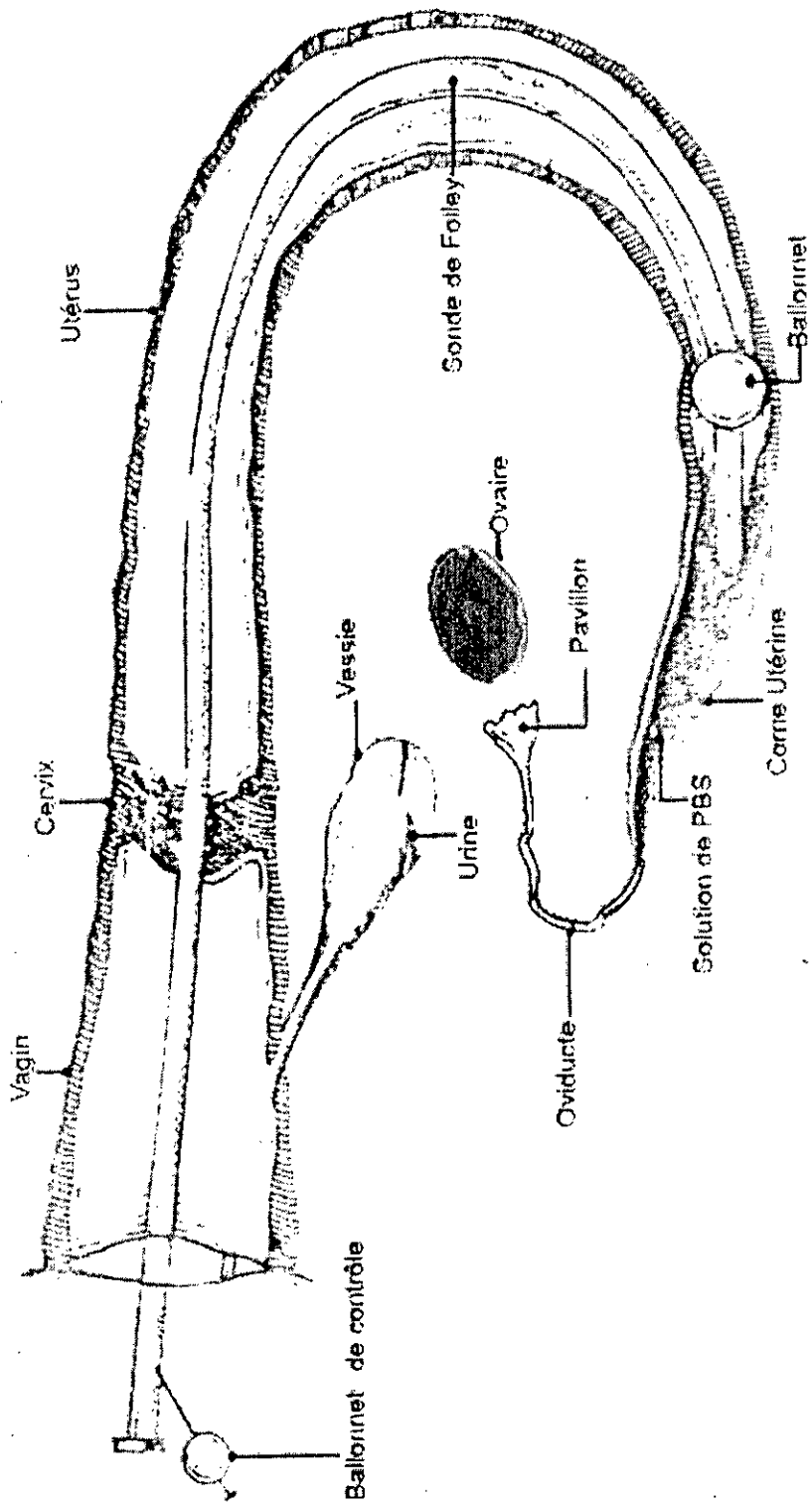


Tableau 1 : Critères de jugement de la qualité des embryons (Critères de l'IETS, 1990)

Code	Critères	Critères de qualité
1	Excellent ou Bon	<p><b><u>Embryon idéal pour le jour de collecte :</u></b></p> <p>Embryon de forme sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparables.</p> <p>Blastomères polygonaux au stade morula, d'aspects compacts.</p>
2	Moyen	<p><b><u>Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours:</u></b></p> <p>Blastomères sphériques au stade morula ou des défauts bien précis (nombreuses cellules échappées dans l'espace périvitellin, des vésicules, des cellules dégénérées)</p> <p>Blastomères de tailles variables, d'aspect plus clair ou plus sombre que normal</p>
3	Médiocre	<p><b><u>Embryon avec de nombreux défauts :</u></b></p> <p>nombreuses cellules échappées, cellules dégénérées, cellules de taille différente, vésicules grosses et nombreuses;</p> <p>Présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable.</p>
4	Mort ou dégénéré	<p>Arrêt de développement à un stade précoce, cellules dégénérées.</p>

## **IV. Résultats :**

Les résultats ont été dans l'ensemble les mêmes pour les 4 lots ; ainsi on a suivi l'évolution dès les premiers jours de la période du traitement progestatif jusqu'à la récolte, de ce fait on a rassemblé et isolé tout phénomène qui nous a semblé utile de les montrer et de les quantifier.

### **1. Les signes de chaleurs :**

Les manifestations des chaleurs des 4 lots ont été enregistrées et ensuite quantifiées selon une échelle de 4 points (0 : absente ; 1 : discrète ; 2 : bonne ; 3 : importante), ces signes ont commencé à être perceptible le jour de la dernière injection de PLUSET® (Laboratorios Calier, S.A., Espagne), selon l'ordre du décalage de chaque lot, c'est-à-dire intervalle de 24 heures entre chaque lot ; on a retenu parmi ces signes de chaleurs

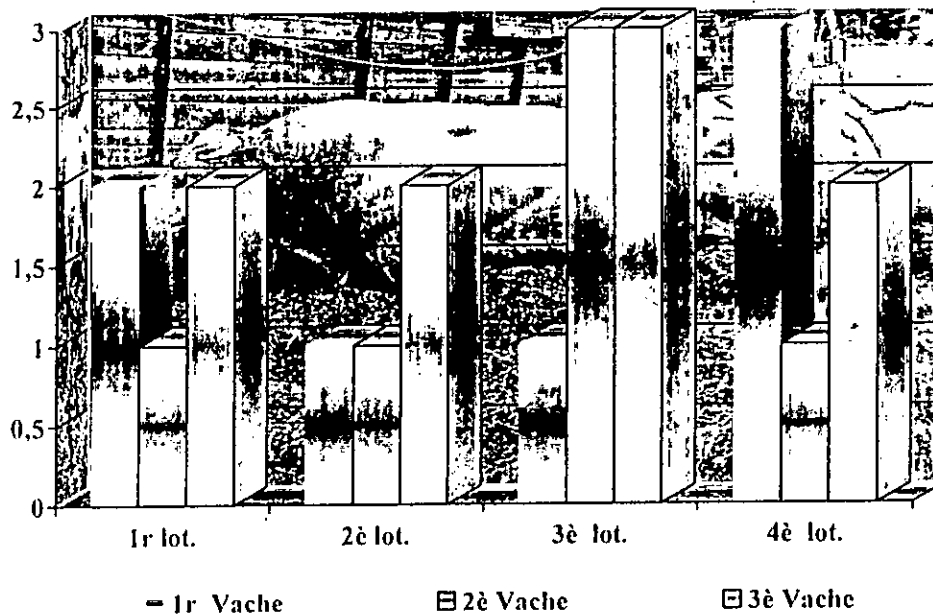
- La quantité de glaire cervicale.
- L'importance de la tuméfaction et la congestion des organes génitaux externe (vulve et entrée du vagin).
- La nervosité des animaux.
- Le chevauchement.

**Tableau 11 :** Manifestations des chaleurs des animaux des 4 lots.

N° du lot	Vaches	Race	Manifestation des chaleurs
Lot n° : I	1	PN	2
	2	PR	1
	3	PN	2
Lot n° : II	1	PN	1
	2	PN	1
	3	PN	2
Lot n° : III	1	Brune	1
	2	PN	3
	3	PN	3
Lot n° : IV	1	PR	3
	2	Brune	1
	3	PR	2



## Les manifestations des chaleurs chez les donneuses superovulées



### 2. L'évaluation des réactions ovariennes :

En même temps, de la récolte embryonnaire, les donneuses ont été inspectées grâce à la palpation ovarienne pour apprécier leur réponse au traitement de superovulation ; vu que dans le cas d'un cycle normal on trouve un corps jaune sur l'un ou l'autre ovaire exceptionnellement 2 (cas de gestation gémellaire hétérozygote). En effet, les résultats étaient très satisfaisants du fait de la bonne réaction ovarienne jugée lors du fouiller rectal avant la récolte en plus d'une échographie faite sur un échantillon de 6 vaches pris au hasard parmi les 12 vaches traitées par les gonadotrophines.

### 3. Le résultat de la récolte des 4 lots :

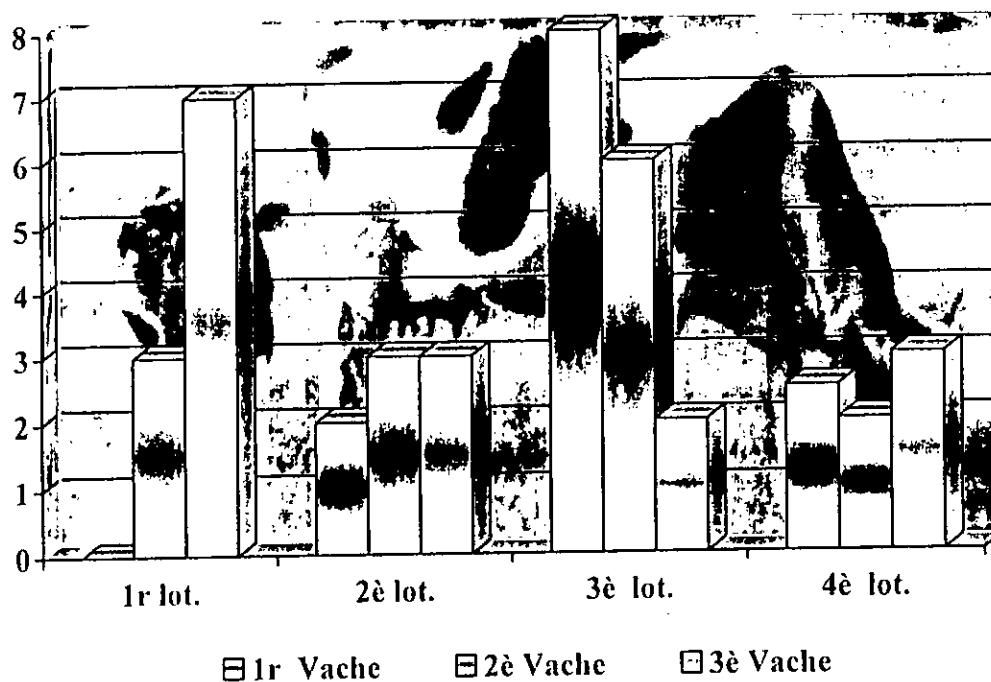
La récolte embryonnaire s'est passée dans des conditions assez bonne, excepté pour les deux premiers lots où on a utilisé la sonde de Cassou ; sur celles-ci la quantité des liquides récoltés été inférieur aux liquides administrés de ce fait, un volume non négligeable était resté dans la matrice. En contrepartie, on a conçu un rapport : liquides administrés sur liquides récoltés, (négatif : la quantité restée dans l'utérus était élevée ; positif : les liquides restants dans l'utérus sont très faibles). Cette différence était due à la difficulté de circulation des liquides (sonde de Cassou) dans sa fine tubulure (6 mm de Ø) vu qu'elle contenait d'importantes fractions de glaire et de mucus. Toutes les vaches ont été récoltées durant 4 jours et chaque récolte était traitée le jour même, étant donné que les containers des liquides issus du Flushing, ont été transporté au laboratoire de biotechnologie de la reproduction de l'institut vétérinaire de Blida, les bocaux sont laissés décanter, le culot est ensuite récupéré puis une

exploration très précise est faite sous binoculaire, les embryons découverts sont prélevés et isolés dans des cupules pour les évaluer et les classer.

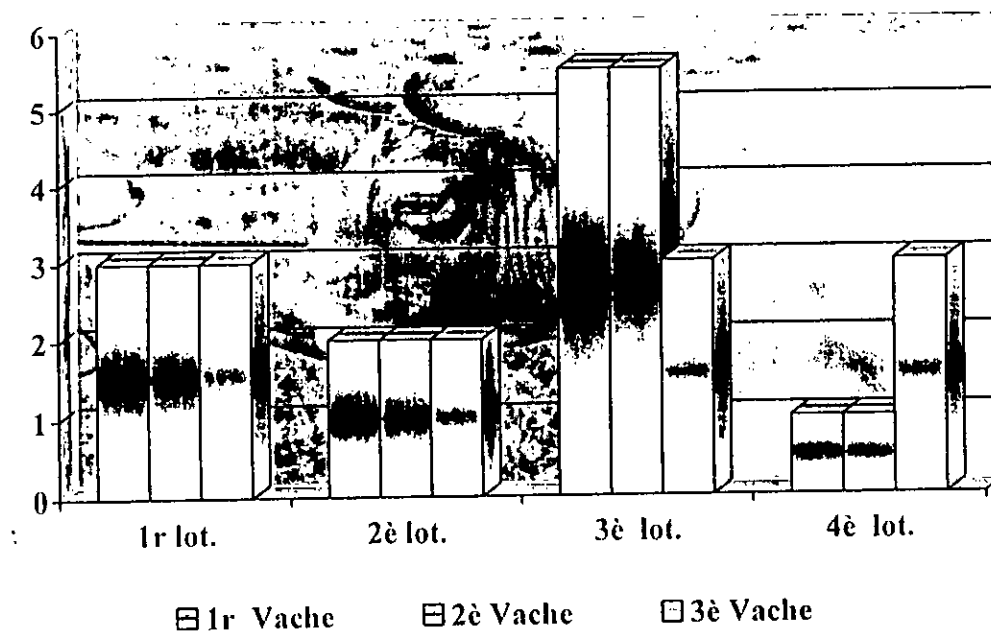
**Tableau 12 :** Appréciations de la réponse au traitement de superovulation via la palpation ovarienne et l'échographie (*CJ : corps jaunes, FK : follicules Kystiques*).

Numéro du lot	Numéro de la vache	Corps jaunes palpables		Echographie		Total
		Ovaire droit	Ovaire gauche	Ovaire droit	Ovaire gauche	
1 <sup>er</sup> lot	1	0	3	-	-	3
	2	3	3	-	-	6
	3	7	3	-	-	10
2 <sup>ème</sup> lot	1	2	2	CJ	CJ	4
	2	3	2	CJ	CJ	5
	3	3	2	CJ	CJ	5
3 <sup>ème</sup> lot	1	8	5-6	-	-	13-14
	2	6	5-6	CJ	CJ	11-12
	3	2	3	-	-	5
4 <sup>ème</sup> lot	1	2-3	1	-	-	3-4
	2	2	1	FK	FK	3
	3	3	3	-	-	6
<b>Total</b>		<b>41-42</b>	<b>33-35</b>			<b>74-77</b>

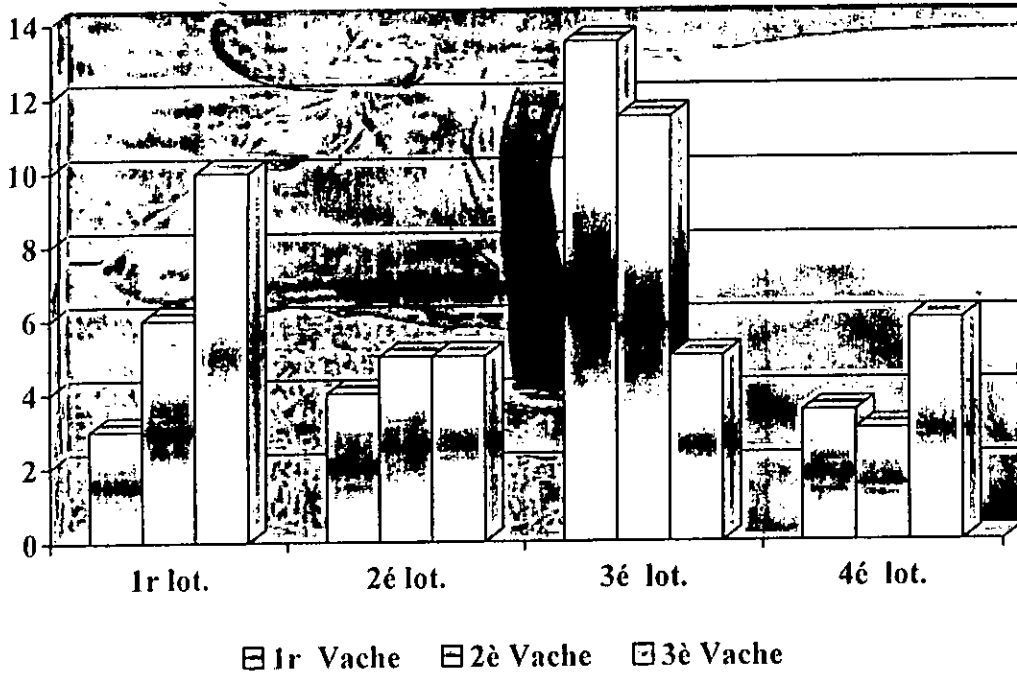
Le nombre de corps jaunes palpables sur l'ovaire droit des donneuses des 4 Lots.



Le nombre de corps jaunes palpables sur l'ovaire gauche des donneuses des 4 Lots.



**Le nombre de corps jaunes totaux palpables sur les  
deux ovaires des donneuses des 4 Lots.**



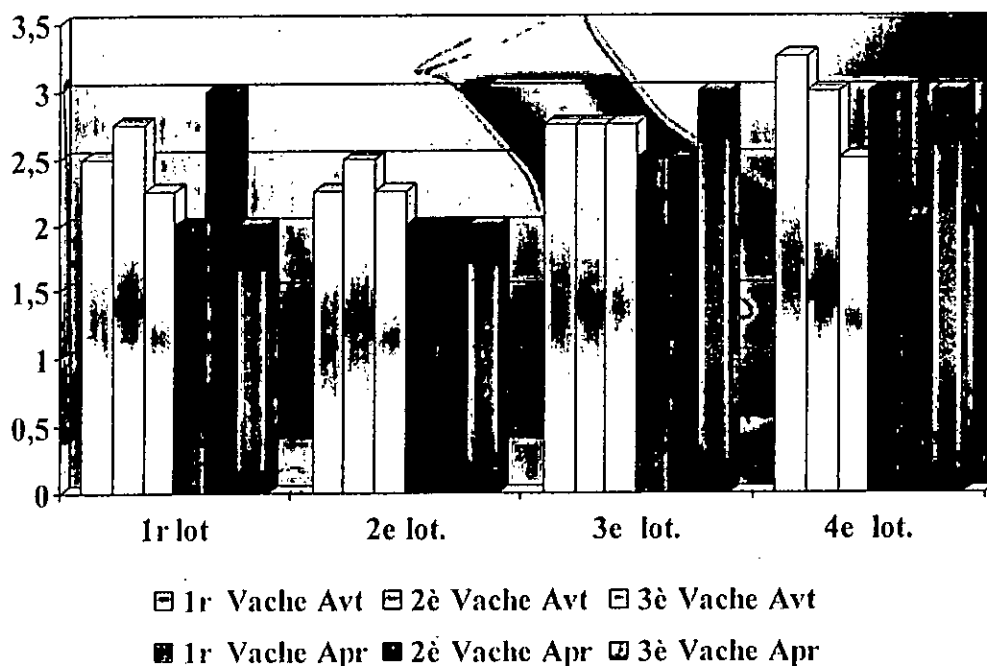
**Tableau 13 :** Les résultats des récoltes avec les différentes sondes des deux opérateurs y compris le rapport : liquides administrés et liquides récoltés, la variation du code chaire avant et après traitement superovulatoire.

l'opérateur & la sonde utilisée	Numéro du lot	Numéro de la vache	Résultat de la récolte		Le rapport de liquides (administrés et récupérés)	Code chaire	
			Ovocytes Non fécondé	Embryons dégénéré		Avant traitement	Après traitement
Opérateur 1 + sonde de Cassou	1 <sup>er</sup> lot	1	--	--	Négatif	2,5	2
		2	--	--	Négatif	2,5-3	3
		3	--	--	Négatif	2-2,5	2
	2 <sup>ème</sup> lot	1	--	--	Négatif	2-2,5	2
		2	--	--	Négatif	2,5	2
		3	--	--	Négatif	2-2,5	2
Opérateur 2 + sonde Allemande	3 <sup>ème</sup> lot	1	5	1	Positif	2,5-3	2,5
		2	Mérite	Mérite	Positif	2,5-3	2,5
		3	1	2	Positif	2,5-3	3
	4 <sup>ème</sup> lot	1	1	0	Positif	3-3,5	3
		2	0	0	Positif	3	2
		3	1	0	Positif	2,5	3

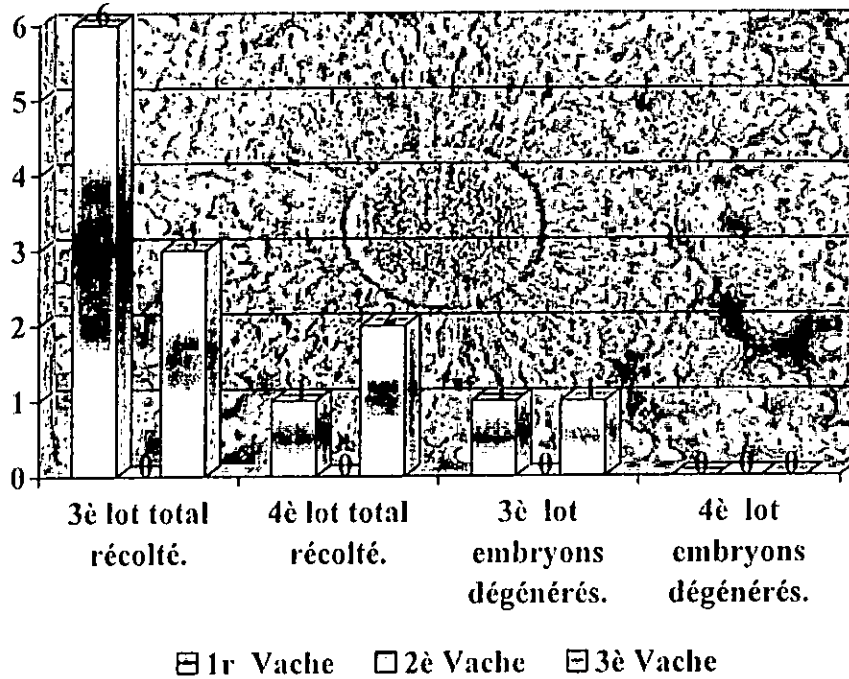
#### 4. L'appréciation du code chaire :

Une réévaluation du code chaire a été faite sur les donneuses d'embryons après la récolte et à la fin du traitement superovulatoire, ainsi on a remarqué qu'il y a eu baisse de l'état d'embonpoint dans l'ensemble des animaux du lot 1 et 2 alors qu'il y a eu une élévation relative chez quelques animaux du lot 3 et 4.

#### La variation du code chaire avant et après le traitement superovulatoire



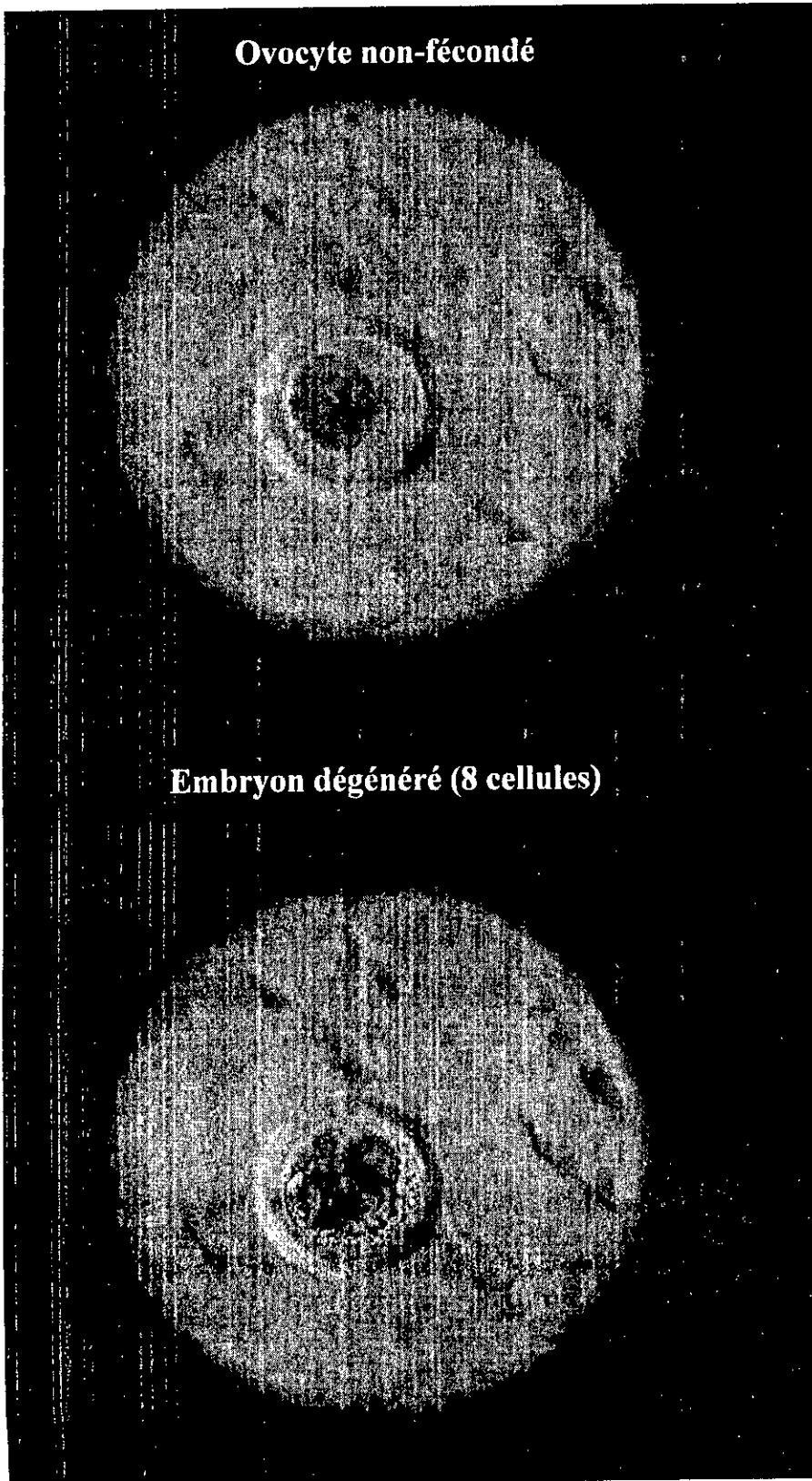
## Le résultat des récoltes d'embryons du 3ème et 4ème lot.



## 5. Les produits de récolte :

On a remarqué que les vaches du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> lot ont produits des embryons dégénérés et de nombreux ovocytes non fécondés, surtout les vaches 1 et 3 du 2 lot.

PHOTOS : Les 2 types d'embryons récoltés du lot 3 et 4.





## V. Discussion :

Avant toutes choses, il est intéressant de savoir que c'est pour la 1<sup>ère</sup> fois en Algérie, qu'on a expérimenté une biotechnologie de la superovulation. Cependant, on a appliqué le protocole expérimental de superovulation sur 4 lots, puis on a rassemblé tout les facteurs, jugés influant sur la réponse, permettant ainsi d'expliquer nos résultats obtenus. Néanmoins, les résultats du traitement de superovulation ont été très pertinents et intéressants, du fait qu'ils nous ont informé de la complexité du phénomène, en l'occurrence la reproduction de l'espèce bovine.

Avant d'entamer le phénomène par sa face physiologique, il faut d'abord signaler que la défaillance du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> lot, récolté par le 1<sup>er</sup> opérateur, était due au manque d'expérience dans la récolte embryonnaire non chirurgicale, ceci par l'utilisation de la sonde à Cassou ; puisqu'il est à citer que la tubulure de la sonde se bouché par les mucosités excessives, due à l'irritation de l'endomètre causée par la mauvaise manipulation. De ce fait la récolte des liquides était très faible de par leurs quantités (les liquides récupérés étaient moins de 50% des liquides injectés) et leurs qualités (le mucus + glaire avec un risque d'agrégation des embryons et la coloration rose à rouge du liquide de récolte gênant la recherche d'embryons). Donc c'est un facteur important, ainsi la compétence et l'expérience de l'opérateur ont été surtout étudiées lors du transfert d'embryons, en effet elle concerne surtout la manière d'éviter de traumatiser l'endomètre. Une étude sur 6 ans par Park et al. (1991) ont montré qu'un programme de TE peut être conduit par les propriétaires, mais seulement après une formation antérieure appropriée. Néanmoins, la différence est visible sur l'opérateur 2 utilisant la sonde allemande (variante de la sonde de Folley) ayant récolté les liquides à 90% sur les lots 3 et 4.

En conséquence, ça nous a permis d'arriver à un point important, c'est que le phénomène de l'ovulation est plurifactoriel en d'autres termes que plusieurs paramètres influencent et interagissent avec le traitement superovulatoire. En effet, le paramètre le plus qui nous a frappé, c'était la baisse de l'état d'embonpoint de nos donneuses d'embryons cela de façon très marquée par rapport à ceux du lot 3 et 4 où la baisse était dans des valeurs plus ou moins normales (une baisse relative du code chaire, 2 pour le lot 1 et 2 versus 2,5 pour le lot 3 et 4). Cette baisse était due surtout au changement et de façon moindre à la diminution de l'apport alimentaire, ceci par l'absence d'un programme d'alimentaire spécial.

Cependant, il y a peu d'études ont abordé l'impact de l'alimentation sur les réponses de superovulation dans l'espèce bovine, ainsi que rôle joué par l'alimentation sur la reproduction naturelle des femelles cyclées, donc on en déduit que les effets de la nutrition sur la fertilité pour la mono ovulation sont applicable pour la superovulation bovine (Kafi et al., 1997).

Dans ce sens une alimentation inadéquate semble altérer la fonction reproductrice chez de nombreux mammifères, car les effets de la sous alimentation sur la performance reproductrice chez la vache seraient dus à une perturbation au niveau hormonal de l'ovaire, de la glande antéhypophyse et/ou l'hypothalamus (fig. 4). Des études en 1986, ont trouvé qu'une sous alimentation pendant le post-partum chez des génisses à viande induisait une diminution de la concentration d'oestradiol et retardait la croissance folliculaire, plus tard, Kurtz et al. (1990) ont observé que la restriction dans le régime énergétique inhibait l'augmentation des pulses de LH sur les génisses ovariectomisées et intacte.

Quant à Murphy et al. (1991), ils ont démontré qu'un régime alimentaire ayant une faible valeur énergétique réduisait le diamètre maximal du follicule dominant et raccourcit sa persistance sur l'ovaire. Une autre étude faite par de Mc Dougall et al. (1995) a montré que le premier follicule dominant chez la génisse Frisonne qui a vélé dans des conditions du Body Score inférieure prenait beaucoup plus de temps à atteindre sa taille maximal comparé à des génisses en conditions du Body Score supérieure ( $14,0 \pm 1,3$  versus  $10,6 \pm 0,7$  jours).

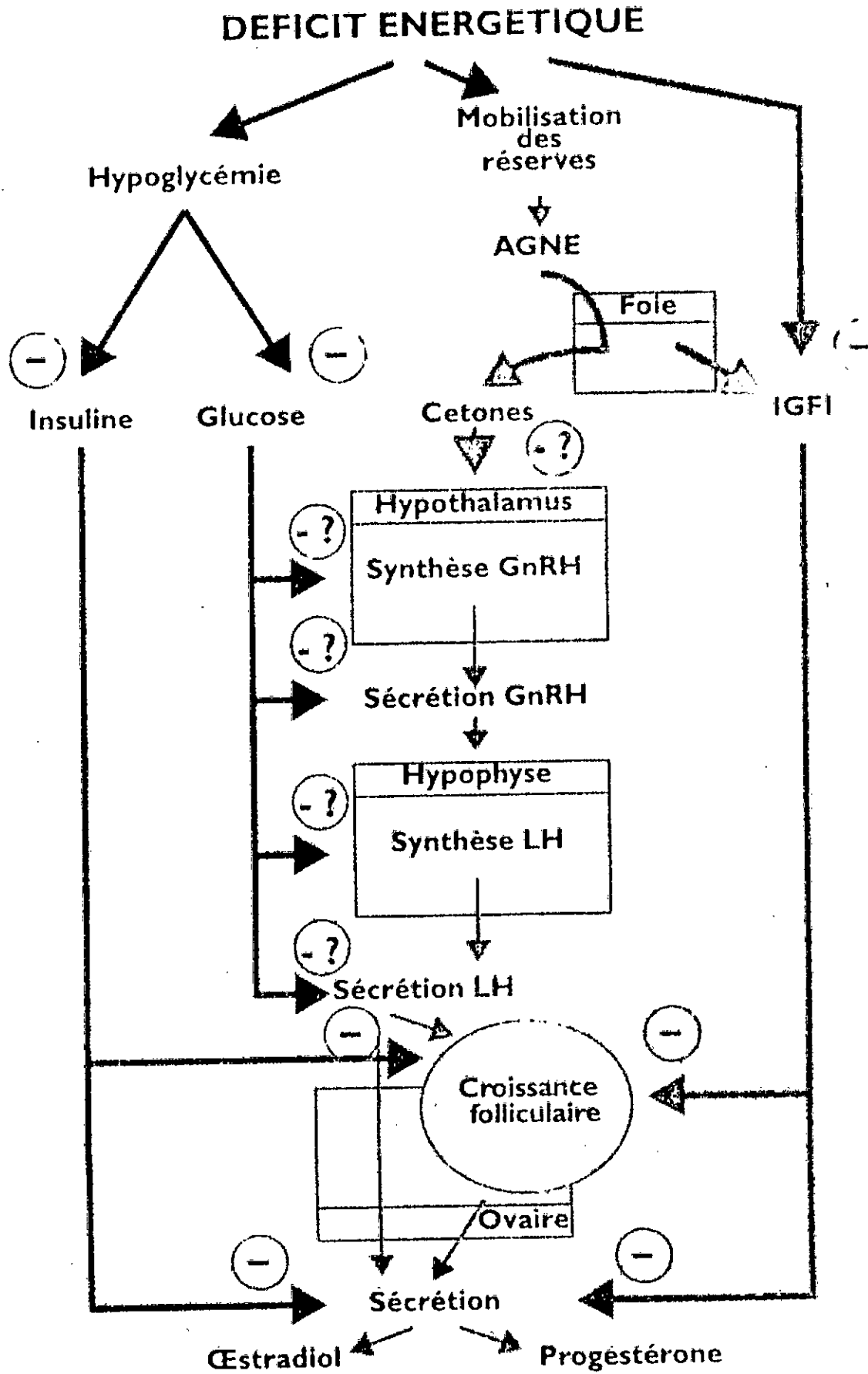
Ashworth (1994), a repris l'influence de la nutrition sur le nombre d'ovulation chez les animaux domestiques. Ainsi il a remarqué qu'une augmentation du taux d'ovulation a été observé chez des brebis ayant reçu un supplément alimentaire par des grains de lupin ou ayant reçues des perfusion directe de glucose ou un mélange associant des aminoacides, de se fait il a déduis qu'une augmentation du taux d'ovulation, est associée à une augmentation de la concentration d'insuline mais sans l'augmentation de la concentration plasmatique de gonadotrophine. Ultérieurement Scaramuzzi et Murray (1994) ont indiqué que la littérature et les publications jusqu'à nos jours manque d'information sur la relation entre la nutrition et la superovulation.

En France, Saumande et al. (1998) a préconisé un plan de nutrition quotidien avec un gain de poids de 1 kg comme l'optimal pour une production d'embryons viable sur la Holstein. Il est très intéressant de signaler que jusqu'à nos jours la seule voie suspecte de l'influencer la superovulation (par extrapolation à la mono ovulation) est la composition énergétique de l'aliment du bétail (Humblot et al 1998); pour le cas des protéines Garcia-Bojalil et al. (1994) ont trouvé qu'un excès de protéines brutes donné à des vaches Holstein hors lactation avait des effets contraires sur la fertilisation et la qualité d'embryons, contrairement à une étude sur des donneuses Holstein en lactations faite par Blanchard et al. (1990).

Concernant la composition lipidique, une étude de Ryan et al., (1992), a montré une augmentation du développement folliculaire chez les génisses viandeuses ayant eu une alimentation avec une teneur élevé en graisses. Enfin pour les vitamines, Shaw et al. (1994) montrèrent qu'une

injection de vitamine A ( $1 \cdot 10^6$  UI) au début du traitement FSH améliorerait sans doute la qualité d'embryons mais, sans action sur le taux d'ovulation. De même qu'il est connu que la concentration d'acide ascorbique (vitamine C) augmente lors de la formation du corps jaune proportionnellement à l'augmentation de l'activité lutéale et du niveau de progestérone ; de nombreux chercheurs ont fourni la preuve de l'implication de l'acide ascorbique dans la stimulation de la synthèse de progestérone et la sécrétion de l'ocytocine par les cellules de la granulosa bovine *in vitro* ; ainsi il avait utilisé comme indice de l'activité lutéale ; Rapoport et al. (1998) ont démontré que le niveau d'acide ascorbique du corps jaune bovin était en corrélation significative avec le cytochrome P450<sub>scc</sub> et aussi du niveau sanguin de la progestérone, ceci est dû aux besoins croissants d'antioxydants, lors de l'élévation de la fonction stéroïdienne du corps jaune, alors que son rôle précis dans la stéroïdogénèse n'a pas encore connu.

Figure 4 : Les effets du déficit énergétique sur la reproduction selon (Mialot et Grimard).



D'autres auteurs ont rapportés des données contradictoires sur l'alimentation et son influence sur le rendement embryonnaire ; en Irlande, Yaakub et al (1999) ont trouvé que le concentré donné en ad libidum, réduisait la réponse à la superovulation et que l'aliment à peine basé sur le concentré avait un influence négative sur la qualité des embryons, toujours en Irlande, Nolan et al. (1998a) ont trouvé que le taux de développement embryonnaire était plus élevé chez les vaches en restriction alimentaire que chez les vaches en régime ad libitum, un autre travail dans le même pays et par les mêmes auteurs (Nolan et al., 1998b) a montré d'indéniable amélioration du rendement embryonnaire lors d'une restriction alimentaire. Une explication a été énoncée, c'est l'augmentation dans le taux de la clairance métabolique de la progestérone, induisant une diminution de la concentration de la P4 circulante observée chez des brebis avec un niveau élevé de nutrition (Parr et al., 1993 ; McEvoy et al., 1995) et qui démontre que ce genre de régime produisait une suppression de la concentration de progestérone préovulatoire chez les brebis superovulées à la eCG (PMSG), induisant un retard dans le développement ovocytaire. Un travail à Aberdeen par les mêmes auteurs sur des génisses donneuses de type Simmental, a montré qu'une dissemblance existe par rapport à ce qu'il a été trouvé chez la brebis et que ni la restriction alimentaire ni un supplément en progestérone avant l'ovulation influençaient le rendement des embryons viable récoltés à J7 après les chaleurs.

Donc,, on remarque que tous les auteurs s'assemblent en deux principaux groupes, les uns plus nombreux pour l'action positive de l'alimentation les autres pour son effet néfaste au rendement superovulatoire, alors on comprend que le mécanisme nutritionnel influençant la réponse superovulatoire et la qualité embryonnaire reste encore obscure ; car l'alimentation englobe plusieurs variables (énergie, aminoacides, graisse et vitamine...) et que chacune d'elles, agit de façon différente voir de façon opposée ; dans ce sens au Royaume uni, Gong et al. (1999) ont trouvé qu'une augmentation alimentaire (200% des besoins d'entretien) prise 3 semaines avant la superovulation améliorait le recrutement folliculaire ovarien chez des génisses de race Hereford x Frisonne produisant considérablement plus de corps jaune que le lot témoins (18,1 versus 10,6).

Un autre facteur aussi important que l'alimentation et qui a été suspecté dans notre expérimentation a cause du taux élevé d'ovocyte non fécondé (8 sur 3 fécondés), ce problème peut être la conséquence de plusieurs facteurs ; le premier est un problème de maturation folliculaire. Puisqu'on sait que l'ovocyte continue sa méiose jusqu'à la métaphase II juste avant sa fécondation par un spermatozoïde, ce processus est sous le contrôle de la LH, car la métaphase se produit à 18 – 24 h après le pic de LH, avec des modifications au niveau de la granulosa et du cumulus par augmentation de son activité mitotique visible. Hyttel et al. (1991), puis Bousquet et al. (1995) ont examiné ce processus de maturation ovocytaire chez les vaches superovulées avec la PMSG et la FSHp, et sur 177 oocyte collectés, 66 (37%) ont été classés anormaux par rapport à la synchronisation entre le stade de maturation nucléaire et le moment du pic de LH, or, 48% des animaux produisent des ovocytes

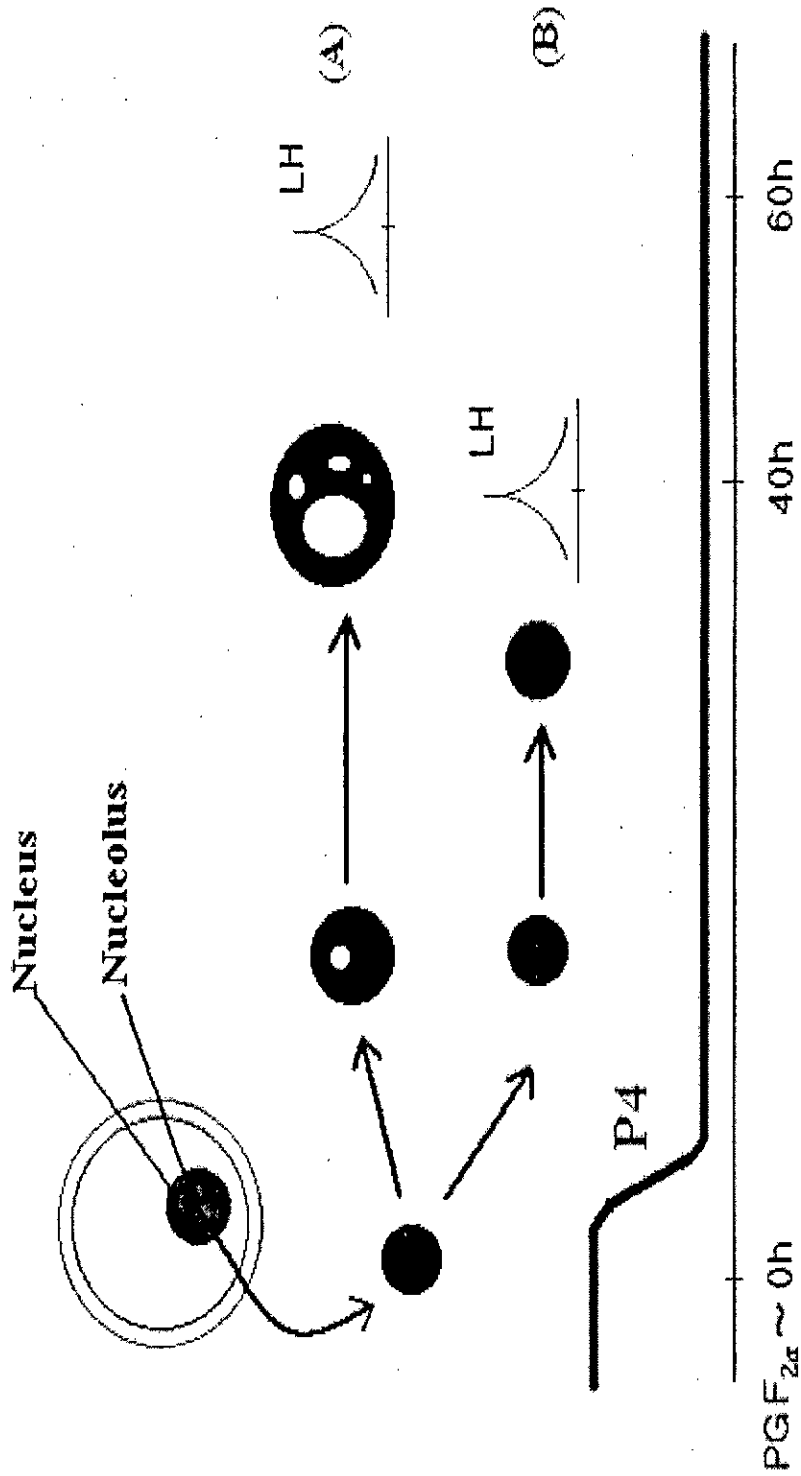
exclusivement normaux, 25% en produisent des normaux et anormaux à la fois alors, que 27% donnent de ovocytes exclusivement anormaux. Cette incidence est moindre lors d'utilisation de la FSHp que lors d'utilisation de eCG (Murphy et al., 1991 ; Laurincik et al. 1993a ; Laurincik et al. 1993b).

Des études au Danemark, faites par Greve et al. (1995) ont conclu que cette prématuration des ovocytes, se produisait après régression de la phase lutéale, impliquant des changements nucléolaires, qui ne se produisent pas complètement chez les bovins superovulés (fig. 5), en effet, Dieleman et Bevers (1993a) en Hollande, ont constaté que les follicules préovulatoires chez la vache superovulée contenaient plus d'un quadruple de concentration d'oestradiol que chez les non traitées, donc c'est l'environnement endocrinien qui influencerait sur la qualité ovocytaire.

Ainsi, Les études entreprises pour comprendre la maturation in vivo, avaient été concentré sur l'intervalle du pic ovulatoire au moment de l'ovulation : période préovulatoire, durant laquelle l'intervalle endocrinologique folliculaire, le profil hormonal périphérique (P4 et E2) et l'aspect de la maturation nucléaire – cytoplasmique de l'ovocyte ont été examinée chez les vaches non superovulées. Quoique, des déviations ont été fréquemment observé durant cette période ; de la même façon, l'ensemble des modèles de l'endocrinologie folliculaire et de la maturation ovocytaire a été décrit aussi sur les vaches superovulées (de Loos Fam et al., 1991 ; Galli et al., 1994 ; Hyttel et al., 1991).

Il est connu qu'avant la lutéolyse chez les vaches non superovulées, le noyau des ovocytes est typiquement sphérique et contenant un nucléole sphérique aussi, et dont la région fibrillaire est dense (inactive). Dans l'intervalle lutéolyse jusqu'au pic de LH le noyau devient ondulé et le nucléole montre une vacuolisation associée à son début d'activité (transcription de l'ARNr), par contre chez les vaches superovulées les déviations sont fréquentes durant la prématuration de l'ovocyte ; plus de 90% récolté lors de la période s'étalant de la lutéolyse au pic de LH chez des animaux traités par les gonadotrophines ; montrent un défaut de vacuolisation nucléolaire en plus d'une augmentation de la condensation de la chromatine avec un élargissement du compartiment endoplasmique rugueux par rapport à leurs homologues non traité (Assey et al., 1994). Il est à noter que ces déviations restent des énigmes à l'heure actuelle, cependant, il a été mentionné que la FSH induisait une réduction épisodique de la sécrétion de LH ce qui provoquera une réduction de l'intervalle séparant le traitement de la PGF2 $\alpha$  du pic de LH, ces deux facteurs altéreraient la stéroïdogenèse de chaque follicule séparément et affecteraient à la fois la prématuration (période lutéolyse – pic de LH) et la maturation finale de l'ovocyte (Botero-Ruiz et al., 1984).

Figure 05 : La prématuration nucléaire comparée, A - cycle normal, B - cycle superovulatoire (Greve et al., 1995).



Bien que, la maturation ovocytaire a la plus grande par des problèmes lié à la superovulation, il n'est pas moins pour le pic ovulatoire de la LH qui est plus ou moins précoce par rapport à la normale, il est convenu que l'ovulation commence 22 – 26 h après le pic de concentration de LH chez les vaches superovulées (Laurincik et al., 1993a ; Laurincik et al., 1993b). Purwantara et al (1994a) ont démontré que la période d'ovulation était rangée entre 4 et 12h avec une moyenne de 8,3 h chez la génisse et la vache laitière superovulées avec la FSHp ; Laurancik et al. (1993a) et Laurancik et al. (1993b) ont révélé que 75% approximativement des ovulations se font dans les première 4 h de cette période. L'ovulation prématurée se produit souvent sur les vaches superovulées ; Callesen et al. (1987) ont démontré que certaines donneuses traitées avec des gonadotrophines ovulées au même moment ou d'autres follicules en croissance arrivés à la taille ovulatoire.

Des rapports récents ont montré une inhibition ou une absence complète du pic préovulatoire de LH chez les vaches subissant la superovulation. Price et al (1999) conclurent qu'il y a une réduction de la sécrétion pulsatile endogène de LH durant la superovulation qui partiellement serait due au feedback négatif de l'œstradiol. Par ailleurs, Oussaid et al. (1998) ont examiné les effets de prolongement de la phase folliculaire chez les génisses superovulées avec un agoniste de la GnRH (Antarelix ; Europeptides, France) ; le délai du pic préovulatoire de LH paraît contribuer à l'aptitude ovocytaire au développement, ainsi, au Canada, Kohram et al. (1999) ont utilisé le CIDR (Progestagènes) pour atteindre un délai de pic de LH de 24 h chez les génisses superovulées avec la FSH, mais, pareil aux autres ils n'ont pas eu d'amélioration dans la production embryonnaire.

En France, Lafri et al. (1999) conclurent que l'apparition tardive du pic de LH relative au début de l'oestrus, est associée à des embryons de qualité pauvre chez la vache inséminée habituellement 12 h après le début de l'oestrus, de ce fait, de nombreuses études sont requise pour statuer sur le timing exacte de l'IA soit par le test sur la portées du délai IA ou soit par le test de LH grâce à l'analyse de prélèvements.

Il est connu que la fréquence des pulses sont réduites entre 8 – 32 h après l'initiation du traitement de superovulation (grâce à l'utilisation de PMSG ou de FSH) mais, qu'elle ne produit pas de changement dans le niveau de P4 (Gosselin et al., 1995) ; donc, le traitement par les gonadotrophines a un effet direct sur la libération de LH endogène, ceci a conduit à le prendre comme un facteur influençant le pic préovulatoire de LH. Mais, en dépit des réponses variables et imprévisibles de la superovulation et les embryons produit par ces donneuses traitées (Armstrong et al., 1993 ; Boland et al., 1991 ; Boland et al., 1994 ; Dielman et al., 1993 ; Mapletoft et al., 1993), d'autres facteurs interviennent sur la qualité et la viabilité des embryons (Bousquet et al., 1993) ;



ainsi, hormis les autres facteurs, un seul a été très bien étudié puis incriminé par son influence direct sur : le pic de LH endogène. L'action de la FSH, la prématuration, l'ovulation, la fécondation et en dernier durant la vie précoce de l'embryon, celui-ci est appelé la stéroïdogénèse (Bar-ami et al., 1994 ; de Loos et al., 1991 ; Kastrop et al 1991) .

Des descriptions très détaillées des profils hormonaux ont été considérés comme très précieux pour la compréhension et l'évaluation des changements physiologiques, qui se produisent durant la superovulation, affectant ainsi les conditions sous lesquelles se développent les ovocytes et les embryons. Le critère le plus perceptible est la déviation endocrinienne périphérique du niveau de P4 chez les donneuses superovulées, la suppression épisodique de la libération des pulses de LH est la conséquence directe de la stimulation par la FSH, l'altération est produite dans le pic de LH, ceci est dû au niveau très élevé d'œstradiol « E2 » circulant. Bien qu'il est impossible de prévenir cette suppression épisodique de la sécrétion de LH lors de la induction par la FSH, seulement, la période abrégée de la lutéolyse au pic de LH peut être contrôlée et allongée par l'administration d'analogue de la GnRH, après l'administration de la PGF2 $\alpha$  (Oussaid et al. 1998), ou bien par l'utilisation d'un mélange de P4 et de GnRH exogènes (Vos PLAM et al., 1994). Cette hypothèse de traitement est supposée donner suffisamment de temps aux ovocytes pour subir la prématuration et de gagner la compétence pour le développement subséquent normale. Or que les résultats de ces traitements n'ont pas été concluants.

Chez les vaches superovulées la concentration préovulatoire maximale de E2 (le pic d'œstradiol) est fortement corrélée par le nombre d'ovulation est exprimé par le nombre de corps jaune présent à J6 et J7 après œstrus (Kelly et al 1997). Donc, on comprend que la synthèse de E2 est due au nombre élevé d'ovocytes préovulatoires, produisant un niveau élevé d'androgènes, excrétés par les cellules thécales puis, transformés grâce à l'activité de l'aromatase de la granulosa en œstradiol E2 (Driancourt et al., 1998). Un cas plus ou moins fréquent lors d'utilisation du eCG lors de la superovulation, c'est les follicules anovulatoires (Boland et Roche, 1992 ; Gonzalez et al., 1994a). Cependant, d'autres chercheurs ont suggéré que la croissance folliculaire continue, résulte d'un niveau croissant de E2 durant la période précoce du diœstrus qui produit ainsi un environnement utérin hostile pour les spermatozoïdes, les ovocyte ou les embryons (Gonzalez et al 1994b) ; ceci a aussi été démontré lors d'utilisation des doses différentes (inadaptée) de eCG (Gordon et al., 1975) et de FSHp, par une administration de doses très élevées induisant une surstimulation ovarienne.

En plus de la non maturité et la précocité de l'ovulation des ovocytes, le taux élevé d'ovocytes non fécondés, produis dans notre expérimentation peut être lié au transport anormal des spermatozoïdes ; lors de l'utilisation de l'IA ; puisque le taux de fertilisation rapporté pour le cas des vaches à une ovulation (sans traitement) était dans l'intervalle de 85 – 95% ; quoique, la donnée

disponible pour les vaches superovulées sont considérablement plus faible, soit 65 – 70% (Hasler, 1992). Cette baisse est due à la concentration de progestérone et d'œstradiol 17 $\beta$  (Gradela et al., 1996 ; Assey et al., 1994) pour ce dernier, le niveau élevé de E2 (Greve et al., 1995), lors de l'insémination connue pour son effet sur le stockage et la libération des spermatozoïdes dans l'oviducte, sur la contractilité de l'infundibulum (Friedman et al., 1994) ; sur le transport de l'ovocyte via l'oviducte (Greve et al., 1995) et enfin sur la formation du fluide oviductal (Greve et al., 1995).

De ce fait, on peut ajouter sur ce qui a été dit auparavant sur la présence des ovocytes non fécondés dans nos résultats de superovulations et cela selon les 5 points de Traoré et al. (1992) :

1. Utilisation de semence de faible qualité biologique (principale raison selon l'auteur).
2. Insémination incorrecte (insémination profonde).
3. Spermotoxicité par influences d'une muqueuse utérine (endométrite catarrhale).
4. Le caractère individuel des donneuses (stress – détresse).
5. Utilisation des hormones gonadotrophiques mal dosées.

Pour notre dernier cas, sur les embryons dégénérés ; selon Sreenan (Greve et al., 1995), les échecs de reproduction sont imputables pour ¼ d'entre eux à des non fécondations (NF) et pour ¾ à des mortalités embryonnaires ou fœtales. En pratique, il est très difficile d'analyser les NF ; néanmoins lors de l'abattage systématique des bovins entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de gestation, le rapport d'embryon anormaux ou d'ovocytes NF (donc non divisés entre J2 et J5) au nombre d'embryons normaux ou de vaches fécondées est entre 10 et 15% selon les auteurs. Sauf qu'en dehors des enzooties abortives, les mortalités fœtales MF chez les bovins (> 45jours) sont très faibles, environ 3%, ce qui résulte que la mortalité embryonnaire ME correspond quasiment aux ¾ d'échecs de gestation (Chene et Martal, 1996), ces ME avant 16 jours sont appelées mortalités embryonnaires précoces MEP.

Le taux de progestérone circulante est connu pour avoir le plus grand rôle dans la viabilité embryonnaire, donc, la détermination de la concentration de progestérone sur les donneuses potentielles au moment de la superstimulation peut être utilisée pratiquement, alors que la palpation par voie rectale pour rechercher les corps jaunes n'est pas toujours précise (Lange et Reichenbach, 1997). Des études ont démontré que la concentration de P4 mesurée au commencement du traitement de la superovulation est corrélée significativement avec la réponse superovulatoire (Herrler et al., 1990) ; pourtant ces données n'ont pas été confirmées par d'autres études, en définitive une concentration élevée d'œstrogènes le jour de l'insémination est aussi associée à une perte embryonnaire précoce MEP (Shore et al 1998).

On comprend des études énoncées autour du problème, de la LH et du rapport E2/P4 au moment et pendant le traitement de superovulation ; que ces paramètres représentent les facteurs sine qua non directs affectant la réponse de la superovulation, de plus la superovulation laisse comprendre que c'est une méthode de maîtrise de la dynamique folliculaire, phénomène physiologique est caractérisé de plusieurs vagues folliculaires ; (3 en moyenne) (Ennuyer 2000 ; Ginther et al., 1989, Shaw et al., 1995) ; ceci selon deux processus qui sont la croissance et l'atréxie folliculaire (Shaw et al., 1995). Durant c'est vague un ou plusieurs follicules dominants (FD > 8 mm) surviennent dans chaque cohorte, ceux sont des supprimeurs du développement des follicules subordonnés. En pratique le traitement de la superovulation débute entre J8 et J12 post-œstrus (cycle normal), durant cet intervalle on assiste à une perte de dominance selon Roche (1996), en effet, il est connu que le développement maximal du FD (non ovulatoire) se situe au 7<sup>ème</sup> – 8<sup>ème</sup> jour et entre 15<sup>ème</sup> – 16<sup>ème</sup> jour postœstrus (animaux à 3 vagues) (Peters et Benboulaid, 1998).

Néanmoins, dans la littérature différents auteurs ont affirmé l'effet négatif du follicule dominant dans la réponse de la superovulation (Adams et al., 1994 ; Guilbault et al., 1991 ; Nasser et al., 1993 ; Stock et al., 1996 ; Huhtinen et al., 1992 ; Manik et al., 1998) et même chose pour les cycles maîtrisés (Staigmiller et al., 1995) ; or que d'autres chercheurs n'ont pas vu de différence dans l'absence ou la présence du FD, au début du traitement à la FSH (Maciel et al., 1995). Ainsi pour la majorité ils préconisent l'ablation du FD pour débiter le traitement de la superovulation, garantissant une amélioration des résultats (Guilbault et al., 1996 ; Shaw et Good, 2000 ; Brogliatti et al., 1997 ; Baracaldo et al., 2000), pour cela l'ablation est faite soit par la méthode physique grâce à la technique échoguidée via la voie transvaginale « OPU », ou soit par la méthode chimique (E2/P4).

Enfin, il est intéressant de signaler que les animaux traités pour la superovulation, sont logés près d'un aéroport à grand trafic, ceci permet d'en déduire l'état de stress constant des animaux au moment du traitement gonadotrophique ; on en déduit :

Une surstimulation de l'hypothalamus (CRF) et de l'hypophyse en faveur de l'ACTH pour lutter contre ce stress chronique grâce au syndrome d'adaptation ; de ce fait une sur-activation de la glande surrénale qui libère ainsi les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes ; puisque, des études récentes ont prouvé que l'ovaire (du rat et de l'homme) est aussi un organe cible pour les glucocorticoïdes, ce qui altéreraient le développement folliculaire normal (Tetsuka et al., 1999).

D'autres études récentes ont démontré l'effet néfaste du « heat stress », Lew et al. (1993) et ont rapporté que ce type de stress compromet la cascade enzymatique de la stéroïdogénèse dans la thèque cellulaire du FD. Une autre étude de Ryan et al. (1993) sur les réponses de superovulation de vaches Holstein sous une température conditionnée durant les chauds mois d'été, a donné malgré

cela, des résultats plus faible que se d'hiver, il est de même pour le taux de conception de la Holstein en lactation recevant des embryons collecté durant le « non heat stress », qui est plus élevé que celle ayant été stressées par le « heat stress », lors d'une étude durant l'été floridien (Floride) (Drost et al., 1999).

Des travaux de certains chercheurs, avaient revu les effets du stress sur les performances reproductive des animaux de ferme ; ils ont conclu, qu'une exposition aux stressons (environnementaux, du management, ...etc.) durant la période précoce du post-partum ou immédiatement après pic de LH, découlaient d'une suppression maximale de sécrétion de gonadotrophines.

Sur la base de notre expérimentation, nous avons touché aux différentes facettes de la superovulation ; les mettant ainsi sous lumière de nombreuses études et travaux de recherches, et montrant la complexité du phénomène de superovulation contrôlé par plusieurs couches de régulation, en conséquence ceci nous montre la nécessité d'adapter un protocole de traitement spécifique pour chaque cas possible et en développé des schémas expérimentaux applicable sur le terrain, dans le seul objectif est la production d'embryons en nombres et en qualités.

## VI. Conclusion :

Notre étude a porté sur l'une des biotechnologies embryonnaires les plus récentes et les plus étudiées dans le monde scientifique, nommé superovulation : et qui définit une technique biotechnologique, permettant de produire plusieurs ovocytes ou embryons d'une vache d'élite par opposition à ce qui se fait naturellement c'est-à-dire 1 embryon par cycle œstral d'une durée de 21 jours chez les bovins. En terme plus pointu, la superovulation est un traitement qui permet de shunter les phases de sélection, de dominance et donc d'inhiber l'atrésie folliculaire consécutive à ces deux phases ; ce traitement comprend une hormonothérapie à base de deux gonadotrophines hypophysaires FSH et LH.

En effet on comprend que le but primordial de la superovulation est d'augmenter au maximum le nombre d'ovules pondues (au delà de la physiologie de l'espèce) ainsi de réduire le gaspillage du pool ovocytaire non renouvelable de l'ovaire à cause de l'atrésie folliculaire processus du moins naturel, et cela surtout pour les animaux de haute qualité génétique.

Notre expérimentation a concerné 12 animaux d'une ferme laitière ayant un état d'embonpoint relativement bon au début. Ces derniers sont des bovins femelles ayant un intervalle d'âge de 2 à 4 ans, sélectionnés après tout une batterie de tests cliniques y compris un suivi pendant une période moyenne (un cycle environ) ; postérieurement on procédé à la formation de 4 lots et la mise en place du traitements de synchronisation avec utilisation de progestatifs de synthèses. Durant une période précise du cycle nous avons commencé notre protocole superovulatoire caractérisé par des injections répétées d'hormones gonadotrope hypophysaires purifiées (FSH et LH), ensuite des inséminations ont été faites ; au 7<sup>ème</sup> jour de l'oestrus nous avons commencé la récolte embryonnaire, selon la technique du flushing (non chirurgicale).

Les produits et liquides de récoltes ont été traités au laboratoire pour en séparer les embryons, ainsi une appréciation a été pratiquée directement sur l'animale (l'intensité des chaleurs, la réponse ovariennes) et sur le produit de chaque vaches (classification et dénombrement des embryons et ovocytes).

On peut conclure enfin que notre expérimentation, a arboré des résultats très positif car elle nous a permis d'éclaircir un domaine récent de la biotechnologie de reproduction, de ce fait son introduction et son exploitation dans nos élevage, ainsi de tirer partie de ses bénéfices sur notre production locale.

C'est résultat se sont traduis par des bonnes réponses superovulatoires ; en réaction à notre protocole : traitement à bases de gonadotrophines hypophysaires, elles ont ensuite été appréciées par la réaction ovarienne, déterminée via la palpation des ovaires, en plus d'une confirmation échographique pour certains animaux. Néanmoins lors de la récolte des produits, le taux d'infécondité et de mortalité embryonnaire précoce (dégénérescence) était élevé ; pour cela la littérature en parle largement en apportant des explications très convaincantes armées de preuves irréfutables, de ce fait, le rendement en embryons viables ne sont pas complètement maîtrisés à nos jours (Amstrong, 1993; Mapletoft et al, 1994), d'où les réponses sont variables et peu prévisibles

On citera les problèmes ou les facteurs suivants :

Le problème majeur dans notre pays, est vraisemblablement la sous alimentation et dont son influence est énorme sur la reproduction normale des animaux (mono-ovulation, encore plus la superovulation)

Le suivant, est le taux élevé d'ovocyte non fécondé ; celui-ci été peut être du un problème de maturation folliculaire, seulement la confirmation ne pourra se faire qu'après une étude moléculaire (nucléaire et cytoplasmique).

Le dernier, c'est le défaut d'expérience et de la technicité lors de la récolte embryonnaire selon le flushing, et dont on peut contrecarrer par des stages et des formations dans les technique de TE. N'empêche qu'on a trouvé la sonde allemande beaucoup plus facile à maîtriser et d'une maniabilité supérieure à la Cassou, cette observation ne reste qu'une constatation de terrain.

Alors on comprend que la superovulation comme phénomène artificiel nécessite de profonde investigation sur le terrain, spécialement dans notre pays et selon nos propres facteurs influençant, de ce fait plusieurs études complémentaire sont nécessaire pour isoler et comprendre les paramètres les plus actifs sur cette technique, cette compréhension permettra de trouver les moyens les plus efficaces pour juguler les facteurs néfastes aux traitements superovulatoires.

Donc la biotechnologie de la superovulation s'appuie sur le dogme de la physiologie de reproduction, c'est-à-dire sur la dynamique folliculaire (développement folliculaires, la régulation folliculaire), laquelle reste jusqu'à ce jour encore mal comprise, et ce malgré les découvertes récentes dans ce domaine ; tels que le phénomène de vagues folliculaires, la régulation hormonale entre l'hypothalamus – l'hypophyse – l'ovaire, la dominance folliculaire, la sélection et l'atrésie.

En conclusion, la superovulation est jalonnée par des phénomènes intimes de l'ovaire, donc soumise à de nombreux niveaux de contrôle et de régulation, ce qui lui confère une grande difficulté dans sa maîtrise à cent pour cent, en effet la superovulation reste une technique complexe avec des points encore sombres et dont la recherche ne se lasse pas d'élucider.

## VII. Recommandation & Perspectives :

Dans notre étude de la superovulation, les résultats obtenus sur les génisses et les vaches laitières nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux liés aux traitements de superovulation. Plusieurs facteurs limitants cités précédemment pourraient être jugulés afin d'augmenter et améliorer les réponses superovulatoire.

En effet, les intérêts de la superovulation sont aussi vastes que l'insémination artificielle même plus vaste, surtout par l'intermédiaire du MOET, programme mis en œuvre par Nicholas et Smith (1983) et qui est en fait, un schéma de sélection génétique basé sur l'ascendance, dont les progrès génétiques sont rapides, proposé en France par Colleau (1998), vu son gain dépassant celui du Progeny test. Donc il nous incombe de maîtriser cet impératif moderne qui pourrait apporter la relance agronomique tant attendue par notre pays

Nos Recommandations pour les études futures et pour l'exploitation de la superovulation sont :

1. Une bonne alimentation des animaux traités.
2. Elimination du stress et ces stressons.
3. Utilisation d'une semence de bonne qualité biologique.
4. Utilisation du matériel adéquat.
5. Utilisation d'hormones de haute qualité.

Ceci à terme permettrait de systématiser l'utilisation de la superovulation et du transfert d'embryon dans nos meilleurs élevages, seule méthode à même de nous permettre de rattraper le retard génétique de nos cheptels dont l'importance économique n'est plus à démontrer.

Enfin, comme perspective future de recherche on pourrait citer :

1. Le protocole et son adaptation avec nos exigences en algérie.
2. L'utilisation de la superovulation que sur les meilleurs élevages.
3. L'amélioration de la technique de récolte par des stages et des formations adéquats.

Une dernière question reste à poser :

*L'utilisation de la superovulation pour améliorer nos cheptels. Il était temps !*



## Références :

1. Adams, G.P., 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 1994; 41: 19-24. In: Shaw, D.W., Good, T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1521-1528.
2. Armstrong D.T. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*. 39, 7-24.
3. Armstrong D.G. and Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*, 2, 139-146.
4. Ashworth, C.J., 1994. Nutritional factors related to embryonic mortality in domestic species. In: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
5. Assey, R.J., Hyttel, P., Greve, T. And Purwantara, B., 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development* 37: 335-444. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*, Vol. 1. 1996.
6. Atherton D, 1994. The effect of mineral nutrition on bovine fertility with particular reference to embryo transfer. In : Merieux Ch (ed) - 1 Oème Colloque Scientifique de l'A.E.T.E., 9-10 septembre 1994, Lyon, France. pp. 105-114.
7. Babiuk L.A., Phillips J.P., 1989. *Animal biotechnology, comprehensive biotechnology*. 1st Supplement. Pergamon Press, Oxford, 260 p.
8. Bao B, Garveric HA. Expression of Steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, 1998, 76, 1903-1921.
9. Baracaldo, M.I., Martinez, M.F., Adams, G.P., Mapletoft, R.J. 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenologie* 53: 1239-1250.
10. Beam S.W, Butler W.R Energy balance, metabolic hormones and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81, 121-131.
11. Beam S.W., Butler W.R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.*, 1997, 56, 1331-1342.
12. Bellows, R.A., Staigmiller, R.B., Wilson, J.M., Phelps, D.A. and Darling, A. 1991. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology* 35, 1069-1082.
13. Bendell J.J., Dorrington J.H., Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1990, 127, 533-540. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
14. Bergfelt, D.R., Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A. and Mapletoft, R.J. 1994. Synchronization of follicular wave emergence for superovulation in cattle. *Journal of Animal Science* 72 (Suppl. 1)/*Journal of Dairy Science* 77 (Suppl. 1), 81.
15. Birnie, L.M., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S.M., Watt, R.G. and Dolman, D.F. 1995. Effects of gonadotrophin releasing hormone agonist treatment on oestrous cycle length and superovulatory response in maiden heifers. In *Proceedings of the British Society of Animal Science (Winter Meeting)*, paper 141.
16. Blanchard, T., Ferguson, J., Love, L., Takeda, T., Henderson, B., Hasler, J. And Chahupa, W., 1990. Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research* 51, 905-908. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*, Vol. 1. 1996.
17. Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft RJ, 1992. Estrogen suppression of the dominant follicle in heifers. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*. LaHaye, Pays-Bas. pp. 196-198.
18. Bo G.A., Adams G.P., Nasser L.F., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1993. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, 40, 225-239.
19. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Caccia M, Tribulo HE, Mapletoft RG, 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestagen implant. *Theriogenology* 41: 1555-1569.
20. Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A. and Mapletoft, R.J. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31-40.
21. Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1996. Effect of progesterone plus oestradiol-17 $\beta$  treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 45: 897-910. In Baracaldo, M.I., Martinez, M.F., Adams, G.P., Mapletoft, R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenologie* 53: 1239-1250, 2000.
22. Boichard D., Manfredi E., 1995. Analyse génétique du taux de conception en population Holstein. *Elevage et Insémination*, 269, 1-12. (23 millions en Europe, dont 5 millions en France en 1995)
23. Boland MP, Roche JF, 1993. Embryo production : alternative methods. *Mol Reprod Dev* 36: 266-270. In : Combarrous Y, Volland-Nail P, 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
24. Boland, M.P., Goulding, D., Roche, J.F. 1991. Alternative gonadotropins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 1991; 35:5-17. In: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43: 41-50, 1995.
25. Boland, M.P., Pearse, K., Ramsbottom, G., Crosby, F., Roche, J.F., 1994. Factors affecting superovulation in cattle and sheep. *First European Conference on: Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep*. Krakow, Poland, 1994: 103-110. In: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
26. Boland, M.P., Roche, J.F., 1992. Embryo production in vivo. Problems and Prospects. The proceedings of 1st international congress of embryo transfer in Milan, Italy, pp. 195-206. In: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
27. Bonnet, S. and Manciaux, L. 1995. Influence of superovulation treatment on fertility and fecundity of Montbeliard dairy cows. In *Proceedings of the 11 th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*, p. 134.
28. Botero-Ruiz, W., Laufer, N., DeCherny, A.H., Polan, M.L., Haseltine, F.P., Behrman, H.R., 1984. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil. Steril.* 1984; 41:820-826. In: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
29. Bousquet, D., Fiser, P.S., Menard, D.P., Hackett, A.J. and Grasso, F. 1993. Viability of 8- to 16-cell bovine embryos collected from superovulated cows on day 7. *Theriogenology* 39, 193.
30. Bousquet, D., Milovanov, C., Bell, J. C., Durocher, J. and Smith, L. C. 1995. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes

31. Breuel, K.F., Baker, R.D., Butcher, R.L., Townsend, E.C., Inskoop, E.K., Dailey, R.A. and Lerner, S.P. 1991. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology* 36, 241-255.
32. Briois M, Belloc JP, Brebion A, Guerin Y, Cagnie Y, 1992. Increased embryo production in superovulated elite Lacaune ewes pretreated with a GnRH agonist. In : Merieux Ch (ed) : 8ème Colloque Scientifique de l'A.E. T.E., septembre 1992, Lyon, France. p. 132 (Abstr.).
33. Brogliatti, G.M., D.F. Salamone, and G.P. Adams. 1997. Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. *Theriogenology* 47:1253-1264.
34. Brown, C.M., Axford, R.F.E., Williams, G., Wilson, I.B.H. and Owen, J.B. 1991. The effect of season and suckling on embryo quality from superovulated Welsh Black cows. *Animal Reproduction Science* 25, 181-187.
35. Bruneau G., Vaisse C., Caraty A., Monget P. La leptine: une clé pour la reproduction, *Medecine/Sciences*, 1999, 15, 191-196.
36. Bungartz L, Niemann H, 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fert* 101: 583-591.
37. Caldani M, Caraty A, Pelletier J, Thierry JC, Tillet Y, 1993. LH pulsatile release and its control. In Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds): *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, Paris pp 79-96.
38. Calder, M.C. and Rajamahendran, R. 1992. Follicular growth, ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the estrous cycle. *Theriogenology* 38, 1163-1174.
39. Callesen, H., Bak, A. and Greve, T. 1994. Embryo recipients: dairy cows or heifers. In: *Proceedings of the 10th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Lyon)*, pp. 125-135.
40. Callesen, H., Greve, T. and Hyttel, P. 1993. Estrus characterization in superovulated cattle. *Theriogenology* 40, 1259-1267.
41. Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P., 1987. Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogenology* 1987; 28: 155-166. In: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey, R., 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 41-50
42. Callesen, H., Lovendahl, P., Bak, A. and Greve, T. 1995. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *Journal of Animal Science* 73, 1539-1543.
43. Canseco, R.S., Gwazdauskas, F.C., Toole, R.J., Rajamahendran, R., Whittier, W.D. and Vinson, W.E. 1992. A retrospective study on the effects of FSH and prostaglandin on superovulation responses in dairy cattle. *Virginia Journal of Science* 43, 325-331.
44. Cerbito, W.A., Quero, F.V., Jr, Balagapo, C.R., Jr, Miyazawa, K. and Sato, K. 1994. Spatial distribution of progesterone in bovine uterus in relation to corpus luteum location and function. *Theriogenology* 41, 1663-1671.
45. Chemineau P., Cognié Y., Heyman Y. 1996. *Maîtrise de la reproduction des mammifères d'élevage*. 1996, INRA Prod. Anim., hors série. 5-15.
46. Chene, N., et Martal, J., 1996. Contrôle du développement embryonnaire et reconnaissance maternelle de la gestation. *Le Point Vétérinaire*, Vol. 28, (numéro spécial) *Reproduction de Ruminants*. 1996, pp. 57-66 (901-910).
47. Chupin D, Procureur R, 1983. La stimulation de l'ovaire pour produire des embryons chez les bovins. In : Saumand J. *Superovulation chez les bovins. Actualités et perspectives*. AETE. 1987
48. Chupin D. 1985. Applications pratiques du transfert d'embryons chez les bovins. *Elevage & Insémination* 26 3-6. In : Combarrous Y, Volland-Nail P. 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
49. Chupin D. 1988. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. *Colloque Soc Fr Etude de Fertilité* 26: 213-232. In : Combarrous Y, Volland-Nail P. 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
50. Colleau J.J., Heyman Y., Renard J.P. 1992. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.*, 11, 41-56.
51. Combarrous Y, Volland-Nail P. 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
52. Combarrous Y. 1994. Structures et relations structure-activité des médiateurs. In: *Lavoisier Tec and Doc. (Eds), Biochimie des communications cellulaires. Médicales Internationales: Cachan Cedex, France*, 33-61.
53. Coulthard, H. 1991. On farm embryo transfers in cattle. In *Practice* 13, 16-22. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
54. Courot M., Volland-Nail P. 1991. *Conduite de la reproduction des mammifères domestiques : présent et futur*. Cahiers d'études et de recherche francophones Agricultures.
55. Cumming, I., Friend, A. and Aguma, C.O. (1994) Use of indigenous breeds of cattle and their crosses in Uganda as recipients for imported Bos Taurus embryos. *Tropical Animal Health and Production* 26, 119-126.
56. De La Sota R.L., Lucy M.C., Staples C.R., Thatcher W.W. 1993. Effect of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 1002,1013.
57. De Leeuw, A.M. 1992. Number and viability of embryos collected in vivo or from the excised uteri of slaughtered donor cows. *Theriogenology* 37, 907-913.
58. De Leeuw, A.M. 1996. Evaluation of uniformity among persons in embryo grading from video recordings. *Theriogenology* 45, 230.
59. De Loos, F.A.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. and Kruij, T.A.M. 1991. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology* 35, 537-546.
60. De Ruigh, L., Pearson, R.E. and Van Wagtenonck-De Leeuw, J.A.M. 1995. Are "permanent donor cows" permanent donor cows? In *Proceedings of the 11th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*, p. 158.
61. De Ruigh, L., Van de Streek, G. and Van Wagtenonck-de-Leeuw, A.M. 1996. The effect of removal of the dominant follicle prior to superovulation on embryo yield. *Theriogenology* 45, 363.
62. Delacharlerie PF, Manciaux L, Charreaux F, Marie M, 1995. Relationships between diet and response to superovulation in dairy cows. In : Merieux Ch (ed) : *10ème Colloque Scientifique de l'A.E.T.E.*, 8-9 septembre 1995, Hannover, Allemagne. p. 160 (Abstr.).
63. Desaulniers, D.M., Lussier, J.G., Goff, A.K., Bousquet, D. and Guilbault, L.A. 1995. Follicular development and reproductive endocrinology during a synchronized estrous cycle in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. *Domestic Animal Endocrinology* 12(2), 117-131.
64. Dieleman, S.J. and Bevers, M.M. 1993a. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. *Molecular Reproduction and Development* 36, 271-273. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
65. Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Vos, P.L.A.M. and de Loos, F.A.M. 1993b. PMSG/antiPMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 39, 25-41.
66. D'Occhio M.J., Fo Fordyce G., Whyte TR., Aspden W.J., Trigg T.E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 60, 433-442.
67. D'Occhio M.J., Sudha G., Jillella D., Whyte T., MacLellan L.J., Walsh J., Trigg T.E., Miller D. Close synchrony of ovulation in superstimulated heifers that have a downregulated anterior pituitary gland and are induced to ovulate with exogenous LH. *Theriogenology*: 1998, 49, 637-644.

68. Domanski E, Chomicka LK, Ostrowska A, Gajewska A, Mateusiak K, 1991. Release of luteinizing hormone-releasing hormone, beta-endorphin, noradrenaline by the nucleus infundibularis/median eminence during periovulatory period in the sheep. *Neuroendocrinology* 54: 151-158.
69. Donaldson LE. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology* 22: 205-212. IN: Combarrous Y, Volland-Nail P, 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
70. Dovgopol, V, Ostashko, F. and Issachenko, V. 1995. Preparation (Prolongone) for superovulation in cows by embryo transfer. In *Proceedings of the 11 th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*, p. 166.
71. Driancourt M.A., Bodin L., Boomarov O., Thimonnier J., Elsen J.M. 1990. Number of mature follicles ovulating after a challenge of human chorionic gonadotrophin in different breeds of sheep at different physiological stages. *J. Anim. Sci.* 68, 719-721
72. Driancourt M.A., Gougeon A., Royere D., Thibault C. 1991a. La fonction ovarienne. In Thibault C, Levasseur MC. INRA (Edts). «La reproduction chez les mammifères et l'homme». INRA: 273-298.
73. Driancourt M.A., Thatcher W.W, Terqui M., Andrieu D. 1991b. Dynamics of Ovarian Follicular Development in Cattle during the Estrous Cycle, Early Pregnancy and in Response to PMSG. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 8, 209-221.
74. Driancourt, M.A., Thuel, B. 1998. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod. Nutr. Dev.* 38(1998) 345-362.
75. Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
76. Drost, M., Ambrose, J.D., Thatcher, M., Cantrell, C.K., Wolfsdorf, K.E., Hasler, J.F., Thatcher, W.W., 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 1999; 52: 1161-1167.
77. DuFour J.J., Mermillod P., Mariana J.C., Romain R.F. The effect of a GnRH agonist on follicular dynamics and response to FSH stimulation in prepubertal calves. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1999, 39, 133-144.
78. Dyer C.J., Simmons J.M., Matterl R.L., Keisler D.H. 1997. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest. Anim. Endocr.* 14, 119-128.
79. Enmyer, M., 2000. Les vagues folliculaires chez la vache : Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction. *Point Vét.* 2000, 31 (209) 377-383.
80. Erickson G.F., Hsueh A.J.W. 1978. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 102, 1275-1282. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
81. Evans, G. 1991. Application of reproductive technology to the Australian livestock industries. *Reproduction, Fertility and Development* 3, 627-650.
82. Farin, P.W, Britt, J.H., Shaw, D.W. and Sleming, B.D. 1995. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 44, 339-349.
83. Findlay J.K. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, 1993, 48, 15-23.
84. Findlay J.K., Sai X., Shukovski L. Role of inhibin related peptides as intragonadal regulators. *Reprod. Fert. Develop.*, 1990, 2, 205-218. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
85. Fortune J. E., Sirotis J., Turzillo A. M., Lavoit M. Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert.* 1991. *Suppl.*, 43, 187-198.
86. Fortune J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle - A Limiting factor in improvement of fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 33, 111-125.
87. Fortune J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, 1994, 50, 225-232.
88. Friedman, R., Lais, T., Weber, D.W., Stormshake, F., 1994. Responses of the bovine infundibulum to noradrenaline during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 101, 311-315. IN: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
89. Galli, C., Lazzari, G., 1994. Large scale production of bovine embryos. First European Conference on: Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep. Krakow, Poland, 1994: 111-116. IN: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Haier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
90. Garcia-Bojalil, C.M., Staples, C.R., Thatcher, W.W. And Drost, M., 1994. Protein intake and development of ovarian follicles and Embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy science* 77, 2537-2548. IN: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, 1996.
91. Ginther O.J., Kastelic J.P., Knopf L. composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 1989, 20, 187-200. IN: Hanzen CH., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : 1. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 223-235.
92. Gong, J. G., Bramley, T and Webb, R. 1991. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biology of Reproduction* 49, 941-949. IN: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
93. Gong, J.G., Bramley, T.A. and Webb, R. 1993a. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 97, 247-254.
94. Gong J.G., Mc Bride D., Bramley T., Webb R. 1993b. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-1 and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrin.*, 139, 67-75.
95. Gong, J.G., Armstrong, D.G., Baxter, G., Garnsworthy, P.C. and Webb, R. 1999. The effect of increased diet ary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, Abstract Series No.23:22.
96. Gonzalez, A., Wang, H., Carruthers, D.T., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., 1994a. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin. Effects of does and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* 35, 158-162. IN: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48 (1997) 137-157.
97. Gonzalez, A., Wang, H., Carruthers, D.T., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., 1994b. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Therio.* 41, 1631-1642. IN: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
98. Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
99. Gordon, I., 1975. Problems and prospects in cattle egg transfert. *Ir. Vet. J.* 29, 21-30. IN: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
100. Gosselin, N., Price, C.A. and Carriere, PD. 1995. Decreased LH pulse frequency in superovulated heifers during the luteal phase: evidence for negative feedback other than progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility (Abstract Series)* 15, 17.

101. Goulding, D., Williams, D.H., Roche, J.F. and Boland, M.P. (1994) Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 505-510.
102. Gradela, A., Esper, C.R. And Rosa e Silva, A.A.M., 1996. Plasma concentrations of progesterone, 17 $\beta$ -estradiol and androstenedione and superovulatory response of nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. *Theriogenology* 45: 843-850, 1996.
103. Grasso F., Guilbault IA, Roy GL, Lussier JG, 1989. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 31: 1209-1220. In: Combarrous Y, Volland-Nail P. 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
104. Gray, B.W., Stringfellow, D., Riddell, M., Riddell, K., Davenport, G. and Wright, J. 1993. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 39, 227.
105. Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43, 41-50.
106. Guilbault, L.A. 1991. The influence of the presence of a dominant follicle on superovulatory response in Holstein heifers. *Bulletin-Agriculture Canada, Research Branch, no. 14*: 25-27. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
107. Guilbault, L.A., Kohram, H., Twagirumungu, H., Bousquet, D., Dufour, J.J., 1996. Control of follicular dominance and synchronization of follicular waves to improve superovulation in cattle. 12<sup>e</sup> Réunion A.E.T.E.- Lyon, 13-14 Septembre 1996.
108. Hackett, A.J. and McAllister, A.J. 1992. Effect of two superovulation treatments on subsequent fertility in the confined dairy cow. *Theriogenology* 38, 833-841.
109. Hamilton T. et Stark D. La fertilité du taureau de boucherie. Fiche technique. 01/1990. ISSN 1198-7138.
110. Hammond J.M., Mondschein J.S., Samaras S.E., Smith S.A., Hagen D.R. The ovarian insulin-like growth factor system. *J. Reprod. Fert.*, 1991, 43, 199-208. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
111. Hamssens R.M., Brus L., Cahill D.J., Huirne J.A., Schoemaker J., Lambalk C.B. 2000. Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod. Update.*, 6, 505-518.
112. Hanzen CH., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : 1. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 144, 223-235.
113. Harple JG, Metz CN, Kojimi S and Riskin D, 1992. Control of transforming growth factor- $\beta$  activity. Latency versus activation. *Progress in Growth Factor Research*. 4: 321-335. In: Armstrong David G and Webb Robert. 1997. *Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factor and novel proteins*. *Reviews of Reproduction* 2: 139-146.
114. Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lanthrop, W.E and Foote, R.H. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27, 139-168. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
115. Hasler, J.E., 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 75, 2857-2879. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*, Vol. 1. 1996.
116. Hay, J.H., Phelps, D.A., Hanks, D.R. and Foote, W.D. 1990. Sequential uterine horn versus simultaneous total flush to recover bovine embryos nonsurgically. *Theriogenology* 33, 563-567.
117. Herrler, A., Elsaesser, F. and Niemann, H. 1990. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 33, 415-422.
118. Herrler, A., Einspanier, R., Schanis, D. and Niemann, H. 1994. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 41, 601-611.
119. Heyman Y., Chesne P., Le Bourhis D., 1996. Le clonage et le sexage embryonnaire : recherches et perspectives d'applications chez les bovins. *Le Point vét.* 28, *Reproduction des ruminants, N° spécial*, 29-36.
120. Hill, B. R. and Kuehner, L. F. 1996. Follicle aspiration prior to superovulation in catc a field study. *Theriogenology* 45, 324.
121. Hirshfield A.N. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo, *Biol. Reprod.*, 1989, 40, 181 - 190. IN: Hanzen CH., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : 1. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 223-235.
122. Hirshfield A. N. Development of follicles in the mammalian ovary, *Intern. Rev. Cytol.* 1991, 124, 43- 101.
123. Hockley DK, Bo GA, Palasz AT, Del Campo MR, Mapletoft RJ, 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of follitropin in the cow. The effect of dose and site of injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 39: 331 (Abstr.).
124. Hoesenecht K.L., Portocarrero C.P. 1998. Leptin and its receptors: regulators of whole body energy homeostasis. *Domestic. Anim. Endocrinol.*, 15, 457-475.
125. Holy, L., Lopatarova, M. and Krontorad, P. 1988. The quality and stage of development of cattle embryos in relation to their survival in vivo following an ipsilateral non-surgical transfer. *Veterinari Medicina* 33, 577-588. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
126. Hughes F.M., Gorospe W.C. 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 129, 2415-2422.
127. Huhtinen M, Raino V, Aalto J, Bredbacka P, Maki-Tamila, 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 37: 457-463.
128. Hulshof S.C.J, Figueredo J.R., Beckers J.F., Bevers M.M, Ven Den Hurk R. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet. Quarterly*, 16, 78-80.
129. Humblot P, Saunande J, 1993. Utilisations de la GnRH dans la stimulation de la fonction de reproduction chez les ruminants domestiques. In : *Medicaments, environnement et fertilité (32<sup>e</sup> Réunion de la S.F.E.F. Tours, France, 30 sept.-2 octobre 1993, N° spécial de Contracept. Fert. Sex. . pp. 1 OS- 111.*
130. Humblot P, Ródrigues JL, Nibart M, Silvestrini, Tiezzi FL, JeanGuyot N, Thibier M, 1994. Effet du mode de synchronisation des cycles sexuels sur la réponse hypophysaire et la fonction ovarienne après superovulation chez la vache. *Elevage & Insémination* 261: 7-18. In : Combarrous Y, Volland-Nail P. 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
131. Humblot P, Grimard B. 1996. Endocrinologie du postpartum et facteurs influençant le rétablissement de l'activité ovarienne chez la vache. *Le point vétérinaire*. 28, 73-81.
132. Humblot, P., Negrao, S. And Nibart, M., 1998. Effects of high energy supply and metabolic status on superovulatory response and embryo production in dairy heifers. *Theriogenology* 49: 378, 1998.
133. Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T., Schmidt, M., 1991. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 1991: 35:91-108. In: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
134. Ireland J.J, Roche J.F. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormone, steroids in follicular fluid and gonadotrophin receptors, *Endocrinology*, 111: 2077. IN: Hanzen CH., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : 1. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 223-235.
135. Janowitz, U. 1994. Studies on factors affecting embryos results in cattle. *Animal Breeding Abstracts* 63(6), 402.

136. Jimoh, A.G., Wise, D.L., Gresser, J.D., Foote, R.H., Rhodes, R.C., Underhill, L.H. and Trantolo, D.L. 1995. Pulsatile release of FSH for superovulation in cattle. *Theriogenology* 43, 645-656.
137. Jolly P.D., McDougall S., Fitzpatrick L.A., MacMillan K.L., Entwistle K.W. 1995. Physiological effects of under nutrition on postpartum anoestrus in cows. *J. Reprod. Fert.* 49, 477-492.
138. Kastelic J.P., Ko J.C.H., Ginther O.J. 1990. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology*, 34, 499-509.
139. Kastelic J.P., Ginther O.J. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim. Reprod. Sci.* 26, 13-24.
140. Kastrop, P.M.M., Huishof, S.C.J., Bevers, M.M., Destree, O.H.J., Kruip, T.A.M. 1991. The effects of  $\alpha$ -amanitin and cycloheximide on nuclear progression protein synthesis and phosphorylation during bovine maturation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1991; 28:249-254. In: Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. and Assay, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
141. Kawamata, M. 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 56(5), 965-967. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
142. Keisler D.H., Daniel J.A., Morrison C.D. 1999 the role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J. Reprod. Fert.* 54, 425-435.
143. Keita JB, 1995. Croissance folliculaire suivie par échographie et production d'embryons chez les vaches superovulées au cours d'un traitement progestatif initié à J9 ou J16 du cycle. *Maîtrise ès Sciences Vét.*, E.N.V. Toulouse, France. 63 p.
144. Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F., Boland, M.P., 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*. 46(1997) 1-14.
145. Kennedy, L.G., Boland, M.P and Gordon, I. 1983. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology* 19, 823-832. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
146. Kiess W., Siebler T., Englaro P., Kratzsch J., Deutscher J., Meyer K., Gallaher B., Blum W.F. 1998. Leptin as a metabolic regulator during fetal and neonatal life and in childhood and adolescence. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 11, 483-496.
147. Kohram, H., Carriere, P.D., Price, C.A., Durocher, J. and Guilbault, L.A., 1999. Alterations of LH release with delay of the LH surge affect embryo production in heifers superovulated with FSH. *Theriogenology* 61: 410.
148. Kruip, T.A.M., Van Beek, H., De Wit, A. and Postma, A. 1995. Quality of bovine oocytes in dairy cows postpartum: consequences for embryo production in vivo and in vitro. In *Proceedings of the 11th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*, pp. 113-119.
149. Kurtz, S.G., Dyer, R.M., Hu, Y., Wright, M.D., Day, M.L. 1990. Regulation of luteinising hormone secretion in prepubertal heifer fed an energy-deficient diet. *Biol. Reprod.* 43, 450-456. In: Kafri, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
150. Lafri, M., Nibart, M., Durand, M., Morel, A., Jeanguyot, N. and Humblot, P., 1999. Effect of interval between LH peak and first AI on quality in cattle. *Theriogenology* 61: 410, 1999.
151. Lamming, G.E. and Mann, G.E. 1993. Progesterone concentration affects the development of the luteolytic mechanism in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility (Abstract Series)* 11, 30.
152. Lange, H., Reichenbach, H.D., 1997. Bovine superovulatory treatments: Follicle stimulating hormone (FSH) preparations and superovulation treatment protocols as sources of variation in embryo transfer practice. *Arq. Fac. Vet. UFRGS. Porto Alegre*. V. 25. n. 1. 1997 (Supl.).
153. Langhout, D.J., Spicer, L.J. and Geisert, R.D. 1991. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol and gonadotrophins on cell proliferation, steroidogenesis and protein synthesis. *Journal of Animal Science* 69, 3321-3334.
154. Larocca, C.E., Fernandez, A., Gonzalez, A.F. and Carbo, A.A. 1995. The efficiency of different gonadotrophin preparations on the superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 43, 261.
155. Larson G.H., Mallory D.S., Dailey R.A., Lewis PE. 1991. Gonadotropin concentrations, follicular development and luteal function in pituitary stalk-transected ewes treated with bovine follicular fluid. *J. Anim. Sci.*, 69, 4104-4111.
156. Laurincik, J., Hyttel, P. Greve, T., 1993a. Character of preovulatory follicles and oocytes after different superovulatory treatments in heifers. *Theriogenology* 39, 545-551. In: Kafri, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
157. Laurincik, J., Oberfranc, M., Hyttel, P., Grafenau, P., Tomanek, M., Pivko, J., 1993b. Characterization of the periovulatory period in superovulated heifers. *Theriogenology* 39 : 537-544. In: Assay, R.J., Hyttel, P., Roche, J.F., Boland, M., 1994. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Molecular reproduction and Development* 39: 8-16 (1994).
158. Lavoie M, Fortune JE, 1990. Follicular dynamics in heifers after injection of PGF2 alpha during the first wave of follicular development. *Theriogenology*, 33: 270 (Abstr.).
159. Lew, B.J., Wolfenson, D., Median, R., 1993. Heat stress affect steroid content of follicular fluid and steroid production by granulosa and theca cells in the bovine dominant follicle. In: *Program of the annual meeting of the Israel Endocrine Society*. Tel Aviv. Abstract. 21. Cited by Wolfenson et al., 1995. *Biol. Reprod.*, 52, 1106-1113. in: Kafri, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
160. Libornussen, T., Makulska, J. and Callesen, H. 1995. Genetic responsiveness of dairy cattle to superovulatory treatment. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A (Animal Science)* 45(2), 99-105.
161. Lindner, G.M. and Wright, R.W., Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20, 407-416. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
162. Lindsell C, Rajkumar K, Manning AW, Emery SK, Mapletoft RJ, Murphy BD, 1986. Variability in FSH : LH ratios among batches of commercially available gonadotropins. *Theriogenology* 25: 167 (Abstr.)
163. Lohuis M.M., 1995. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, 43, 51-60. IN: Colleau, J.J., Heyman, Y., Renard, J.P., 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.*, 11, 41-56.
164. Lonergan, P. 1992. Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. PhD thesis, National University of Ireland, Dublin.
165. Lonergan, P., Carolan, C., Thuard, C., Marquant-Le Guienne, J.M. and Mermillod, B. 1995. Embryo transfer and sex ratio of resulting calves following bovine embryo production in vitro. In *Proceedings of the 11th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*, p. 202.
166. Lopez da Costa, L.F., Malaquias, O., Yaz, I. and Robalo Silva, J. 1995. Effect of superovulation on reproductive efficiency in Portuguese Mertolengo cattle. In *Proceedings of the 11th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*, p. 204.

167. Lopez-Gatius, F. 1995. Embryo survival following non-surgical embryo recovery in superovulated dairy heifers. *Journal of Veterinary Medicine (Series A)* 42, 105-110.
168. Lucy M.C., Savio J.D., Badinga L., De LA Sota R.L., Tatcher W.W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.*, 70, 3615-3026.
169. Lucy M.C. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, 83, 1635-1647.
170. Lussier J.G., Matton P., Guilbault L.A., Graso F., Mapletoft R.J., Carruthers T.D. 1994. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid treated and hemi-ovariectomized Heifers. *J. Reprod. Fert.* 102, 95-105.
171. Lussier, J.G., Lamothe, P. and Pacholek, X. 1995. Effects of follicular dominance and different gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* 43, 270.
172. Machel, M., Gustafsson, H. and Rodriguez-Martinez, H. 1995. Superovulatory response in lactating cows with different follicular dynamics. *Journal of Veterinary Medicine (Series A)* 42, 123-129.
173. Machel, M., Gustafsson, H., Rodriguez-Martinez, H. 1995. Superovulatory response in lactating cows with different follicular dynamics. *J. Vet. Med A.* 1995; 42: 123-129. In: Shaw, D.W., Good, T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1521-1528.
174. Malafosse A., 1995. L'insémination des différentes espèces animales dans le monde. Document UNCEIA. Paris.
175. Manik, R.S., Singla, S.K., Patta, P., Madan, M.L. 1998. Effect of presence of a dominant follicle on the superovulatory response in Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 50: 841-852.
176. Mantovani R, Enright WJ, Keane MG, Roche JF, Boland MP, 1993. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory responses in beef heifers. In : Merieux Ch. (ed) : 9ème Colloque Scientifique de l'A.E.T.E., 10-11 septembre 1993, Lyon, France. p. 234 (Abstr.).
177. Mapletoft R.J. 1986. Bovine embryo transfer. IN: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
178. Mapletoft, R.J., Pierson, R.A. 1993. Featured article: Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. *TETS Embryo Transfer Newsletter* 1993; 11: 15-24. In: Greve, T., Callesen, H., Hytel, P., Hoier, R. and Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
179. Mapletoft, R.J., Bo, G.A. and Pierson, R.A. 1994. Recruitment of follicles for superovulation. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 16(1), 127-130.
180. Martal J, Lacroix MC, Loudes C, Saunier M, Wintenberger-Torres S. 1979. Trophoblastin, an antihelolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fert.* 56:63-73.
181. Mazerbourg S., Zapf J., Bar R.S., Brigstock D.R., Monget P. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic degradation in bovine, equine, and porcine preovulatory follicles: regulation by IGFs and heparin-binding domain containing peptides. *Biol. Reprod.* 63, 390-400.
182. Mc Dougall S., Burke C.R., MacMillan K.L., Williamson N.B. 1995. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Research in Veterinary Science*, 58, 212-216.
183. McEvoy, T.G., Broadbent, P.J., Gebbie, F.E., Dolman, D.F., Wait, R.G. and Higgins, L.C., 1996. Progesterone profiles and superovulatory responses of Simmental heifers in relation to preovulatory energy intake and progesterone priming treatment. *Theriogenology* 45: 330. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*. Vol. 1. 1996.
184. McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Findlay, P.A., Palmer, R.M., Robertson, I.S., 1995. Dietary-induced suppression of preovulatory progesterone concentration in superovulated ewes impairs subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 89-107. In: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
185. Mehmood, A., Anwar, M., Ullah, N., Baig, S.M. and Wright, R.W., Jr. 1991. Pattern of sex steroid secretion and their relationship with embryo yield in Jersey cows superovulated with PMSG. *Theriogenology* 35, 513-520.
186. Miszkil, G., Skarzynski, D., Bogacki, M., Korwica, J. 1999. Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the corpora lutea of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 39 509-516.
187. Mojtaba K, Michael R, McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48 137-157.
188. Monget P, Momniaux D, Pisselet C, Durand P. 1995. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 132:14381446.
189. Momniaux D, Pisselet C. 1992. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulinlike growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod* 46:109-119.
190. Momniaux D., Monget P. Gonadotropines et régulations paracrines ovariennes. 1997. Intégration des mécanismes de régulation d'un processus physiologique complexe, la folliculogénèse ovarienne. In: Combarrous Y., Volland-Nail P. (Eds). *Les gonadotropines*. INRA. Paris, 267-284.
191. Momniaux D., Mandon-Pépin B., Monget P. 1999. L'arésie folliculaire, un gaspillage programmé. *Médecine/Sciences* 15 : 157-66
192. Moor R.M., Galli C. 1991. "Somatic cell and the G2 to M-phase transition in sheep oocytes." *Reprod. Nutri. Develop.* 31 In: Thibault C., Levasseur M.C. 1991. *Reproduction in mammals and man*. Ellipses, Paris.
193. Murphy, M.G., Enright, W.T., Crowe, M.A., McConnel, K., Spicer, L.J., Boland, M.P., Roche, J.F., 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fert.* 92, 333-338. In: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
194. Mutiga E.R. 1992. Use of embryo transfer technology to raise purebred dairy cows from zebu cattle. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa* 40, 135-136.
195. Nakamura T., Takio K., Eto Y. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*. 1990. 247, 836-838. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
196. Nasser, L.F., Adams, G.P., Bo, G.A., Mapletoft, R.J., 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-724. In: Shaw, D.W., Good, T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1521-1528.
197. Nauta, W., Lok, F. and Schuttler, B. (1994) In vitro culture of bovine embryos supporting embryo transplantation. In *Proceedings of the 10th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Lyon)*, p. 226.
198. Nestler J.E. 1997. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Hum. Repr.* 12: Suppl 1, 53-52.
199. Nibar T.M., Slimane N., Herrera R., JeanGuyot N., Mechekeur F., Humblot P., Thibier M., 1988. Variations des concentrations plasmatiques des hormones gonadotropes (FSH et LH) et stéroïdes (oestradiol 17β et progestérone) après différents traitements de superovulation chez la vache. *Elevage & Insémination* 226: 11-30. In : Combarrous Y, Volland-Nail P, 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.

200. Nibart M. 1991. Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées : bissection et sexage. *Rec Med Vet* 167: 261-290.
201. Nibart M., Marquant-Leguienne B., 1995. Productions d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. *Elevage et insémination*, 266, 1-23. Colleau J.J., Heyman Y., Renard J.P., 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *Prod. Anim. INRA*.
202. Nicholas F.W., 1996. Genetic improvement through reproductive technology. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 205-214. IN: Colleau, J.J., Heyman, Y., Renard, J.P., 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.*, 11, 41-56.
203. Nicholas, F.N. And Smith, C., 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfert and splitting. *Anim. Prod.*, 36: 341-353. In Seidel, G.E. And Seidel, S.M., 1991. *Training manual for embryo transfert in cattle*. FAO 1991.
204. Nicholas, F.W (1979) the genetic implications of multiple ovulation and embryo transfer in small dairy herds. In *Proceedings of the 30th annual Meeting of the European Association of Animal Production (Harrogate)*. CG 1. II. y. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International. UK.
205. Niemann, H. (1991) better results from the superovulation of donor cows. *Tierzuchter* 43, 34-35.
206. Nohner H.P., Hahn R. 1994. Successful embryo transfer. *Zuchtwahl und Besamung*. 131, 27-29. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
207. Nolan, R., Duffly, P., Wade, M., O'Callaghan, D. And Boland, M.P., 1998b. Effect of quantity and type of diet and frequency of transvaginal ovum aspiration on in vitro embryo development in heifers. *Theriogenology* 49: 382.
208. Nolan, R., O'Callaghan, D., Duby, R.T., Lonergan, P. And Boland, M.P., 1998a. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50: 1263-1274, 1998.
209. Oussaid, B., Lonergan, P., Khatir, H., Monniaux, D., Bekers, J.F., Cognie, Y. And Mermillod, P., 1998. Effect of prolonged follicular phase with GnRH antagonist on follicular atresia and oocytes developmental competence in superovulated heifers. *Proceedings 14th Meeting European Embryo Transfer Association (Venice)*: 224.
210. Overstrom, E.W. 1996. In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology* 45, 3-16.
211. Ozil J.P. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109, 107-117.
212. Park, R.L., Powell, K.L., Andrus, D.D., Bingham, W.W. and Wallentine, M.X. 1991. Conception rate and pregnancies per flush by herdsmen using embryo transfer in a large university herd: a six-year study. *Journal of Dairy Science* 74 (Suppl. 1), 199.
213. Parr, R., Davis, I.F., Miles, M.A., Squires, T.J., 1993. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.* 55, 306-310. In: Kafi, M., McGowan, M.R., 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48(1997) 137-157.
214. Peters H. The development and maturation of the ovary. *Ann. Biol. Bioch. Biophys.*, 1976, 16, 271-278. IN: Hanzen CH., Lourtie O., Drion P.Y. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : I. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 223-235.
215. Peters, A.R. and Benboulaid, M., 1998. Studies on timing of ovulation after synchronisation treatments in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 33, (1998).
216. Petr, J., Mika, J. and Jilek, F. 1990. The effect of PMSG-priming on subsequent superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 33, 1151-1155.
217. Picard-Hagen, N., Bergonier, D., Berthelot, X., 1996. *Maitrise médicale du cycle oestral chez la vache*. *Le Point Vétérinaire*, Vol.28, (numéro spécial) *Reproduction de Ruminants*. pp. 89-97 (933-941).
218. Pieterse MC, Vos Plam, Kruip ThAM, Wirth YA, Van Beneden TH, Willemse AH, Taverne MAM, 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35: 857862. IN: Combarous Y, Volland-Nail P, 1997. *Les Gonadotropines*. INRA, Paris.
219. Piurru, P. G. 1994. Embryo transfer in Piedmont cows after superovulation with PMSG/anti-PMSG and different FSH preparations in varying doses. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany, 91 pp.
220. Price, C.A., Carriere, P.D., Gosselin, N., Kohram, H. And Guilbault, L.A., 1999. Effects of superovulation. *Proceedings 15th Meeting European Embryo Transfer Association (Lyon)*:226.
221. Purwantana B, Schmidt M, Greve T, Callesen H, 1993. Follicular dynamics prior to and during superovulation in heifers. *Theriogenology* 40: 913-921.
222. Purwantara, B., Schmidt, M., Callesen, H. and Greve, T. 1994a. Follicular development and embryo recovery following 3 versus 8 FSH injections in heifers. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35(1), 89-93.
223. Purwantara, B., Callesen, H. And Greve, T., 1994b. Characteristics of ovulations in superovulated cattle. *Animal Reproduction Science* 37(1), 1-5. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*, Vol. 1. 1996.
224. Rajamahendran R, Calder MD, 1993. Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* 40: 99-109.
225. Rapoport, R., Sklan, D., Wolfenson, D., Shaham-Abalancy, A., Hamkoghlu, I. 1998. Antioxydant capacity is correlated with steroidogenie status of the corpus luteum during the bovine oestrous cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1380(1) 133-140. In: Miskiel, G., Skarzynski, D., Bogacki, M., Kotwica, J. Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the corpora lutea of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 1999, 509-516.
226. Roberge, S., Rieger, D. and Rawlings, N.C. 1995. Peri-ovulatory LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers. *Theriogenology* 44, 59-70.
227. Roberts, A.J., Grizzle, J.M. and Echterkamp, S.E. 1994. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology* 42(6), 917-929.
228. Robertson, L., Cattoni, J.C., Shand, R.I. and Jeffcoate, I.A. 1993. A critical evaluation of ultrasonic monitoring of superovulation in cattle. *British Veterinary Journal* 149, 477-484.
229. Roche J.F., Mihm M., Diskin M.G. 1997. Physiology and practice of inducing and control of estrus cycle in cattle, *Bovine Practitioner*, 31, 4-10.
230. Roche, J.F., 1996. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. *Journals of Reproduction and Fertility* 1, 19-27.
231. Rodrigues, C.F.M., Moraes, G.V, Becker, W.A.P, Carvalho, C. and Pinheiro, L. 1988. Qualitative and quantitative evaluation of embryo transfer in cattle. I. Performance of zebu and Bos Taurus cattle. *Revista do Centro de Ciencias Rurar* 18 (Suppl.), 42. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
232. Rodriguez, H.F., Nenendorff, D.A., Lewis, A.W., Chase, C.C., Jr and Randel, R.D. 1994. Endocrine and ovarian responses in beef cattle superovulated with two different FSH preparations. *Journal of Animal Science* 72 (Suppl. 1) *Journal of Dairy Science* (Suppl. 1), 373. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes*. Vol. 1, Cab International, UK.
233. Ryan, D.P., Spoon, R.A. and Williams, G.L., 1992. Ovarian follicular Characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating-hormone. *Journal of Animal Science* 70, 3505-3513. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes*, Vol. 1. 1996.



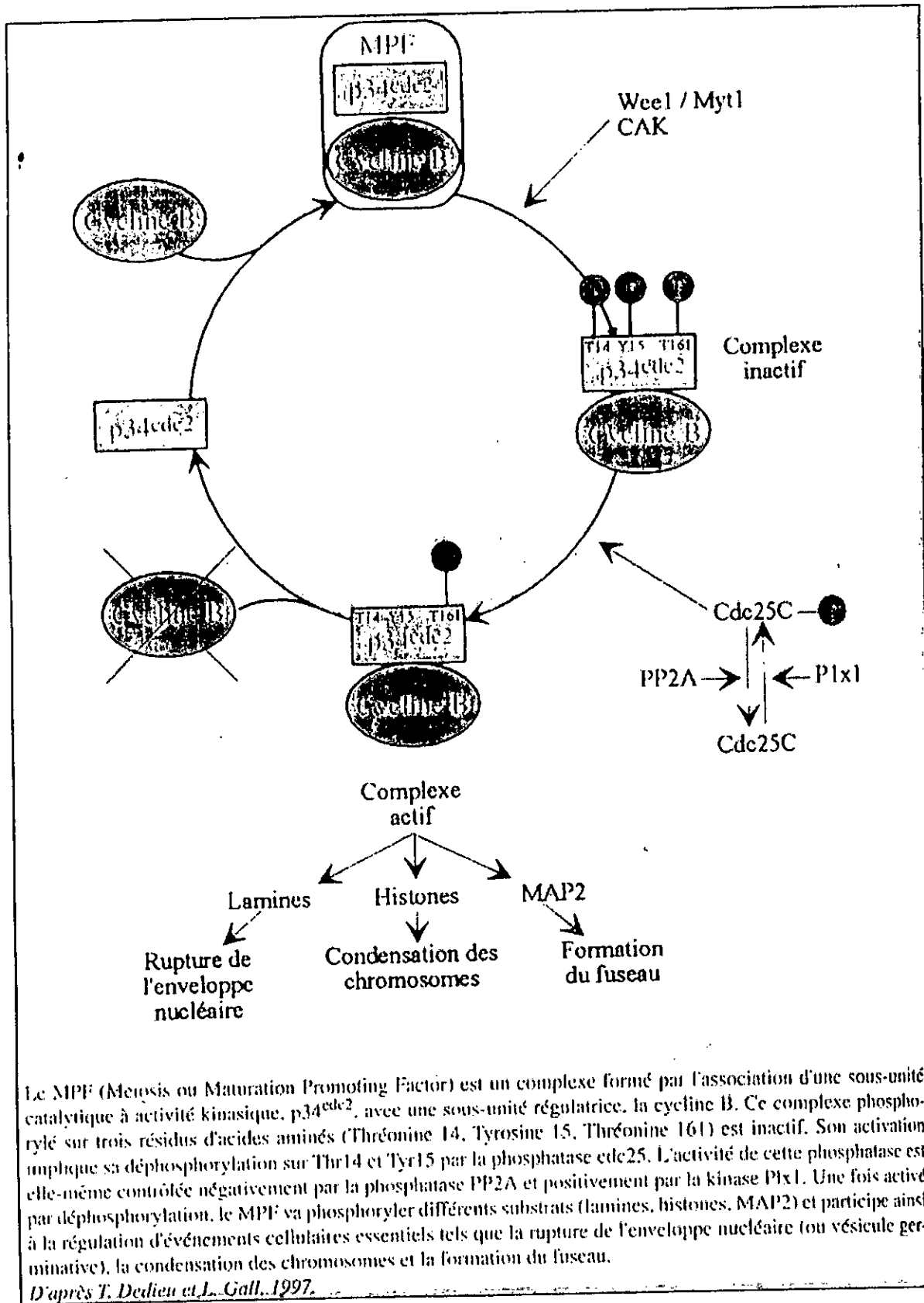
234. Ryan, D.P., Prichard J.F., Kopel, E., Godke, R.A., 1993. Comparing early embryonic death in dairy cow during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 1993; 39: 719-737. In: Drost, M., Ambrose, J.D., Thatcher, M., Cantrell, C.K., Wolfsdorf, K.E., Hasler, J.F., Thatcher, W.W., 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 1999; 52: 1161-1167.
235. Ryan D.P., Spoon R.A., Griffiths M.K., Williams G.L. 1994. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-1 relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. *Dom. Anim. Endocrinol.* 11, 161-174.
236. Saad M.F., Damanl S., Gingerich R.L., Riad-Gabriel M.G., KHAN A., Boyadjian R., Jinagouda S.D., El-Tawil K., Rude R.K., Kamdar Y. 1997. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 579-584.
237. Sahara, H., Shimura, O., Ezoe, K., Suzuki, T., Fukuoka, H., Takahashi, N., Sato, N. and Kikuchi, K. 1994. Superovulatory response during the period of decrease in the number of ultrasonographically identified follicles in postpartum beef cows. *Journal of Reproduction and Development* 40, 337-342.
238. Saumande J. 1991. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec Med Vet* 167: 205-218.
239. Saumande J. 1995. La production d'embryons chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? *INRA, Prod Anim* 8: 275-283.
240. Saumande, J., Morel, A., Touze, J.L., Nibart, M. And Humblot, P., 1998. Effects of plane of nutrition and daily weight gain (DWG) on embryo production after superovulation in
241. Savio J.D., Boland M.P., Hynes N., Roche J.F. 1990a. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 88, 569-579.
242. Savio J.D., Boland M.P., Roche J.F. 1990b. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 88, 581-591.
243. Savio JD, Bongers H, Drost M, Lucy MC, Thatcher WW, 1991. Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. *Theriogenology* 35: 315-329.
244. Savio J.D., Thatcher W.W., Radinga L., De La Sota R.L., Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant, follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. fert.*, 97, 197-203.
245. Scaramuzzi, R.J. And Murray, J.F., 1994. The nutrient requirements for the optimum production of gametes in assisted reproduction in ruminant animals. In *Proceedings of the 10th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Lyon)*, pp. 85-103. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes, Vol. 1.* 1996.
246. Scott, S.J. 1993. Observations on the use of ultrasound to predict bovine embryo recipient suitability. In *Proceedings of the 9th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Lyon)*, p. 276. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes, Vol. 1.* Cab International, UK.
247. Scriban R. 1999. *Biotechnologie. 5ème édition.* P 629-761.
248. Seidel George E., Jr and Seidel Sarah Moore. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. *FAO animal production and health paper* 77.
249. Shaw, D.W. and Good, T.E., 2000. Recovery rate and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 53: 1521-1528.
250. Shaw, D.W., Farin, P.W., Washburn, S.P. And Britt, J.H., 1994. Retinol palmitate and methode of synchronisation affect ovulatory response and embryo quality in superovulated cattle. *Journal of Animal Science* 72 (Suppl.1) / *Journal of Dairy Science* 77(Suppl. 1), 81. In: Ian Gordon. *Reproduction in Cattle and Buffaloes, Vol. 1.* 1996.
251. Shaw, D.W., Farin, P.W., Washburn, S.P., Britt, J.H., 1995. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. *Theriogenology* 1995; 44: 51-58. In: Shaw, D.W., Good, T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1521-1528.
252. Shore, L.S., Rios, C., Marcus, S., Bernstein, M., Shemesh, M. 1998. Relationship between peripheral estrogen concentrations at insemination and subsequent fetal loss in cattle. *Theriogenology* 50: 101-107
253. Singh, S.P., Broadbent, P.J. and Hutchinson, J.S.M. 1995. Characterisation of the oestrous cycles in maiden Simmental heifers and their response to superovulation. In *Proceedings of the British Society of Animal Science (Winter Meeting)*, paper 137. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes, Vol. 1,* Cab International, UK.
254. Sirois J., Fortune J.E. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 127, 916-925.
255. Slimane, W., Nibart, M., Thuard, J.M., Keita, J.B. and Humblot, P. 1995. Effect of controlling the moment of AI with a field LH kit on the number and quality of embryos collected from superovulated cows. In *Proceedings of the 11 th Meeting of dirt European Embryo Transfer Association (Hanover)*, p. 240.
256. Smith, C. 1990. Breeding strategies to capitalize on new technologies. In *of the 23rd International Dairy Congress (Montreal)*, Vol. 1, pp. 579-584.
257. Solmer, D. 1993. *Zootechnie Genera : Tome1: La Reproduction De Animaux D'Elevage. Collection Science et Techniques Agricoles. 2ème Edition.*
258. Sounano, K. and Price, C.A. 1995. Increased follicular cytochrome P450 17-alpha-hydroxylase (17-alpha-OH) gene expression in PMMSG- compared to FSHsuperovulated heifers. *Biology of Reproduction* 52 (Suppl. 1), 126.
259. Spicer L.J., Tucker W. B., Adams G.D. 1990. Insulin-like growth factor-1 in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity and estrous behaviour. *J. Dairy, Sc.*, 73, 929-937. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkeme F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000; 144, 385-404.
260. Spicer, L.J. and Geisert, R.D. 1992. Concentrations of insulin-like growth factor-1, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. *Theriogenology* 37, 749-760.
261. Spicer L.J., Echterkamp S.E. 1995. The ovarian insulin and insulinlike growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Anim. Endocrinol.* 12, 223-245.
262. Spicer L.J., Francisco C.C. 1997. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology*, 138, 3374-3379.
263. Spicer L.J., Alvarez P, Prado T.M., Morgan G.L., Hamilton T.D. 2000. Effects of intraovarian infusion of insulin-like growth factor-1 on ovarian follicular function in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 18, 265-278.
264. Sreenan, J.M. and Diskin, M.G. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 27, 99-113. In: Gordon I. 1996. *Reproduction in: Cattle and Buffaloes, Vol. 1,* Cab International, UK.
265. Staigmiller, R.B., MacNeil, M.D., Bellows, R.A., Short, R.E. And Phelps, D.A., 1995. The effect of estrus synchronization scheme, injection protocol and large ovarian follicle on response to superovulation in beef heifers. *Theriogenology*; 43: 823-834.
266. Staigmiller, R.B., Short, R.E., Bellows, R.A. and Hall, J.B. 1994. Variations in a single injection protocol for superovulation of beef cows. *Journal of Animal Science.*

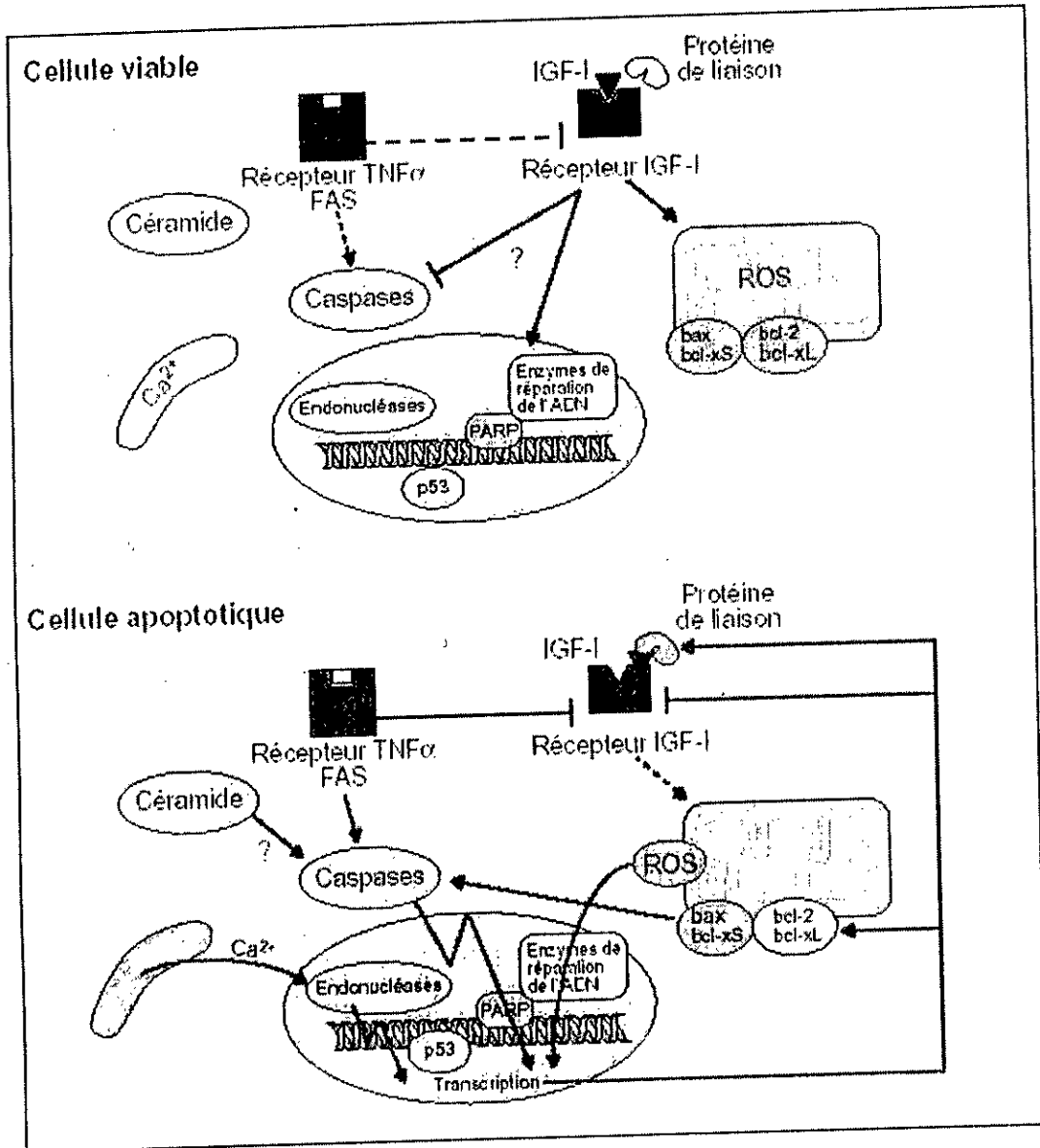


267. Stock, A.E., Ellington, J.E., Fortune, J.E., 1996. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology* 1996, 45: 1091-1102. In: Shaw, D.W., Good, T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1521-1528.
268. Sunderland S.J., Crowe M.A., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* 101, 547-555.
269. Suzuki T, Yamamoto M, Oe M, Takagi M. 1994. Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of dilute in polyvinylpyrrolidone. *Vet Rec* 135: 41-42.
270. Taylor C., Rajamahendran R. 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 7, 61-68.
271. Tetsuka, M., Milne, M., Simpson, G.E., Hillier, S.G., 1999. Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Glucocorticoid Receptor, and Mineralocorticoid Receptor Gene in rat Ovary. *Biology of Reproduction* 60, 330-335.
272. Thibault C., Levasseur M.C. 1991. Reproduction in mammals and man. Ellipses, Paris.
273. Thibault C., Levasseur M.C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Coédition INRA-Ellipse, Paris, 928 p.
274. Traoré, M., Andresen, U. And Pavel, G., 1992. Acknowledgements to the problem of unfertilized eggs in commercial embryo transfert from a practitioner's point of view. *Reprod. Dom. Anim.*, 27(1), 1992.
275. Tregaskes, L. D., Broadbent, P.J. and Roden, J.A. 1994. Effects of performance testing on superovulatory response in juvenile Simmental heifers. In *Proceedings of the British Society of Animal Production (Winter Meeting)*, paper no. 20.
276. Tribulo, H., Bo, G.A., Jofre, F., Carcedo, J., Alonso, A. and Mapletoff, R.J. 1991. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 35, 286.
277. Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R, Bo GA, 1993. Superovulation in *Bos Indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 39: 331 (Abstr.).
278. Turzillo A.M., Fortune J.E. 1993. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J. Reprod. Fert.* 98, 113-119.
279. Turzillo A.M., Fortune J.E. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 89, 643-653. IN: Drion P.V., Beckers J.F., Derkaine F., Hanzen CH. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 385-404.
280. Tzafettas J.M. 2000. Current and potential application of GnRH agonists in gynecologic practice, *Ann. NY Acad. Sci.* 900, 435-443.
281. Ueno N., Ling N., Ying S.Y., Esch F., Shimasaki S., Guillemin R. 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 8282-8286.
282. Van De Leemput Elizabeth Erica. 1998. Final follicular maturation in the cow and its effects on the developmental potential of the oocyte. Thèse de doctora. Utrecht University.
283. Van den Hurk R., Bevers M.M. and Beckers J.F. 1997. In-Vivo and In-Vitro Development of preantral follicles. *Theriogenology* 47: 73-82.
284. Van Der Schans A, Van Der Westerlaken LAJ, De Wet AAC, Eyestone Wh, De Boer HA, 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 35: 265 (Abstr.).
285. Vos, PLAM, van der Schans, A, de Wit AAC, Bevers, M.M., Willemsse, A.H., Dieleman, S.J., 1994. Effects of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before the preovulatory LH surge in PMSG superovulated heifers on follicular function and development. *J. Reprod. Fert.* 1994; 100:387-393. In: Greve, T., Callesen, H., Hytel, P., Hoier, R. And Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43:41-50, 1995.
286. Vos, PL.A.M., Bevers, M.M., Willemsse, A.H. and Dieleman, S.J. 1995. Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 43, 344.
287. Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Roche, J.F. and Boland, M.P. 1993. Superovulatory response in beef heifers following once or twice daily pFSH injection. *Theriogenology* 39, 335.
288. Wandji S.A., Fortier M.A., Sivarid M.A. 1992. Differential response to gonadotropins and prostaglandins E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. *Biol. Reprod.*, 46, 1034-1041.
289. Webb, R., Gong, J.G. and Bramley, T.A. 1994. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 41, 25-30.
290. Webb, R., Gosden, R., Telfer, E. And Moor, R., 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science* 68: 257-284.
291. Willard, S.T., Carroll, J.A., Lammoglia, M.A., Kemper Green, C.N., Welsh, TH., Jr and Randel, R.D. 1995. Growth hormone and changes in follicular development during the bovine estrous cycle. *Journal of Animal Science* 73 (Suppl. 1), 230.
292. Willmot N, Lussier J, Pawlyshyn V, Palasz A, 1990. The effect of bovine follicular fluid pretreatment on superovulation in the cow. *Theriogenology* 33: 346 (Abstr.).
293. Wilson, J.M., Jones, A.L., Moore, K., Looney, C.R. and Bondioli, K.R. 1993. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science* 33, 71-82.
294. Wintenberger Torres, S. et Sevellec, C. 1987. Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. Paris, INRA. 51 pp. In: Gordon I. 1996. Reproduction in: Cattle and Buffaloes. Vol. I, Cab International, UK.
295. Wright I.A., Rhind S.M., Whyte T.K., Smith A.J. 1992. Effect of body condition at calving and feeding level after calving on LH profiles and the duration of the postpartum and oestrus period in beef cows. *Anim. Prod.*, 55, 41-46.
296. Xiao S., Findlay J.K. 1991. Interactions between activin and FSH suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, 79, 99-107.
297. Yaakub, H., Duffy, P., O'Callaghan, D. And Boland, M.P., 1998. Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to gonadotrophin treatment on superovulatory response, and on embryo yield and quality in beef heifer. *Animal Reproduction Science* 51: 191-204.
298. Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M. and Suzuki, T. 1995. Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone for superovulation in cows. *Journal of Reproduction and Development* 41(1), 93-96.
299. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. Second edition. Raven Press Ltd. New York, 1994, 189-317. IN: Hanzen CH., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache : 1. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 223-235.
300. Zamorano P.L., Mahesh V.B., Desevilla L.M., Chorich L.P., Bhat G.K., Brann D.W. 1997. Expression and localisation of leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat, *Neuroendocrinology*, 65, 223-228.

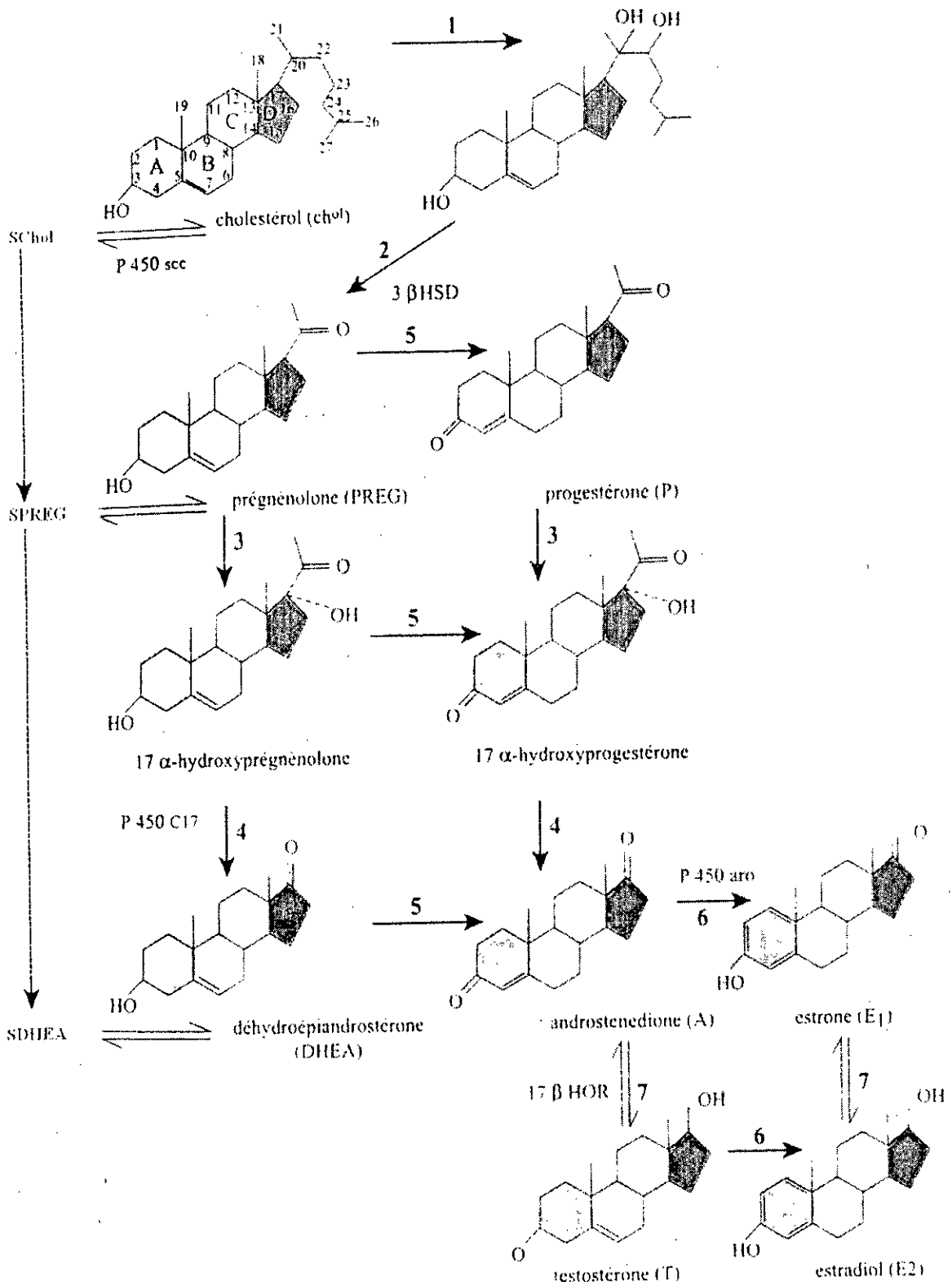
# ANNEXE

Annexe 1: Représentation schématique de l'activation du MPF (Scriban, 1999).

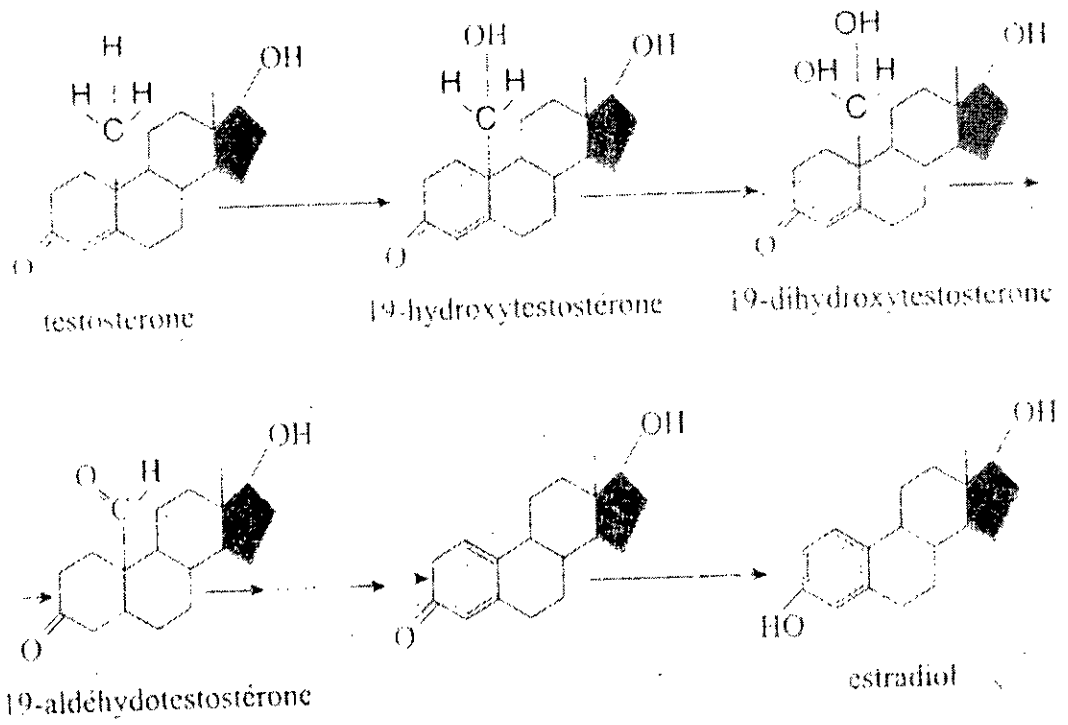




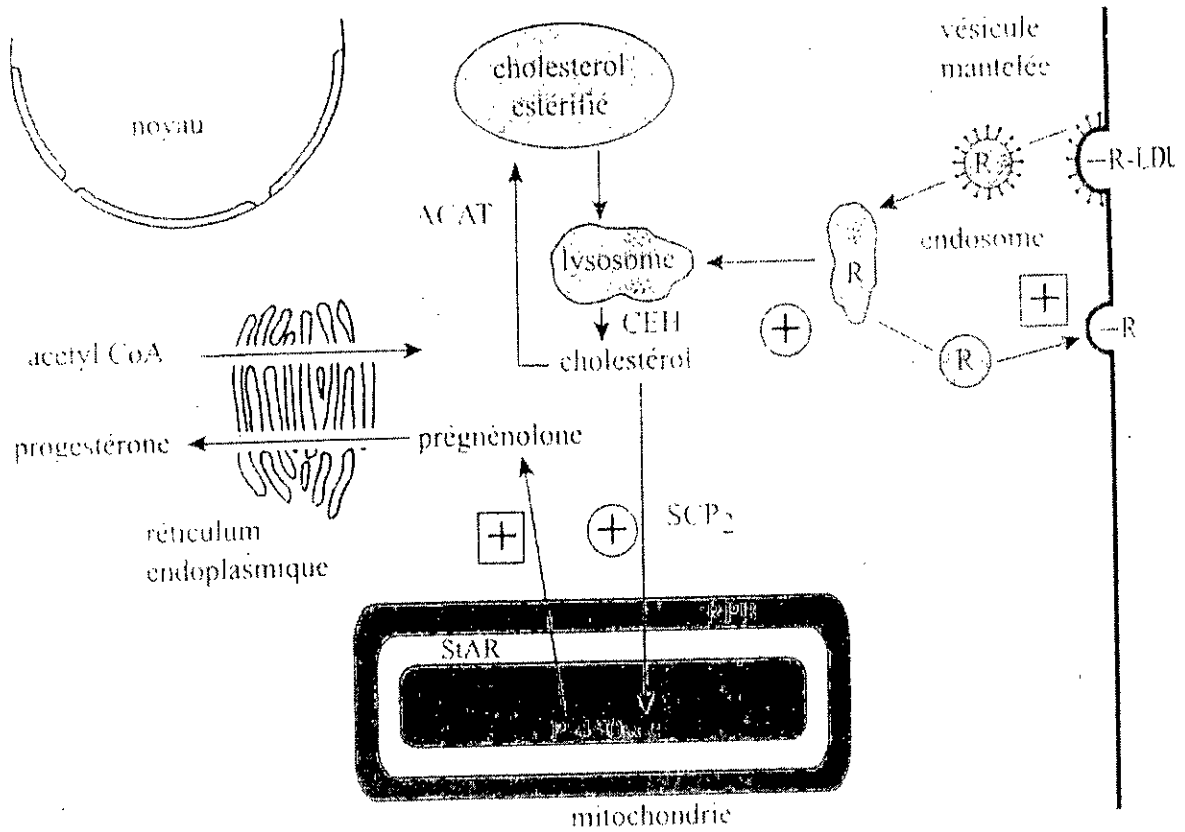
Annexe 3 : Les voies de la stéroïdogenèse sexuelle (Thibault et al., 2001).

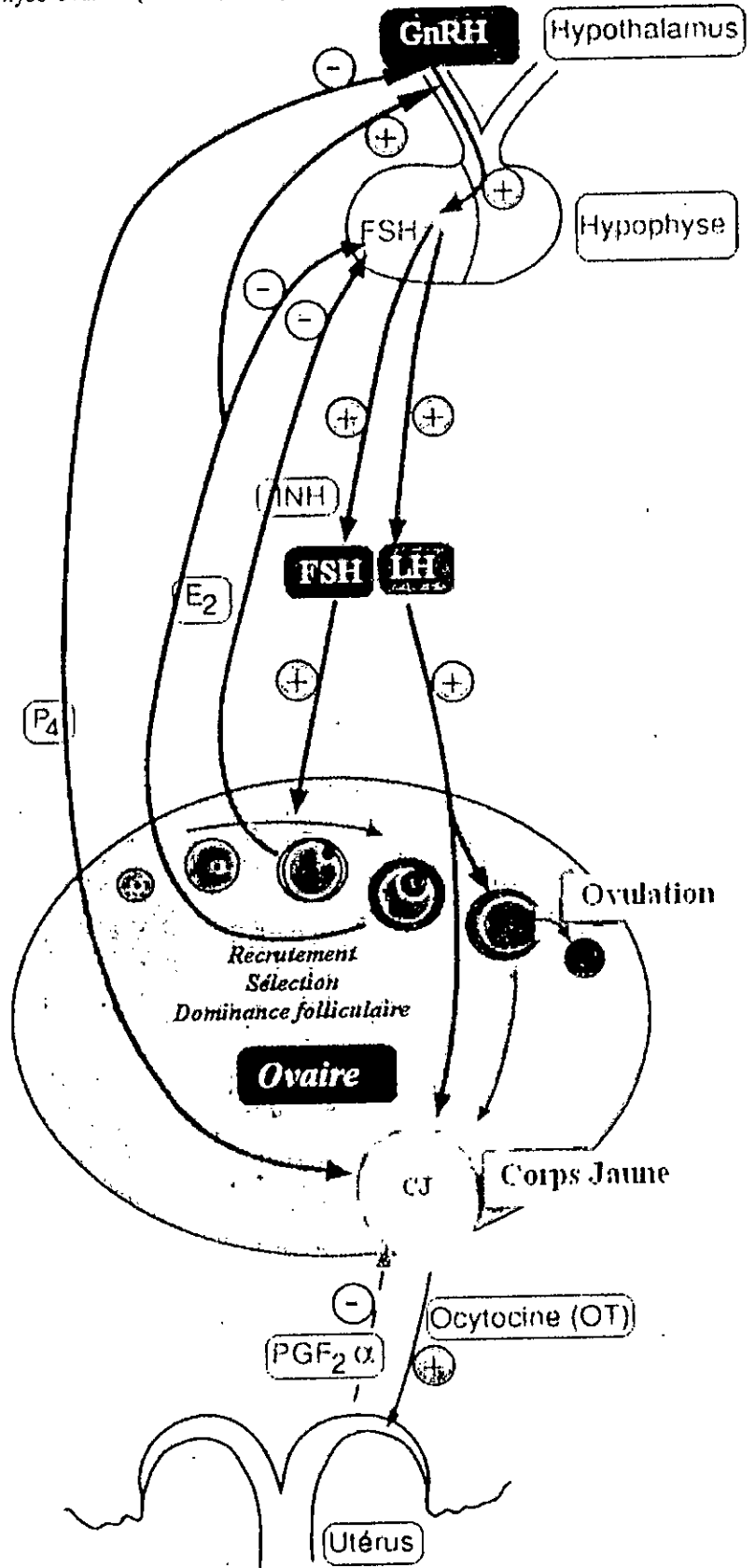


Annexe 4 : Synthèse des oestrogènes à partir des androgènes (Thibault et al., 2001).



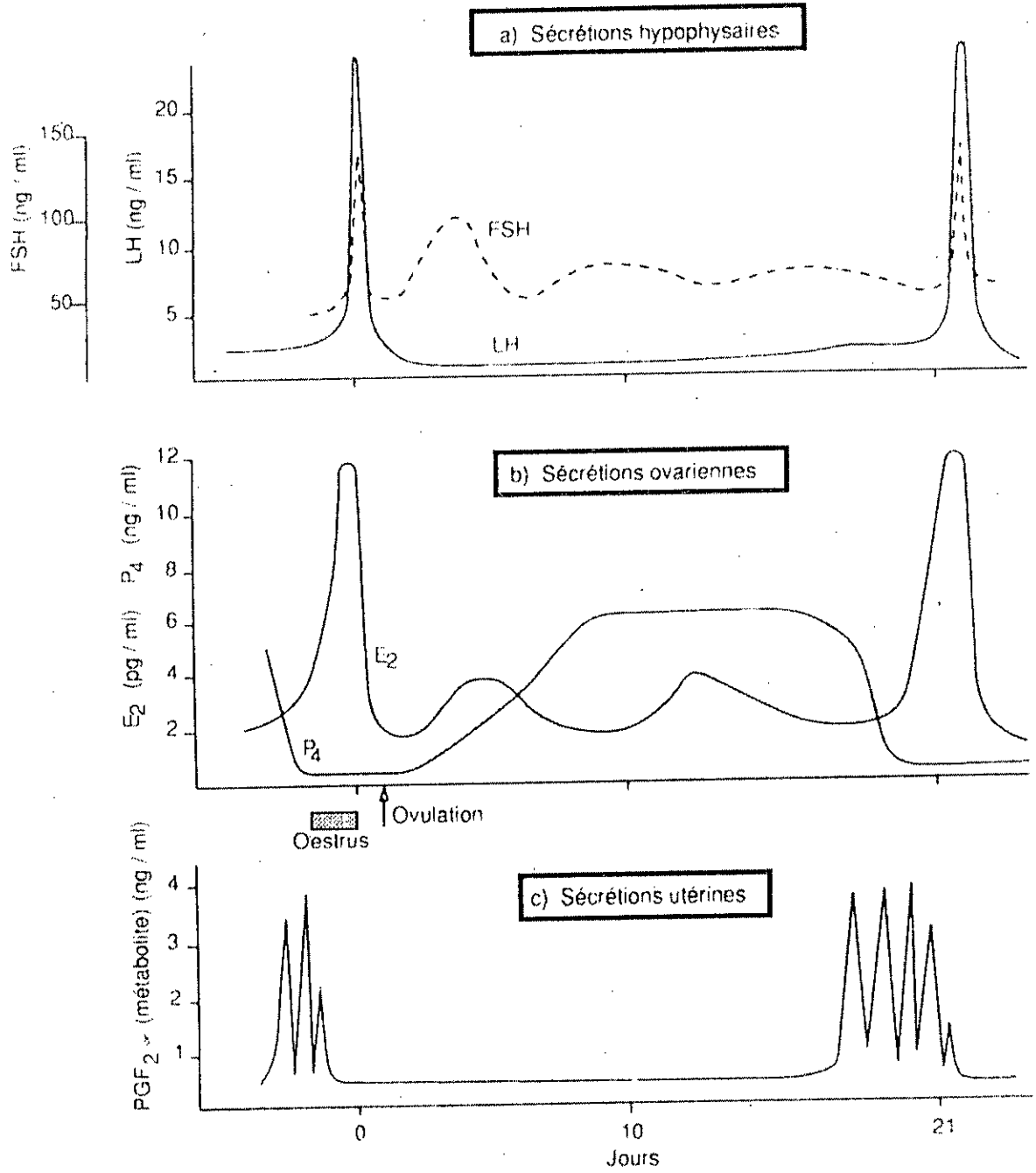
Annexe 5 : Régulation de la stéroïdogénèse par les hormones gonadotropes (Thibault et al., 2001).  
(Effet rapide : cercle, effet lent : carré).



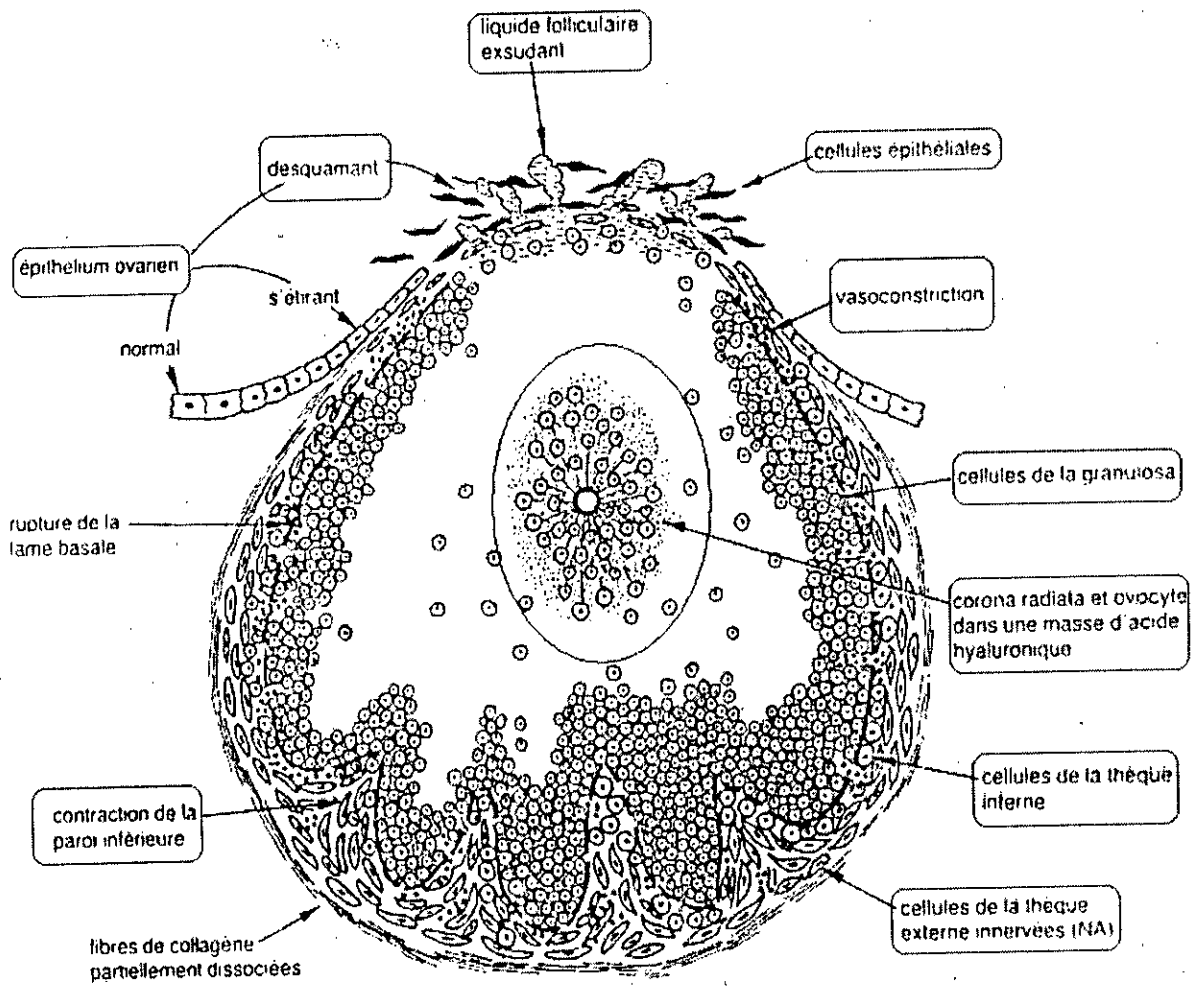




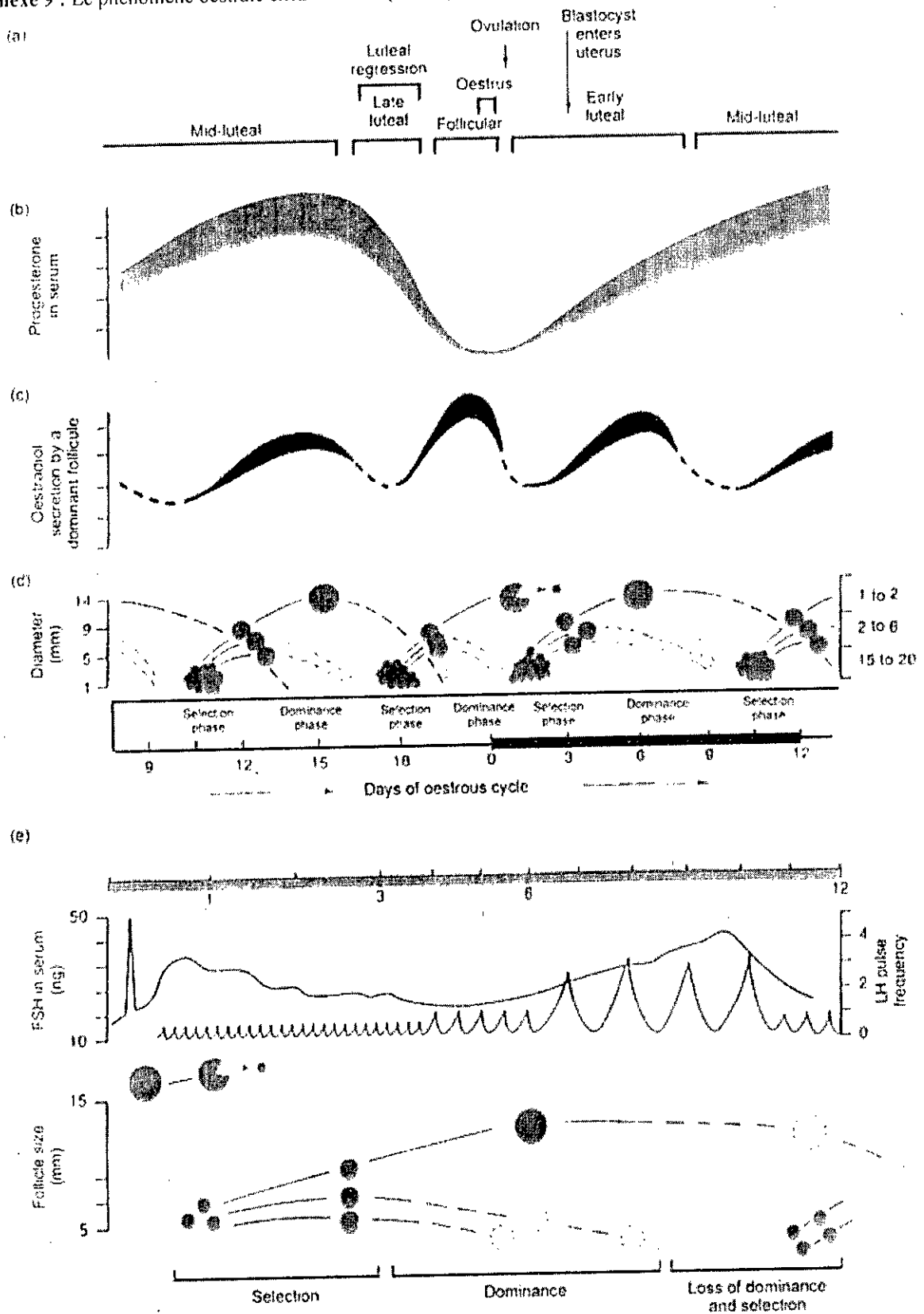
Annexe 7 : Profile hormonale chez la vache durant un cycle oestral (Scriban, 1999).



Annexe 8 : Follicule peu avant l'ovulation (Thibault et al., 1991).

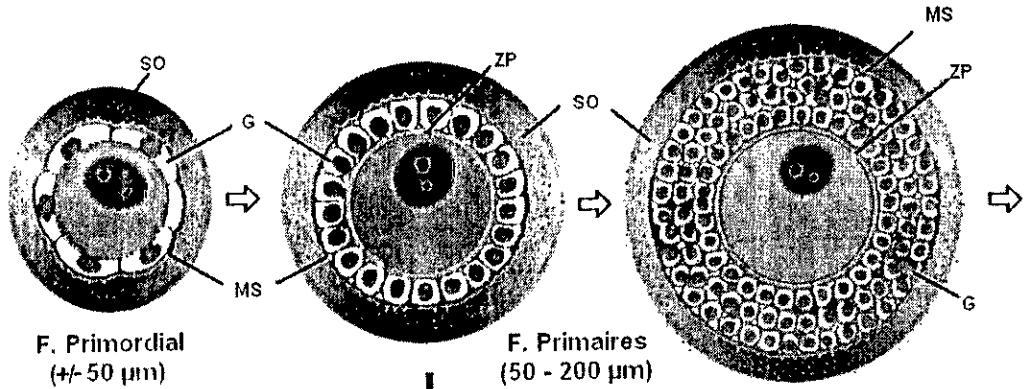


Annexe 9 : Le phénomène oestrale chez la vache (Roche, 1996).



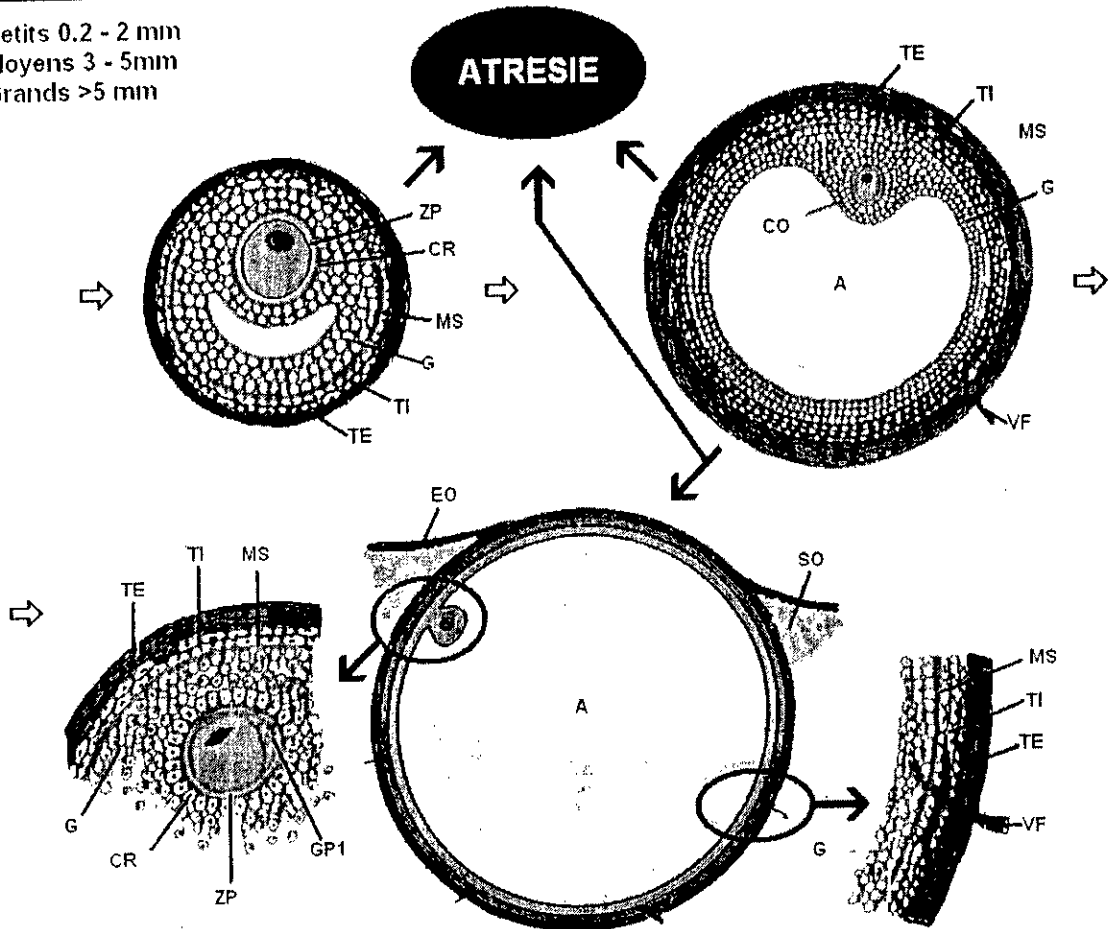
Annexe 10 : Folliculogenèse.

Follicules Préantraux :



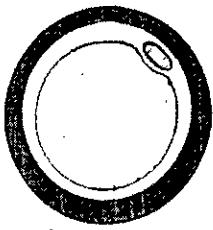
Follicules Antraux :

Petits 0.2 - 2 mm  
Moyens 3 - 5mm  
Grands >5 mm

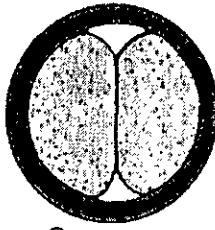


A: antrum - CO: cumulus oophorus - CR: corona radiata - EO: épithélium ovarien - G: granulosa - GP1: 1er globule polaire - MS: membrane de slavjanski - SO: stroma ovarien - TE: thèque externe - TI: thèque interne - VF: vaisseaux folliculaires - ZP: zone pellucide.

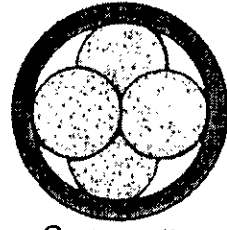
Annexe 11 : Embryogenèse.



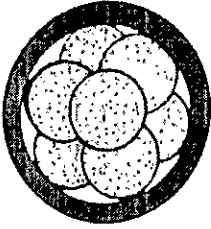
1. 1-cell  
(day 1)



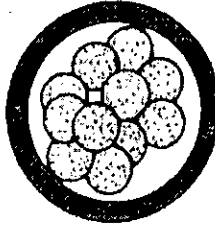
2. 2-cell  
(day 2)



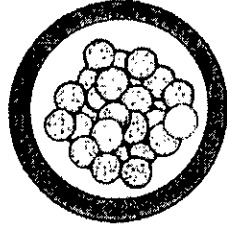
2. 4-cell  
(day 3)



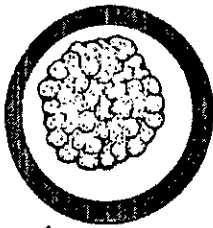
2. 8-cell  
(day 4)



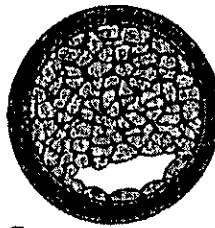
2. 16-cell  
(day 5)



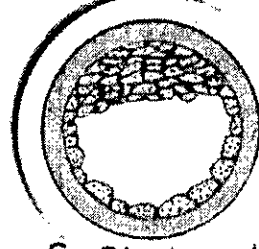
3. Early morula  
(day 5 - 6)



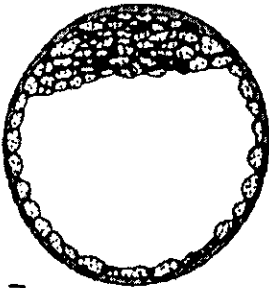
4. Morula  
(day 6)



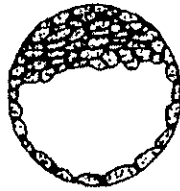
5. Early blastocyst  
(day 7)



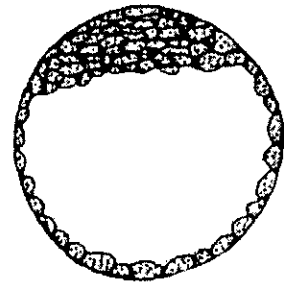
6. Blastocyst  
(day 7-8)



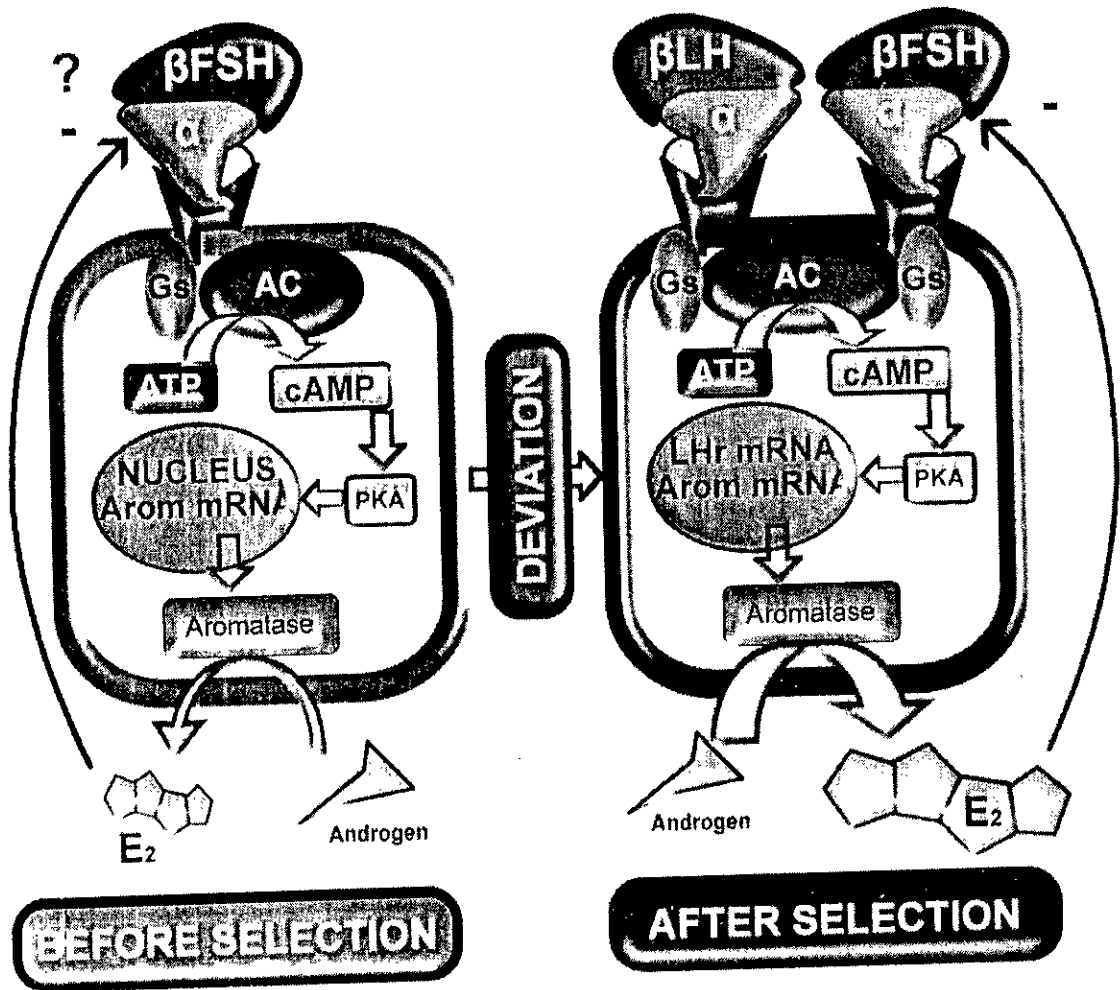
7. Expanded blastocyst  
(day 8-9)



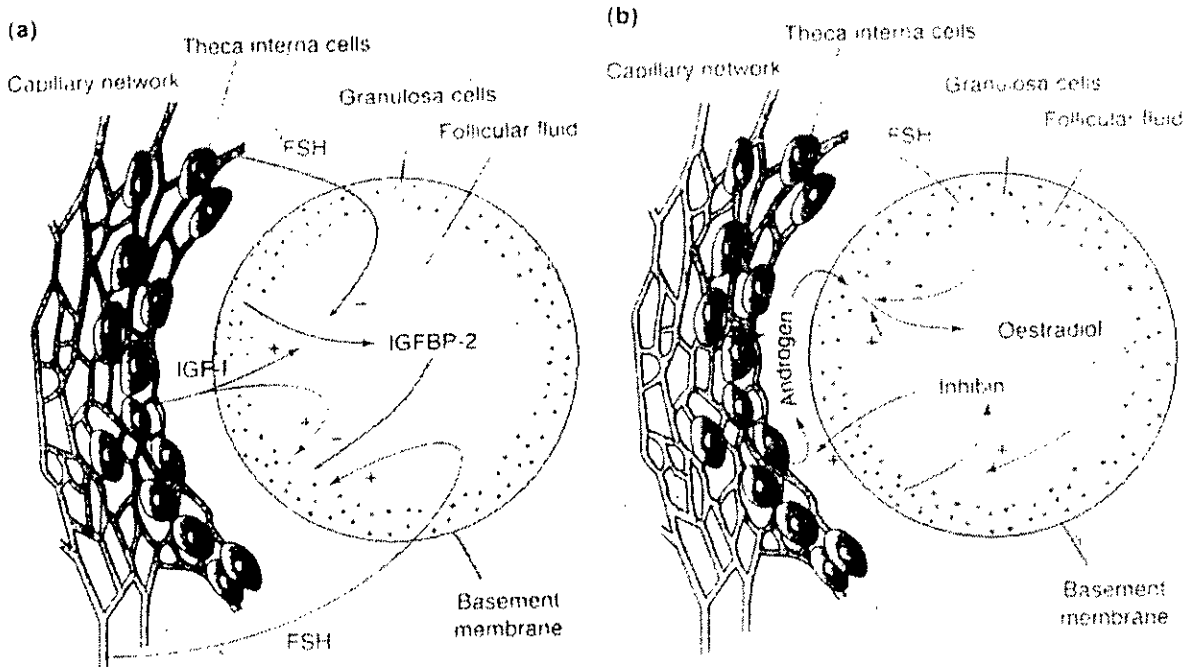
8. Hatched blastocyst  
(day 9)



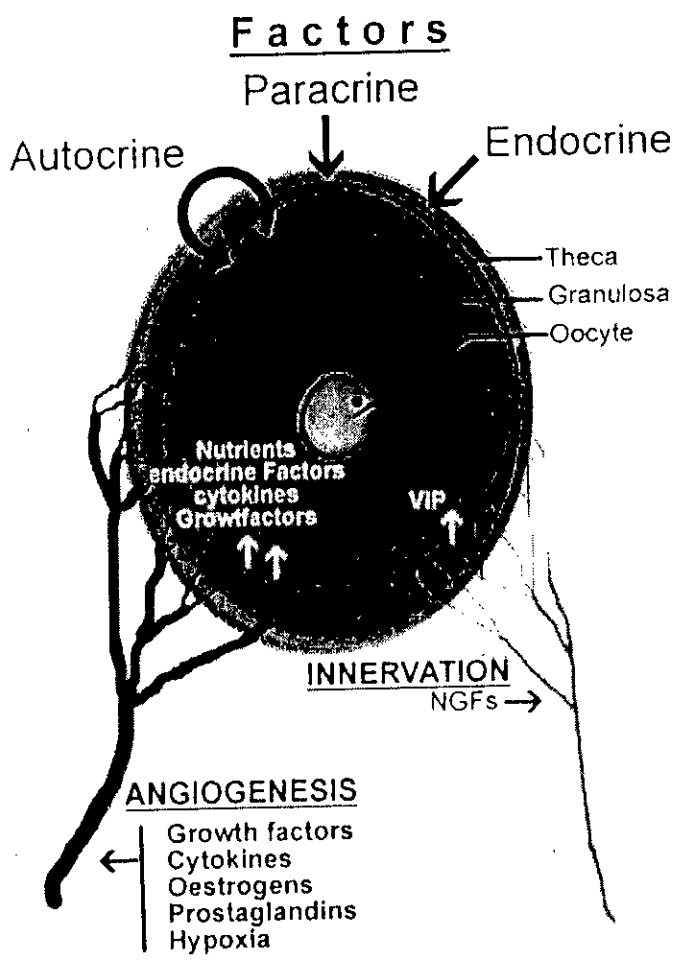
9. Expanding  
hatched blastocyst  
(day 9-10)



**Annexe13** : Systèmes de feedback positifs et négatifs intra-folliculaire dans l'ovaire des ruminant. (a) La production de l'insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2) par les cellules de granulosa, est régulée par l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and FSH. La stimulation de l'IGF-1 potentialise la stimulation de la granulosa par la FSH pour sa prolifération et sa différenciation cellulaire et en retour elles sont inhibées par l'IGFBP-2. (b) La production d'Inhibine est stimulée par les androgènes aromatisable et les oestrogènes, l'Inhibine en retour, augmente la stimulation FSH dans la production d'oestradiol par la granulosa. (Armstrong et al., 1997).



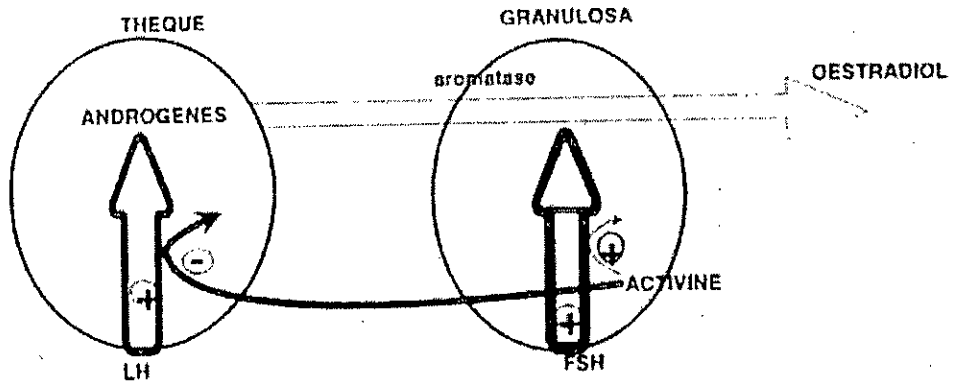
Annexe 14 : Représentation schématique d'une possible régulation de développement folliculaire préantral basé sur des observation *in-vitro* et *in-vivo*. (Van den Hurk et al., 1997)



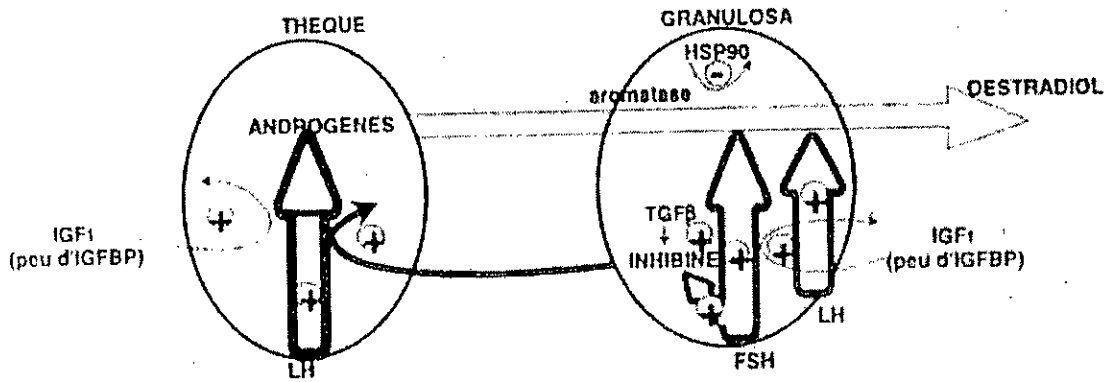


**Annexe 15 :** Mécanismes de contrôle de la production d'œstradiol dans le follicule en recrutement et le follicule dominant (Monget et Monniaux, 1995).

**Follicule au stade recrutement**



**Follicule au stade dominant**



**Annexe 16 :** Facteurs peptidiques identifiés exprimés par les cellules folliculaires : actions de type paracrine sur la survie, la prolifération et la différenciation des cellules de granulosa *in vitro* (Monniaux et al., 1999).

<b>Tableau</b>		
<b>FACTEURS PEPTIDIQUES ET STÉROÏDIENS CAPABLES DE MODULER LA SURVIE, LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES DE LA GRANULOSA</b>		
	<b>Facteurs stimulants</b>	<b>Facteurs inhibiteurs</b>
<b>Survie</b>	<b>FSH, LH</b> <b>insuline, IGF</b> <b>EGF, TGF-<math>\alpha</math></b> <b>FGF</b> <b>activine</b> <b>interleukine-1</b> <b>laminine</b> <b>progestérone</b>	<b>IGFBP<sup>(2)</sup></b> <b>folliculine<sup>(2)</sup></b> <b>TGF-<math>\beta</math></b> <b>interleukine-6</b> <b>TNF-<math>\alpha</math>, Fas ligand</b> <b>interféron <math>\gamma</math></b> <b>GnRH</b> <b>androgènes</b>
<b>Prolifération</b>	<b>FSH</b> <b>insuline, IGF</b> <b>EGF, TGF-<math>\alpha</math></b> <b>FGF</b> <b>activine</b> <b>TGF-<math>\beta</math></b> <b>interleukine-1</b> <b>TNF-<math>\alpha</math></b> <b>laminine</b> <b>œstrogènes</b>	<b>IGFBP<sup>(2)</sup></b> <b>folliculine<sup>(2)</sup></b> <b>TGF-<math>\alpha</math></b> <b>TGF-<math>\beta</math></b> <b>interleukine-6</b> <b>interféron <math>\gamma</math></b>
<b>Différenciation<sup>(1)</sup></b>	<b>FSH, LH</b> <b>insuline, IGF</b> <b>activine<sup>(3)</sup></b> <b>TGF-<math>\beta</math></b> <b>laminine</b> <b>œstrogènes</b> <b>androgènes</b>	<b>IGFBP<sup>(2)</sup></b> <b>folliculine<sup>(2)</sup></b> <b>inhibine<sup>(3)</sup></b> <b>EGF, TGF-<math>\alpha</math></b> <b>FGF</b> <b>TGF-<math>\beta</math></b> <b>interleukine-6</b> <b>TNF-<math>\alpha</math></b> <b>androgènes</b>

Les facteurs dont l'effet est similaire dans des espèces animales variées sont indiqués en caractères gras. En revanche, la réponse cellulaire vis-à-vis d'autres facteurs varie de façon très importante (un même facteur pouvant être stimulant ou inhibiteur) selon l'espèce animale, le modèle expérimental et le degré de différenciation des cellules de la granulosa. En particulier, l'action des cytokines, des stéroïdes et des facteurs de la famille du TGF- $\beta$  sur les cellules de la granulosa n'est pas vraiment comprise actuellement.

IGF : insulin-like growth factors, IGFBP : IGF binding proteins, EGF : epidermal growth factor, TGF : transforming growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TNF : tumor necrosis factor.

(1) Appréciée par la présence d'une stéroïdogenèse active (production d'œstradiol, de progestérone, expression de l'aromatase ou de la cholestérol side-chain cleavage) ou de récepteurs de LH.

(2) Substances capables de lier un facteur actif et de moduler son action. Les IGFBP et la folliculine inhibent respectivement les actions des IGF et de l'activine sur des cellules de la granulosa *in vitro*.

(3) En revanche, l'inhibine et l'activine sont, respectivement, des facteurs stimulants et inhibiteurs de la différenciation des cellules de thèque.