



047THV-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB -- BLIDA  
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRE ET BIOLOGIQUES  
Département des Sciences Vétérinaires

Projet de Fin d'études  
En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur vétérinaire

THEME

**Superovulation et collecte d'embryons  
chez les vaches laitières**

Présenté par :

-BAHLOUL Riad  
-SMAILI Mohamed

Promoteur : Adel Djallal -MAT a l'Université de BLIDA

Examineur : Ferroukh Mustapha – CC a l'Université de BLIDA

Président du jury : Kaidi Rachid –Professeur a l'Université de BLIDA

2005/2006

## Dédicaces

A mes parents,

- A mon père,

Malgré un travail très prenant, tu as toujours su être là lorsque j'avais besoin de toi. Si je suis allé si loin dans mes études, c'est aussi grâce à toi. Merci de m'avoir encouragé à "aller tout droit".

- A ma mère,

Personne ne sait aussi bien que toi m'écouter, me comprendre, et me donner confiance... Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci d'être là ... si proche de moi.

- A mes frères, A/ghani, Mohamed Ali, A/Kader pour leur soutien et leur bienveillance.
- A ma sœur sonia, qui par son aide, son encouragement et sa disponibilité, ma poussé à persévérer et à donner le mieux de moi-même et à ses deux petits enfants Wassim et Sara. A son marie Mustapha et toute sa famille.
- A toute ma famille : mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines.
- A mon binôme Walid et à toute sa famille.

- A mon maîtres de stage qui ma beaucoup appris et ma fait partager son amour du métier: Docteur Bouyahia,. Je le remercie de sa gentillesse et de son aide.

Je tiens a souligner le soutien de mes amis Nassim, Moussa, Houcine, Lyes, Mokrane, Cherif, Brahim, Nouredine, Ouehab, Nadir, Makhlouf ,Mohand, Hakim, Lamia, Hassiba, Kahina, Amina et les remercier pour l'esprit de camaraderie, pour leur amitié précieuse à mes yeux et pour les encouragements qu'ils ont su me procurer tout au long de ces années. Un gros merci également à toute la promo vétérinaire 2006 pour leur soutien, personnel du departement vétérinaire.

**RIAD**

## *Dédicaces*

En hommage à mon père, qui nous a quitté tôt, j'aurais aimé qu'il soit à mes côtés ce jour là, merci pour tout ce que tu as fait pour nous et repose en paix.

J'aimerais exprimer ma gratitude envers ma mère, pour sa patience et ses encouragements, et son soutien tout au long de mes études.

Je dédie également ce travail à mon frère aîné Nacer, aussi à mon frère yacine, à mes sœurs Fazia, Naciba, et Nadia, qui m'ont soutenu tout au long de la période de mes études, et qui m'ont encouragé pendant les moments les plus difficiles.

A mon beau frère Karim, qui m'a tant soutenu pendant les nuits difficiles qu'on a passé à la ferme expérimentale, sans oublier mes beaux frères Rachid et Chawki pour leur soutien moral.

A mes belles sœurs Biba et Fetta.

Je tiens aussi à souligner le soutien de mes amis Rachid, Lyes, Moussa, et Khaled pour leur sincère amitié et leur esprit de camaraderie.

A tout le reste de ma famille, mes cousins, mes cousines, sans oublier ma chère grand-mère.

A la promotion de 5<sup>ème</sup> année vétérinaire, pour leur esprit d'équipe, et pour leur soutien pendant la période tragique que j'ai vécu.

## Remerciements

On tient à remercier notre promoteur le Dr Adel Djallal pour l'encadrement et l'encouragement qu'il nous a donnés et de nous avoir guidé dans la réalisation de ce travail.

A Monsieur le docteur Gherbi,

Maitre assistant a l'université Saad Dahleb de Blida,  
Qui nous a guidé et conseillé tout au long de la réalisation de ce travail,  
Pour ses encouragements, sa patience et sa disponibilité,

A Monsieur le docteur Ferrouk

Chargé de cours a l'université de Blida,  
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de Mémoire,  
Pour ses précieux conseils et son aide,  
Sincères remerciements

A Monsieur le professeur Kaidi

Professeur a l'université Saad Dahleb de Blida  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre mémoire.  
Hommages respectueux.

Mes remerciements vont aussi aux travailleurs de la station expérimentale pour leur aide et leur soutien.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce projet.

---

## 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. C'est ainsi que les chercheurs dans ce domaine ont mis au point une méthode qui nous permet d'utiliser le potentiel reproductif de la vache en limitant le gaspillage, par atresie, des ovocytes présents au niveau de l'ovaire. En effet, en injectant une gonadotropine à certain moment du cycle on peut produire une superovulation.

L'objectif principal de notre étude est la maîtrise de la technique de superovulation ainsi que la réponse des vaches à ce traitement. Notre expérience a concernée 2 vaches laitières parmi elles une vache de race Montbéliarde et l'autre de race Holstein. Un traitement par un extrait hypophysaire " Stimufol " (gonadotrophines hypophysaires LH/FSH 40%) qui est produit dans les laboratoires du Dr Beckers J.F., au niveau de la faculté de médecine vétérinaire de Liège (Belgique) a été appliqué à 2 vaches ; selon un planning rigoureux sur chaleurs de références , une double insémination artificielle en employant deux paillettes pour chaque vache à 48 h et 60 h de l'injection de prostaglandine(Estrumate®) ; ensuite une récolte non chirurgicale et une évaluation puis une classification sous microscope des produits a été pratiquée. Les vaches ont bien répondues au traitement de superovulation par une estimation par voie rectale d'un nombre moyen de 19 corps jaune par vache, les résultats de récolte étaient moyens pour la vache Montbéliarde avec 5 embryons et un résultat faible pour la vache Holstein avec un seul embryon.

Cependant d'autres expérimentations doivent être fait dans ce sens pour une amélioration de cette biotechnologie dans notre pays, afin d'en faire une technique d'élevage permettant d'améliorer le rendement de nos vaches possédant un potentiel génétique élevé.

TABLE DE MATIERES

Dédicace  
 Remerciements  
 Résumé  
 Table de matière  
 Abréviations  
 Tableaux et figures

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

Introduction générale..... 1

CHAPITRE I: Rappels physiologiques

**I. Rappels physiologiques sur le fonctionnement ovarien dans l'espèce bovine**

I.1. Introduction..... 3  
 I.2. Aspect morphologique..... 3  
     I.2.1. Phase de multiplication..... 3  
     I.2.2. Phase de croissance..... 4  
         I.2.2.1. Le follicule primordial..... 4  
         I.2.2.2. Le follicule primaire..... 4  
         I.2.2.3. Le follicule secondaire..... 5  
         I.2.2.4. Le follicule tertiaire..... 5  
         I.2.2.5. Le follicule mur ou le follicule de De Graaf..... 5  
     I.2.3. Phase de maturation..... 6  
 I.3. L'atrésie folliculaire..... 7  
 I.4. Régulation hormonale..... 7  
     I.4.1. Phase gonadotrope indépendante..... 8  
     I.4.2. Phase gonadotrope dépendante..... 8  
 I.5. Dynamique de la croissance folliculaire..... 8  
     I.5.1. Recrutement..... 9  
     I.5.2. Sélection ..... 9

|  |           |
|--|-----------|
| I.5.2. Dominance.....  | 9         |
| <b>II. Caractéristiques du cycle oestral chez la vache.....</b>        | <b>11</b> |
| II.1. Introduction.....  | 11        |
| II.2. Hormones intervenants dans la régulation du cycle oestral.....   | 11        |
| II.2.1. Hormone hypothalamique (GnRH).....                             | 11        |
| II.2.2. Hormones hypophysaires (FSH, LH).....                          | 12        |
| II.2.3. Les stéroïdes ovariens.....                                    | 13        |
| II.2.4. Les peptides ovariens.....                                     | 13        |
| II.3. Rétrocontrôle stéroïdien sur l'axe hypothalamo-hypophysaire..... | 14        |
| II.3.1. Feed back négative.....  | 14        |
| II.3.1. Feed back positif.....   | 15        |
| II.4. Les différentes phases du cycle oestral chez la vache.....       | 16        |
| II.4.1. Proestrus.....   | 16        |
| II.4.2. Oestrus.....   | 16        |
| II.4.3. Metoestrus.....  | 16        |
| II.4.4. Dioestrus.....   | 16        |
| <b>III. Fécondation et développement embryonnaire.....</b>             | <b>17</b> |
| III.1. Fécondation.....  | 17        |
| III.2. développement embryonnaire précoce.....                         | 17        |
| III.2.1. Premières divisions cellulaires.....                          | 17        |
| III.2.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation.....                | 18        |
| III.2.3. L'implantation.....   | 18        |

**CHAPITRE II : Superovulation et collecte d'embryons**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introduction.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2. Superovulation.....</b>   | <b>21</b> |
| 2.1. Les différentes hormones utilisées dans le traitement de superovulation..... | 21        |
| 2.1.1. Utilisation de l'eCG (PMSG).....   | 21        |
| 2.1.2. Utilisation de la FSH.....   | 22        |
| 2.2. Importance du statut ovarien au moment du traitement.....                    | 23        |
| 2.2.1. Statut ovarien au début du traitement.....                                 | 23        |
| 2.2.2. Effet de la présence ou non du follicule dominant.....                     | 24        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3. Profils hormonaux observés pendant les traitements .....                   | 25        |
| 2.3.1. Caractéristiques des profils hormonaux (FSH, LH).....                    | 26        |
| 2.3.2. Caractéristiques du profil hormonal de l'oestradiol.....                 | 27        |
| 2.3.3. Caractéristiques du profil hormonal de la progestérone.....              | 28        |
| 2.4. Protocoles de superovulation.....  | 29        |
| 2.4.1. Intervention sur cycle maîtrisé.....                                     | 29        |
| 2.4.2. Traitement supplémentaire en début de cycle.....                         | 30        |
| 2.4.3. Traitement supplémentaire avant la superovulation.....                   | 30        |
| 2.5. Facteurs de variations de la réponse aux traitements superovulatoires..... | 31        |
| 2.5.1. Facteurs extrinsèques.....   | 31        |
| 2.5.1.1. Climat.....  | 31        |
| 2.5.1.2. Alimentation.....  | 31        |
| 2.5.1.3. Stress et maladies intercurrentes.....                                 | 32        |
| 2.5.1.4. Influence des traitements utilisés.....                                | 32        |
| 2.5.2. Facteurs intrinsèques.....   | 36        |
| 2.5.2.1. Etat des ovaires.....  | 36        |
| 2.5.2.2. Race.....  | 36        |
| 2.5.2.3. Age et parité.....   | 37        |
| 2.5.2.4. Génétique.....   | 37        |
| 2.5.2.5. Niveau de production laitière.....                                     | 38        |
| 2.5.2.6. Intervalle velage-traitement de superovulation.....                    | 38        |
| <b>3. Insémination, collecte et examen des embryons.....</b>                    | <b>38</b> |
| 3.1. Protocole d'insémination.....  | 38        |
| 3.2. Collecte.....  | 39        |
| 3.3. Examen des embryons.....   | 40        |
| <b>4. Congélation des embryons.....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1. Introduction.....  | 43        |
| 4.2. Principe de la congélation.....  | 43        |
| 4.3. Les techniques de congélation.....   | 44        |
| 4.3.1. La congélation lente.....  | 44        |
| 4.3.2. Vitriification et vitriification ultra rapide.....                       | 46        |
| 4.4. La décongélation.....  | 50        |
| 4.5. Conclusion.....  | 50        |

PARTIE EXPERIMENTALE

1.Introduction.....51

2. Objectifs.....51

3. Matériels.....52

    3.1. Animaux.....52

    3.2. Extraits hypophysaires et traitements.....52

    3.3. Matériels d'insémination, collecte et de congélation des embryons.....53

4.Méthode.....54

    4.1. Synchronisation des chaleurs.....54

    4.2. Superovulation.....54

    4.3. Insémination artificielle.....56

5. Collecte des embryons.....57

6. Résultats.....58

    6.1. Résultats obtenus lors d'induction des chaleurs.....58

    6.2. Résultats obtenus lors de la superovulation.....58

    6.3. Evaluation des réactions ovariennes.....59

    6.4. Résultats de récolte des deux vaches.....59

7. Discussion.....64

8. Conclusion.....65

9. Recommandations.....66

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Liste des abréviations:

- ACTH: adreno-corticotrophine hormone
- ARN: adeno-ribonucleique
- BSA : albumine bovine sérique
- CJ : corps jaune
- DE : Diamètre externe
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- eCG : equine chorionic gonadotrophin
- E2 : oestradiol-17 $\beta$
- Emb : embryon
- E.P : épaisseur de la pellucide
- FSH: Follicle Stimulating Hormone
- FSP: FSH-suppressing protein
- GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone
- I.A : insémination artificielle
- IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1
- I.M : intra musculaire
- J : jour
- LH: Luteinising Hormone
- M : mole
- mg : milligramme
- mm : millimètres
- $\mu$ m : micromètre
- $\mu$ l : microlitre
- MIS: Meiosis inductive substance
- Nbr : nombre
- OMTE : ovulation multiple et transfert embryonnaire
- OPS: Open Pulled Straw
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- pg: picogramme
- PG: prostaglandine
- PGF2 $\alpha$ : Prostaglandine F2 alpha
- PMSG: Pregnant Mare Stimulating Gonadotropin

-P4: progesterone

-PVA: polyvinylalcool

-TGF-b: Transforming Growth Factor-b

-U.I: unité Internationale

-Vs: versus

-ZP: zone pellucide

## Tableaux et figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : différentes phases de la croissance folliculaire (AR.Peters et PJH.Ball, 1987).....   | 6  |
| <b>Figure 2</b> : Description d'une vague folliculaire (Ennuyer, 2000).....   | 10 |
| <b>Figure 3</b> : Evolution des vagues folliculaire au cours.....   | 10 |
| d'un cycle chez la vache (Ennuyer, 2000)  |    |
| <b>Figure 4</b> : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....   | 15 |
| (Peters et Ball, 1994)  |    |
| <b>Figure 5</b> : Fécondation et premières divisions de l'embryon (Secchi, 1976).....   | 18 |
| <b>Figure 6</b> : Correspondance de l'état d'évolution de l'embryon.....  | 20 |
| avec son âge (Peters et Ball, 1994)   |    |
| <b>Figure 7</b> : Schéma de traitement de superovulation par PMSG.....  | 22 |
| (en phase lutéale d'un cycle maîtrisé par des implants de progestérones) (D'après Nibart, 1991)   |    |
| <b>Figure 8</b> : Schéma de traitement de superovulation par FSH-p.....   | 23 |
| (en phase lutéale d'un cycle maîtrisé par des implants de progestérones) (D'après Nibart, 1991)   |    |
| <b>Figure 9</b> : Courbes de concentration plasmatique d'oestradiol-17 $\beta$ .....  | 25 |
| (E2), de LH et de progestérone (P4) chez une vache ayant répondu au traitement de superovulation par FSHp (D'après Nibart, 1991).                         |    |
| <b>Figure 10</b> : Courbes de concentration plasmatique d'oestradiol-17 $\beta$ .....   | 26 |
| (E2), de LH et de progestérone (P4) chez une vache ayant répondu au traitement de superovulation par PMSG (h0=début du traitement) (d'après Nibart, 1991) |    |
| <b>Figure 11</b> : Effet de la dose de FSH utilisée lors de superovulation.....   | 33 |
| sur le nombre d'embryons totaux et transférables récoltés (d'après Yaakub et al, 1998)  |    |
| <b>Figure 12</b> : Effets de l'administration ou non d'anti-PMSG.....   | 34 |
| 6 ou 18 heures après le pic de LH sur le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons transférables (D'après Bevers et al, 1993)                        |    |
| <b>Figure 13</b> : Influence de l'âge sur la réponse au traitement de superovulation.....   | 37 |
| pour 633 collectes chez des vaches laitières (d'après Nibart, 1991)   |    |
| <b>Figure 14</b> : Schéma d'une paillette, embryon en place lors de congélation lente.....  | 45 |
| (INRA.Prod.Anim., 2005)   |    |
| <b>Figure 15</b> : Schéma d'une paillette lors de vitrification classique.....  | 47 |
| (INRA. Prod. Anim., 2005)   |    |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 16a et 16b</b> : Montée par capillarité dans la paillette OPS.....                | 48 |
| (D'après Vajta <i>et al</i> , 1998)   |    |
| <b>Figure 17</b> : Cryoloop contenant deux embryons (d'après Lane <i>et al</i> , 1999)..... | 48 |
| <b>Figure 18</b> : Courbe de descente de température lors de vitrification.....             | 49 |
| et vitrification ultra rapide(INRA Production Animale, 2005)                                |    |
| <b>Figure19</b> : Protocole de traitement de superovulation.....                            | 56 |
| <b>Figure 20</b> : Résultats globaux de récolte des embryons des deux vaches.....           | 61 |
| <b>Figure 21</b> : Classification des embryons des deux vaches.....                         | 62 |
| <b>Figure 22</b> : Embryons de différentes classes issus de la vache1 .....                 | 63 |
| <b>Figure 23</b> : Morula classe 2 issu de la vache1 .....                                  | 63 |
| <b>Tableau 1</b> :Diamètre externe (DE), épaisseur de la pellucide (EP).....                | 40 |
| d'embryons bovins (D'après Lonergan, 1992)  |    |
| <b>Tableau 2</b> : Classification des embryons selon leur qualité.....                      | 42 |
| (D'après l'INRA-UNCEIA, 1990).  |    |
| <b>Tableau 3</b> : Protocole de traitement de superovulation.....                           | 55 |
| <b>Tableau 4</b> : Evaluation globale de la réponse.....                                    | 58 |
| au traitement de superovulation   |    |
| <b>Tableau 5</b> : Appréciation de la réponse de la superovulation.....                     | 59 |
| via la palpation transrectale   |    |
| <b>Tableau 6</b> : résultats de récolte des embryons des deux vaches.....                   | 60 |
| <b>Tableau 7</b> : classification des embryons récoltés des deux vaches.....                | 61 |

## Partie bibliographique

**Introduction générale :**

La fertilité chez la vache est assurée par sa fonction ovarienne, soit le stockage d'ovocytes dans l'ovaire pendant la vie embryonnaire. En utilisant progressivement ce stock de gamètes, il y a croissance régulière de follicules dont quelques uns seulement ovulent. De plus, par la formation d'un corps jaune, l'ovaire assure la préparation de l'utérus à l'implantation de l'embryon. Lorsqu'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune régresse et donne lieu à une nouvelle poussée folliculaire qui provoque l'ovulation d'un autre ovocyte (Driancourt et al., 1991). Il est maintenant clair que la fertilité de la vache peut affecter la production bovine à plusieurs niveaux, soit la production de veaux de boucherie pour l'élevage, la production laitière et plusieurs autres niveaux économiques. Malheureusement, le gain génétique chez la vache est limité par l'intervalle entre les générations ainsi que par la production d'un seul veau en général par gestation (Lohuis., 1995). De plus, pour un certain pourcentage des animaux, cette reproduction naturelle n'est pas optimale dû à des problèmes d'infertilité.

Depuis quelques décennies, les techniques de reproduction assistées ont grandement évolué chez les bovins. Il y eut d'abord, au milieu de 20<sup>ème</sup> siècle, l'insémination artificielle. Ensuite, au début des années soixante-dix, la technique d'ovulations multiples et du transfert embryonnaire (OMTE) est apparue. Cette technique permet la production d'embryons de vaches de génétique supérieure à la moyenne de la race ou du troupeau. Elle consiste à l'induction de l'ovulation multiple chez les vaches donneuses, à l'aide d'injections hormonales, suivies de l'I.A. Les embryons produits in vivo (dans l'animal), âgés d'environ sept jours, sont récoltés, congelés et / ou transférés chez des femelles receveuses.

Le transfert d'embryon chez la vache s'est beaucoup amélioré ces dernières années. On assiste maintenant au transfert non chirurgical (Sreenan, 1975, au sexage ; Hare et Coil, 1976) et à la conservation des embryons pour quelques années (Wilmot et Rowson, 1973; Saumande, 1980). Cependant, en dépit de ces progrès et de plusieurs décennies d'études et d'optimisations des techniques, la réponse superovulatoire aux traitements avec les gonadotropines reste très variable et le taux d'embryons produit par cycle de stimulation n'est pas bien corrélée avec le taux d'ovulation (Armstrong, 1993). Cette variabilité des réponses est encore si grande qu'elle contribue au coût élevé du transfert d'embryon et devient le facteur limitant dans le développement de programmes pratiques chez la vache.

La variabilité de la réponse ovulatoire a été associée à différents facteurs dont le moment de l'initiation du traitement superovulatoire (Guilbault et coll., 1991), l'activité

relative de FSH et LH dont le traitement (Murphy et coll., 1984), l'age de l'animal (Hasler et al , 1983) et les facteurs endocriniens (Callesen et coll., 1986). Chez la vache, deux approches principales sont largement utilisées: une unique dose de eCG ou des traitements multiples avec la FSH porcine.

L'utilisation de la FSH porcine résulte en une réponse ovulatoire plus élevée que la eCG et par conséquent, d'une augmentation du nombre d'embryon suivie la plupart du temps, d'une augmentation du nombre de gestation (Elsden et coll., 1978).

Cependant l'utilisation de la FSH s'avère plus coûteuse que celle de la eCG. Par contre, le traitement de eCG fournit un grand nombre de follicules, dont la plupart sont des follicules anovulatoires. Les facteurs influençant le développement de ces follicules ne sont pas bien élucidés (Saumande et coll., 1984) et les raisons pour lesquelles la superovulation avec la FSH fournit plus d'embryons transférables qu'avec la eCG ne sont pas tout à fait connues.

**Chapitre I :**

**Rappels physiologiques**

## **I. Rappels physiologiques sur le fonctionnement ovarien dans l'espèce bovine :**

### **I.1. Introduction :**

L'ovaire des mammifères contient un énorme stock d'ovocytes qui sont formés au cours de la vie foetale (Driancourt et al., 1991), cependant, il ne reste qu'environ 200000 ovocytes à la naissance et de ceux-ci, un maximum de 300 se rendent à un stade préovulatoire (Erickson, 1966). La fonction principale de l'ovaire est d'assurer la croissance des follicules qui permettent la production d'un nombre limité d'ovocytes mûrs prêts à être relâchés. La formation de l'ovocyte est le résultat de plusieurs étapes de différenciation de l'ovogonie qui débutent dès la formation du foetus (Gordon, 1994).

Dès la puberté, un certain nombre de follicules quittent régulièrement (à chaque cycle d'environ 21 jours) leur réserve pour ovuler ou le plus souvent s'atrophier.

Les différentes étapes conduisant à l'ovulation constituent la folliculogénèse, sa durée est variable selon les espèces, elle débute chez la vache vers la sixième semaine de gestation.

### **I.2. Aspect morphologique :**

Le développement folliculaire chez la vache passe par trois 03 étapes qui sont la phase de multiplications, la phase de croissance et enfin phase de maturation.

#### **I.2.1. Phase de multiplication :**

Vers la sixième semaine de gestation chez la vache, les cellules germinales primordiales (cellules souches d'origines extra embryonnaires) colonisent après migration au travers de l'embryon le long de mésentère dorsal de l'intestin postérieur, la crête génitale et donnent naissance aux ovogonies, les cellules germinales souche après leur migration vont se multiplier entre le soixantième et le cent soixante dixième jours de gestation (Wandji et al, 1992).

Pendant la gestation une réserve de deux 02 millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase I ; elles se transforment en ovocytes I.

L'induction de la méiose serait contrôlée par un facteur d'origine mésonephrotique appelé MIS ( Meiosis inductive substance ) synthétisé par les cellules mésenchymateuses de l'ovaire ( Westergaard et al , 1985 ) , le contact des ovogonies avec les cellules d'origines mésonephrotique est donc indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires.

Chez la majorité des mammifères la multiplication se termine avant ou peu après la naissance ( Hanzen et al , 2000 ) , cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal, le nombre de follicules primordiaux a été estimé chez la vache à environ 40.000 vers l'âge de 2 à 3 ans et 2500 entre 12 à 14 ans ( Erickson , 1966 ) .

### **I .2.2. 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.

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

#### **I .2.2.1. Le follicule primordial :**

Cette étape coïncide avec l'isolement et l'arrêt méiotique des ovocytes pendant l'ovogenèse. Chaque follicule primordial contient un ovocyte primaire avec une seule couche de 4 à 8 cellules somatiques aplaties, aussi appelées des cellules de granulosa, et ce complexe est entouré d'une membrane basale faisant de ce follicule une entité distincte parmi le stroma fibreux. En effet, cette association entre l'ovocyte et les cellules de granulosa est essentielle à l'arrêt méiotique car sans celle-ci, l'ovocyte dégénère suite à la reprise de la méiose (Russe, 1983). Cette population de follicules, qui est à son maximum pendant la vie foetale, représente la réserve d'ovocytes pour la vie reproductive de la vache (Driancourt et al., 1991).

#### **I .2.2.2. Le follicule primaire :**

Ce caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par l'agencement a sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques , c'est durant cette période que l'ovocyte synthétise ; et secrète les glucoprotéines qui donneront naissance a une enveloppe hyaline poreuse ; la zone pellucide , d'une épaisseur d'une dizaine de microns , elle est constituée de 95 % de trois glycoprotéines organisées en longues filaments interconnectés , appelées ZP 1 , ZP 2 , ZP 3 , la ZP 3 forme avec la ZP 2 des filaments qui sont pontés par la ZP 1 seul la glycoprotéines ZP 3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (Yanagimachi, 1994).

**I .2.2.3.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 transformé en membrane de Slavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de proteohéparane sulfate.

**I .2.2.4.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 de cumulus oophorus.

Celles-ci se différencient en corona radiata, couche cellulaire entourant directement l'ovocyte. Ces cellules de cumulus et de la corona présentent de nombreuses zones jonctionnelles (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'atrévient ( 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 a la steroïdogénèse , et par la thèque externe formée d'un tassement de tissus conjonctif du stroma ovarien .

**I .2.2.5.le follicule mur ou le follicule de De Graaf :**

Représente la phase terminale du développement folliculaire, cette phase ne concerne qu'un follicule sur mille entré en croissance (Saumande, 1991), le follicule mur se caractérise par une taille maximale de 25 mm chez la vache , par un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse , gonflé de liquide , le follicule affleure en surface de l'ovaire , l'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et du cumulus oophorus , les thèques interne et externe sont bien différencies et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne , la thèque interne est une glande a part entière , la thèque externe est de nature fibreuse , une fois l'antrum formé , l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le

liquide folliculaires via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et la membrane basale, chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0,13 mm atteigne la taille préovulatoire (Lussier et al., 1987)

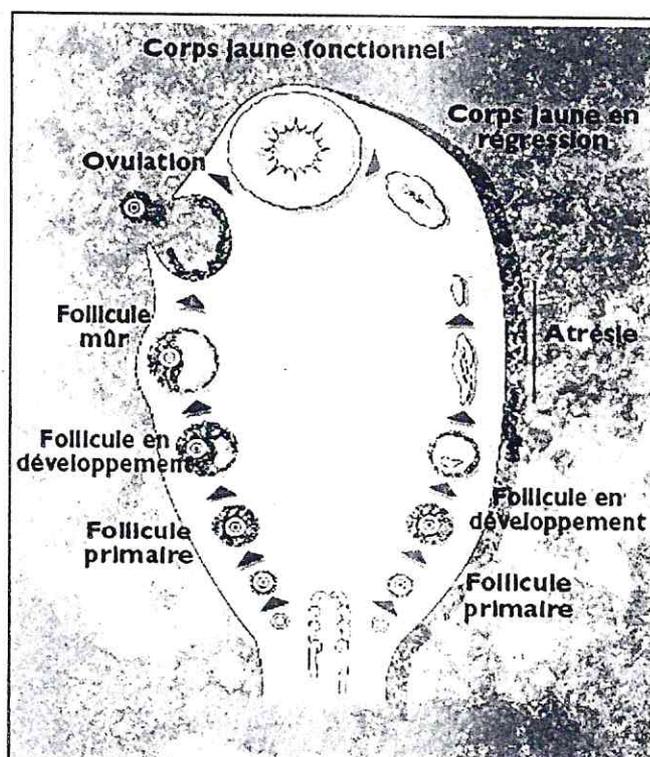


Figure 1 : Les différentes phases de la croissance folliculaire (AR.Peters et PJH.Ball, 1987)

### I.2.3. La phase de maturation :

Cette phase représente l'ensemble des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte, ces différentes modifications lui donne l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, lorsque l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa maturation nucléaire, c'est-à-dire la reprise de la méiose, celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire, l'ovocyte I se transforme en ovocyte II lors du cycle sexuel. La reprise de la division méiotique na lieu qu'après la décharge ovulante puis se termine avant l'ovulation,

L'activation des récepteurs à la LH des cellules de granulosa induite lors de la décharge ovulante permet non seulement à l'ovocyte de reprendre sa méiose, mais également de réaliser sa maturation cytoplasmique, préalable essentielle au succès de la fécondation (Henzen et al., 2000), l'ovocyte constitue ses réserves cytoplasmiques, parmi ces constituants, granules qui migrent à la périphérie de l'ovocyte, ils contiennent un ovopéroxydase

indispensable pour prévenir la polyspermie en empêchant la pénétration des spermatozoïdes supplémentaires.

Le cytoplasme synthétise une protéine préparant l'ovocyte à la fécondation et joue un rôle dans le développement précoce de l'embryon, au niveau membranaire se produit un ensemble de processus favorisant la reconnaissance spécifique de l'ovocyte par le spermatozoïde, un seul spermatozoïde fécondant doit avoir accès dans l'ovocyte sous l'effet de la membrane pellucide favorise et prépare la fusion entre le spermatozoïde et l'ovule et protège l'ovocyte contre la polyspermie ( Hanzen et al, 2000 ).

### **I.3. L'atrésie folliculaire :**

Au sein de la population de follicules ovariens, très peu ovulent étant donné que la très forte majorité de ceux-ci sont destinés à subir l'atrésie folliculaire (Hugues et Gorospe, 1991). L'atrésie ou involution folliculaire est un processus physiologique par lequel le follicule arrête sa croissance et sa différenciation cellulaire, régresse et disparaît. Ce processus permet l'élimination des cellules inutiles, développées incorrectement ou endommagées (Guthrie et al. 1995). Le follicule atrétique se distingue du follicule sain à plusieurs niveaux morphologiques et fonctionnels. Au niveau fonctionnel, le follicule atrétique est caractérisé par la perte de son activité aromatasase (production d'œstrogènes) et par une réduction de synthèse d'androgènes par les cellules de la thèque. Ceci résulte en des niveaux plus élevés en progestérone et des niveaux plus faibles en oestradiol comparativement à un follicule sain ( Jolly et al., 1994). Au niveau morphologique, la mort progressive des cellules de granulosa a lieu avec l'éventuelle destruction de toutes ces cellules (Jolly et al., 1994). L'ovocyte est affecté seulement dans les dernières étapes de l'atrésie folliculaire (Driancourt, 1991).

Il a été démontré chez plusieurs espèces, que l'atrésie est provoquée par l'apoptose ou mort cellulaire programmée (Tilly et al. 1991 ; Hughes et Gorospe, 1991).

### **I.4.Regulation hormonale:**

Pendant la régulation hormonale deux phases sont distinguées ; la première est indépendante des gonadotrophines, elle est sous la dépendance de facteurs intra ovarien dont l'activine (Drion et al .1998) elle concerne chez la vache les follicules de taille inférieure à 5 mm, la deuxième phase dépend des gonadotrophines (FSH, LH) ainsi que d'autres facteurs intra et extra ovariens.

#### **I.4.1. Phase gonadotrope indépendante :**

Chez les mammifères, les facteurs déclanchant l'entrée en croissance des follicules primordiaux restent mal connus, chez la vache, l'inhibition de la libération de l'hormone FSH par l'administration à long terme d'agoniste de la GnRH, n'empêche pas certains follicule d'évoluer jusqu'à un diamètre compris entre 6 et 7 mm (Webb et al., 1994). Cette observation confirme l'absence du rôle essentiel des hormones gonadotropes pendant les premières étapes du développement folliculaire, la FSH agirait, à ce stade du développement, plus sur les capacités de synthèse et de maturation des cellules de la granulosa que sur la croissance proprement dite (Driancourt et al., 1991), ce sont les facteurs de croissance produits localement qui jouent le plus grand rôle dans le développement folliculaire et dans la préparation à l'entrée dans la phase gonadotrope dépendante.

Ainsi l'activine synthétisée par les cellules de la granulosa serait responsable de l'acquisition par les cellules de la granuleuse de récepteurs à la FSH (Xiao et al., 1992).

#### **I.4.2. La phase gonadotrope dépendante :**

Cette phase, également qualifiée de folliculogenèse tonique par opposition à la précédente appelée folliculogenèse basale (Driancourt, 1991), commence chez la vache lorsque les follicules ont atteint une taille limite de 4 mm (Moser et al., 1989)

L'acquisition de cette taille correspond à diverses modifications histologiques et hormonales du follicule; il acquiert une thèque vascularisée qui autorise d'avantage d'échanges avec l'environnement ovarien du follicule, sa capacité stéroïdogène augmente et se traduit par une augmentation de la synthèse d'oestradiol, la vitesse de multiplication des cellules de la granuleuse s'accroît puis se réduit lorsque le follicule atteint le stade préovulatoire.

#### **I.5. Dynamique de la croissance folliculaire :**

La régulation de la croissance folliculaire est complexe chez la vache. A partir de la puberté, la croissance folliculaire est permanente et des vagues de croissance et d'atrésie se succèdent. A partir du pool de follicules ovariens (follicules primordiaux), 15 à 30 follicules vont commencer leur développement chaque jour et quitter la réserve. Au bout de plusieurs mois, certains atteignent le stade de follicule tertiaire. Trois phénomènes vont ensuite se succéder : recrutement, sélection et dominance (Mialot et Chastant, 2000).

**I.5.1. Recrutement :**

Le recrutement est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonadodépendants, il concerne chez les ruminants 2 à 5 follicules de taille comprise entre 3 et 6 mm (Driancourt et al, 1991). Ces follicules ont dépassé le stade où habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiqes. Le recrutement est un phénomène aléatoire, provoqué par l'augmentation transitoire du taux circulant de FSH (Follicle Stimulating Hormone).

**I.5.2. Sélection :**

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

**I.5.3. Dominance :**

La dominance fait suite à la sélection. Elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire. Le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression de follicules en croissance, ou d'inhiber la croissance d'autres follicules, et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié. La dominance correspond au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide de volume du (ou des) follicule(s) ovulatoire(s). Bien que la FSH diminue, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne (l' oestradiol qu'il produit amplifie sa synthèse d' IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) qui stimule sa synthèse d'oestradiol). La suite de l'évolution du follicule dominant dépend de l'évolution de la progestéronémie. Si la progestéronémie diminue, c'est-à-dire s'il y a lutéolyse, alors que le follicule dominant de la deuxième vague est en phase de croissance, il ovule. Si, à l'inverse, la progestéronémie se maintient à un niveau élevé après que le follicule dominant ait atteint sa taille maximale, il commence à régresser, et une autre vague de croissance apparaît (Drion et al, 1996).

Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules tertiaires antraux de diamètre égal ou supérieur à 5 mm parmi lesquels apparaît le follicule dominant. Chez la vache, un cycle ne comporte habituellement que 2 ou 3 vagues. Chaque vague comporte un follicule dominant. Si 3 vagues sont observées, elles débutent en général aux 2<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jours du cycle. Si 2 vagues sont observées, elles apparaissent

aux 2<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jours du cycle (Drion et al, 1996). Ceci explique la variation de la longueur des cycles parfois observés.

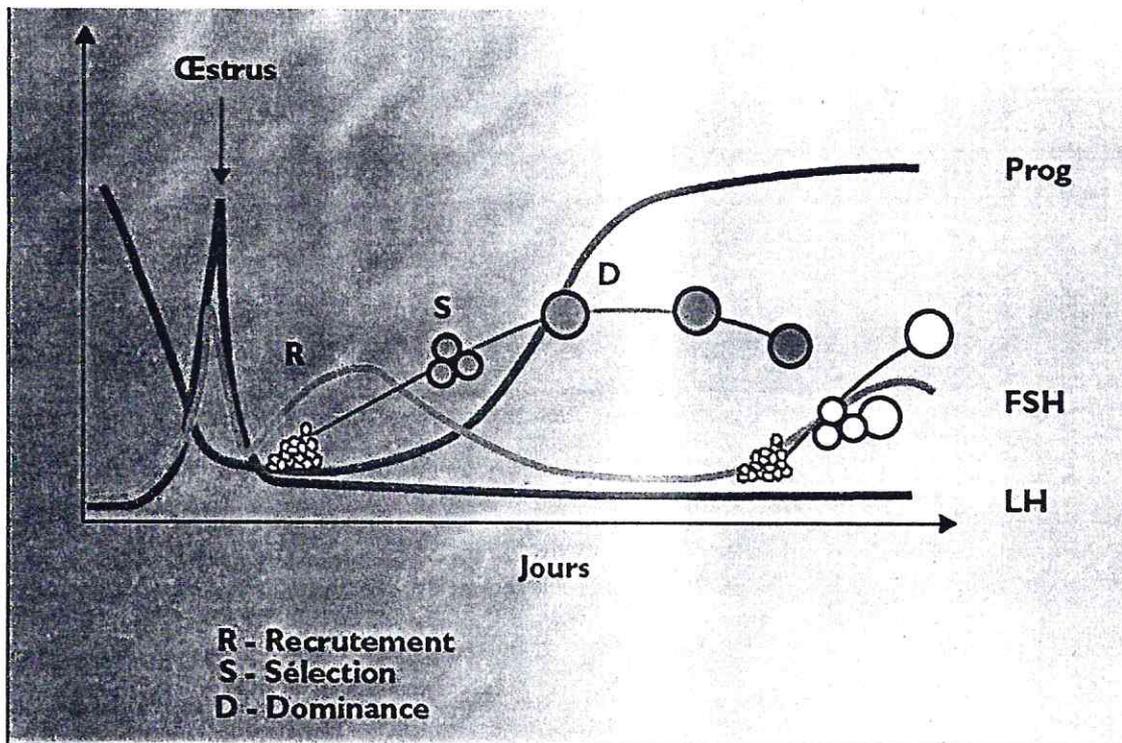


Figure 2 : Description d'une vague folliculaire (Ennuyer, 2000)

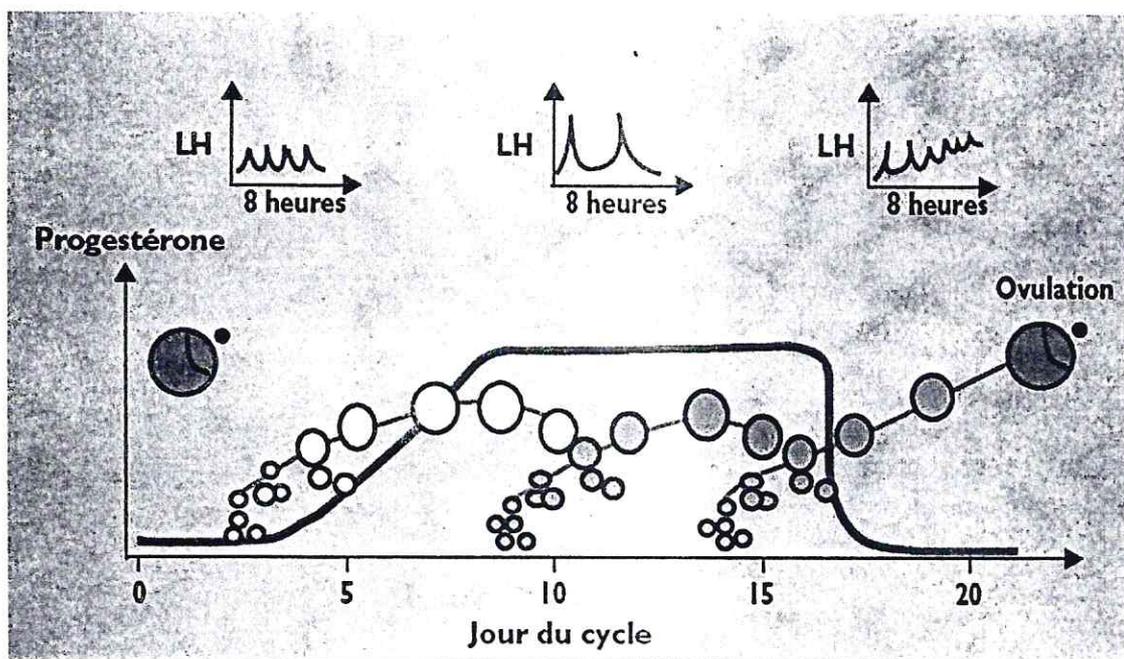


Figure 3 : Evolution des vagues folliculaires au cours d'un cycle chez la vache (Ennuyer, 2000)

## II. Caractéristiques du cycle oestral chez la vache :

### II.1. Introduction :

Le cycle oestral bovin dure en moyenne 21 jours chez la vache et 20 jours chez la génisse. L'oestrus dure environ 12 à 16 heures et l'ovulation se produit 10 à 12 heures après cette période. La chaleur, ou oestrus, représente le moment du cycle sexuel où une vache accepte d'être montée par le mâle ou, en l'absence de ce dernier, par une autre femelle (Gordon, 1994). Chez la vache, la première chaleur se produit à l'âge d'environ huit mois et à un an, le cycle oestral est bien évident.

Le cycle oestral est composé de deux phases: une phase lutéale et une phase folliculaire. La phase lutéale débute suite à l'ovulation et à ce moment, le follicule se transforme en corps jaune qui persiste jusqu'au jour 16 à 18 du cycle oestral (jour 0 = oestrus). Pendant la phase lutéale, le corps jaune sécrète de la progestérone et maintient des niveaux élevés de cette hormone. La phase folliculaire débute au moment de la régression du corps jaune vers le jour 18 du cycle, où on observe une diminution des concentrations de progestérone.

A la fin du cycle oestral, il y a formation d'un follicule préovulatoire qui sécrète de plus en plus d'œstrogène. Lorsque les niveaux de ce dernier atteignent une concentration sanguine suffisante, il y a déclenchement des chaleurs.

### II.2. Hormones intervenants dans la régulation du cycle oestral :

#### II.2.1. Hormone hypothalamique (GnRH) :

Chez 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 folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (Roches 1997).

Le caractère pulsatile de la sécrétion du GnRH semble jouer un rôle important dans la libération des gonadotrophines. En effet, l'administration exogène continue de peptide a une dose relativement élevée, soit in vivo, soit in vitro, provoque dans tous les cas une perte progressive de la réponse LH et FSH de l'hypophyse. La nature de la liaison entre le système nerveux central et l'hypophyse via le système porte hypothalamo-hypophysaire permet une

stimulation très fine des cellules gonadotropes. C'est à ce niveau que le message hormonal, plus lent, sert à coder l'état physiologique.

Ainsi, chaque pulse de GnRH est suivie d'une pulse de LH, lui même suivi d'une pulse d'oestradiol ou de progestérone. Enfin, à coté de son action sur la sécrétion des gonadotropines, la GnRH stimule la biosynthèse de LH et de FSH (Caraty et al, 1997).

Le mode d'action de la GnRH est double. D'une part, elle entraîne une libération rapide et transitoire des gonadotropines et d'autres part, elle exerce une stimulation à long terme sur la synthèse de ces hormones. Cette action est consécutive à la fixation de la GnRH avec une affinité sur des récepteurs membranaires de nature glycoprotéique. La GnRH est une des rares hormones à induire la synthèse de ses propres récepteurs.

## **II.2.2. Hormones hypophysaires (FSH, LH)**

### **II.2.2.1.FSH :**

La FSH (follicle stimulating hormone) est une glycoprotéine synthétisée par l'antéhypophyse. Elle contrôle le développement de l'ovaire et la croissance folliculaire, prépare l'action de la LH (luteinising hormone) par la fragilisation de la membrane de follicule et stimule la synthèse des oestrogènes par les follicules (Rieutort, 1995).

La FSH contrôle l'aromatase, enzyme responsable de l'aromatation des androgènes en œstrogènes et dont l'activité est plus importante dans le follicule dominant que dans les follicules dominés (Hanzen, 2000). Elle stimule la multiplication des cellules de granulosa et la formation de l'antrum, d'autant plus fortement qu'il existe une imprégnation préalable par les oestrogènes (Rieutort, 1995)

### **II.2.2.2.LH :**

La LH, c'est une glycoprotéine sécrétée par l'antéhypophyse :

- Elle contrôle la maturation finale des follicules avec le FSH, provoque l'ovulation, induit la formation du corps jaune et la synthèse de progestérone (Derivaux et Ectors. 1980).
- Elle stimule la sécrétion de différents stéroïdes (oestrogènes, progestérone) (Sairam, 1974).

### II.2.3. Les stéroïdes ovariens :

#### II.2.3.1. Les œstrogènes :

Oestrogène signifie qui provoque l'oestrus. Secrétés par les cellules de la thèque interne des follicules et par les cellules interstitielles. Parmi les oestrogènes, l'hormone essentielle sécrétée par l'ovaire est représentée par le  $17\beta$  oestradiol (Vaissaire, 1977).

A forte dose, elles exercent une rétroaction positive sur la sécrétion hypophysaire (FSH, LH), à faible dose elles exercent une rétroaction négative sur la sécrétion hypophysaire (INRAP, 1988). Leur taux est relativement faible en dehors de la phase folliculaire. Ainsi, chez la vache il est de 8,6pg/ml au moment de l'oestrus et de 1,7pg/ml au lendemain de celui-ci (Derivaux et Ectors, 1980).

Les œstrogènes sont avant tout les hormones de la croissance du tractus génital, ils entraînent la congestion, l'œdème et la croissance cellulaire (Fontaine, 1995)

#### II. 2.3.2. La progestérone :

Signifie qui permet la gestation ; sécrétée par les cellules lutéiniques du corps jaune, elle est également synthétisée dans la corticosurrénale et dans le placenta de certaines espèces (Derivaux et Ectors, 1980).

Les effets centraux de la progestérone sont essentiellement représentés par son effet rétroactif (feed back) négatif sur la sécrétion de gonadolibérine (Fontaine, 1995). Elle freine la production d'oestradiol, d'où l'effet inhibiteur indirect qu'exerce localement le corps jaune ovarien sur la croissance folliculaire (Dupoul, 1993), ainsi elle stimule l'activité sécrétoire de l'endomètre, diminue la tonicité du myomètre et sa sensibilité à l'ocytocine (Derivaux et Ectors, 1980)

### II.2.4. les peptides ovariens :

#### II.2.4.1. Inhibine :

L'Inhibine est une glycoprotéine, formée de deux sous unités alpha et bêta (Combarous, 1994), appartenant à la famille des Transforming Growth Factor-b (TGF-b), elle est synthétisée au niveau des cellules de la granulosa chez les bovins. De nombreuses régulations interviennent pour contrôler sa sécrétion endocrine (FSH et LH), paracrines (l'epidermal growth, le TGF-b, l'interféron 9, l'androsténedione) et autocrine (l'IGF-1, le TGF-b, l'activine et la FSP«FSH-suppressing protein») (Findlay, 1993).

L'Inhibine présente une dualité d'action. La première s'exerce de manière locale, c'est-à-dire au niveau des follicules eux-mêmes : l'Inhibine limiterait de manière autocrine la

conversion d'androgène en Oestrogène par action sur l'aromatase présente au niveau des cellules de granulosa (Woodruff et al, 1990). La seconde action de l'Inhibine est périphérique : elle inhibe la sécrétion de FSH hypophysaire.

#### **II.2.4.2. Activine :**

L'activine est formée de l'association de deux sous unités bêta non glycosilées de l'Inhibine et est synthétisée au niveau de cellule de la granulosa. On la retrouve, tout comme l'Inhibine, au niveau du liquide folliculaire. L'activine semble réguler de manière autocrine la différenciation des cellules de la granulosa en relation avec l'état de maturité du follicule. Elle contrôlerait, de plus, l'acquisition par ces cellules de récepteurs à la FSH. Elle constitue ainsi un élément régulateur autocrine essentielle du passage des follicules du stade gonadotrope indépendant à un stade gonadotrope dépendant. A la différence de l'IGF-1, elle peut exercer cet effet en l'absence de FSH (Adashi et al., 1988). Par ailleurs, l'activine empêcherait la lutéinisation précoce du follicule antral, ce qui permettrait de maintenir l'évolution folliculaire (Findlay, 1993)

#### **II.2.4.3. Follistatine :**

Le follistatine (FSP, «FSH-suppressing protein») est une glycoprotéine produite majoritairement par les cellules de la granulosa qui semble moduler de manière autocrine le fonctionnement des cellules de la granuleuse : en présence de FSH, elle inhibe leur activité, aromtase et leur production de progestérone. Elle favorise dès lors la lutéinisation ou l'atrésie folliculaire par neutralisation des effets folliculaires de l'activine, elle a été répertoriée comme activin binding protein (Nakamura et al, 1990) antagonisant l'effet de l'activine au niveau pituitaire, la production de follistatine dépendant de la FSH, de l'activine et de l'état évolutif ou atrétique du follicule.

### **II.3. Rétrocontrôle stéroïdien sur l'axe hypothalamo- hypophysaire :**

#### **II.3.1. Feed back négatif :**

L'oestradiol active les systèmes catécholaminergiques, et notamment ceux utilisant la dopamine qui est inhibitrice de la fréquence des émissions pulsatiles de GnRH. L'oestradiol agit en modifiant l'activité enzymatique de ces systèmes en ralentissant la dégradation au 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 à la  $\beta$ -endorphine est impliquée

dans l'inhibition des pulses de la GnRH observés pendant la phase lutéale des femelles de mammifères (espèce humaine comprise) au cours des cycles oestriens ou menstruels (Combarous et al., 1997).

### II.3.2. Feed back positif :

L'oestradiol, après une période d'inhibition, induit une très forte stimulation de la sécrétion de GnRH entraînant la décharge pré ovulatoire de gonadotrophines. 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 pré ovulatoire.

Comme pour le feed back négatif, l'absence de récepteurs à oestradiol sur les neurones à GnRH pose le problème crucial du site et du mécanisme par lesquels le stéroïde induit en quelques heures le pic pré ovulatoire de GnRH.

Quelques heures avant le pic chez la brebis ou la rate, il existe une activation des opiacés endogène, et plus particulièrement de la  $\beta$ -endorphine, qui permettra une accumulation de GnRH dans les terminaisons neuronales (Domanski et al, 1991). Puis à la chute de  $\beta$ -endorphine succéderait une activation des systèmes adrénérgiques et noradrénérgiques, conduisant à la libération pré ovulatoire de GnRH.

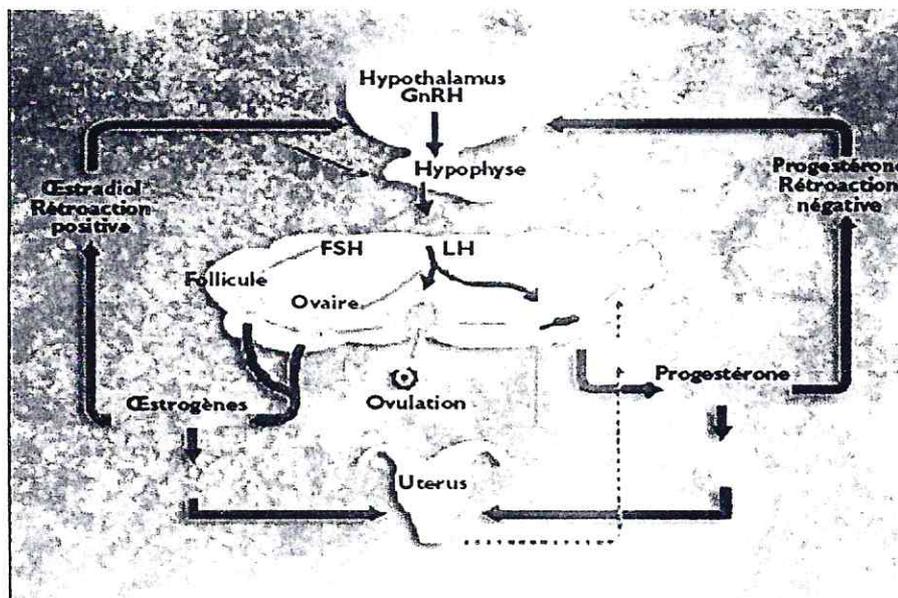


Figure 4 : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Peters et Ball, 1994)

## II.4. Les différentes phases du cycle oestral chez la vache :

### II.4.1. proestrus :

Au stade de pro-oestrus, un ou plusieurs follicules ovariens sont en voie de maturation sous l'influence de la FSH et LH, l'action de cette dernière devient progressivement prédominante et il en résulte une production de plus en plus grande d'hormone folliculaire par le granulosa (œstrogènes), elle dure en moyenne 3 jours chez les ruminants. Pendant le pro oestrus les glandes utérines prolifèrent et le volume de l'utérus augmente (Kolb, 1975).

Le pro oestrus est synchrone du déclin d'activité du corps jaune ; il débute vers le 17<sup>ème</sup> jour et il est nettement précisé au 19<sup>ème</sup> jour avec l'ascension du taux plasmatique des œstrogènes (Derivaux et Ectors, 1980)

### II.4.2. Oestrus :

Période de maturation et éclatement du follicule, ponte ovarienne, acceptation du mâle (Fontaine, 1995). L'oestrus est de courte durée, en moyenne de 14 à 15 heures et l'ovulation qui est spontanée, survient environ 14 heures après la fin des chaleurs (INRAP, 1988). L'oestrus est plus ou moins marqué selon les individus, il se traduit surtout par de l'agitation, les animaux essaient de monter sur les autres, l'appétit diminue. L'ovulation se produit à la fin des chaleurs. Pendant la période de l'oestrus, la muqueuse vaginale est fortement congestionnée, le col est ouvert et permet le passage des spermatozoïdes (Kolb, 1975)

### II.4.3. Metoestrus :

Correspond à l'installation du corps jaune et va du jour 1 au jour 6 du cycle (INRAP, 1988). Le devenir du corps jaune est conditionné par celui de l'ovule ; si celui-ci est fécondé, le corps jaune reste actif et empêche la maturation du nouveau follicule. Si la fécondation n'a pas eu lieu, le corps jaune régresse (Kolb, 1975).

### II.4.4. Dioestrus :

Correspond à la période d'activité du corps jaune (synthèse de la progestérone) (Soltner, 1999), dont la durée est réglée par l'activité lutéale, elle est de 10 à 11 jour (6<sup>ème</sup> au 17<sup>ème</sup> jours du cycle) (Derivaux et Ectors, 1980).

### **III. Fécondation et développement embryonnaire :**

#### **III.1. Fécondation :**

La fécondation résulte de l'union d'un gamète mâle, le spermatozoïde et d'un gamète femelle, l'ovule. Chez la vache, cette fécondation s'accomplirait près de la jonction isthmo-ampoulaire de l'oviducte peu de temps après l'ovulation (environ 2 heures) (Hunter, 1985).

Après la fécondation, l'embryon se dépouille des dernières cellules de la corona radiata l'entourant mais conserve intacte sa zone pellucide (ZP) (Crozet, 1984). La ZP est une structure perméable, acellulaire et translucide entourant déjà l'ovocyte dans la cavité folliculaire.

La présence de la ZP jusqu'au stade morula compacte serait essentielle au développement normal de l'embryon, elle permettrait la cohésion des blastomères et jouerait un rôle de protection et de maintien de l'homéostasie de l'espace périvitellin (Trounson et Moore, 1974). Elle joue aussi un rôle important dans le contrôle de la polyspermie (Wolf, 1981).

Chez la plupart des mammifères, si la rencontre n'a pas lieu endéans les heures qui suivent leur libération, les gamètes dégèrent.

#### **III.2. Développement embryonnaire précoce :**

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.

L'œuf fécondé apparaît comme une grosse cellule à deux noyaux, pronucléus mâle et pronucléus femelle, ils fusionnent rapidement en un noyau unique qui ne va pas tarder à se diviser en deux, quatre, huit puis seize cellules, toujours entourées de la zone pellucide (Derivaux et Ectors, 1980).

Cette masse cellulaire qui n'a fait que diviser le cytoplasme de l'ovule sans augmenter de volume, ressemble, au microscope, à une petite mure, 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 atteindra au bout de 4 à 5 jours chez la vache.

##### **III.2.1. Premières divisions cellulaires :**

La pénétration du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte dans les deux heures qui suivent l'ovulation déclenche l'expulsion du second globule polaire, la reprise de la division cellulaire et la formation de deux blastomères 24 à 48 heures environ après la fécondation

(Gandolfi et al, 1993). 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 heures, jusqu'au stade 8 cellules, les divisions sont égales, mais s'effectuent sans régularité (Scriban, 1999).

A partir du stade 16-32 cellules, des contacts s'établissent entre les blastomères, des jonctions sont de plus en plus étroites, l'embryon devient une morula compactée à 32 cellules.

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).

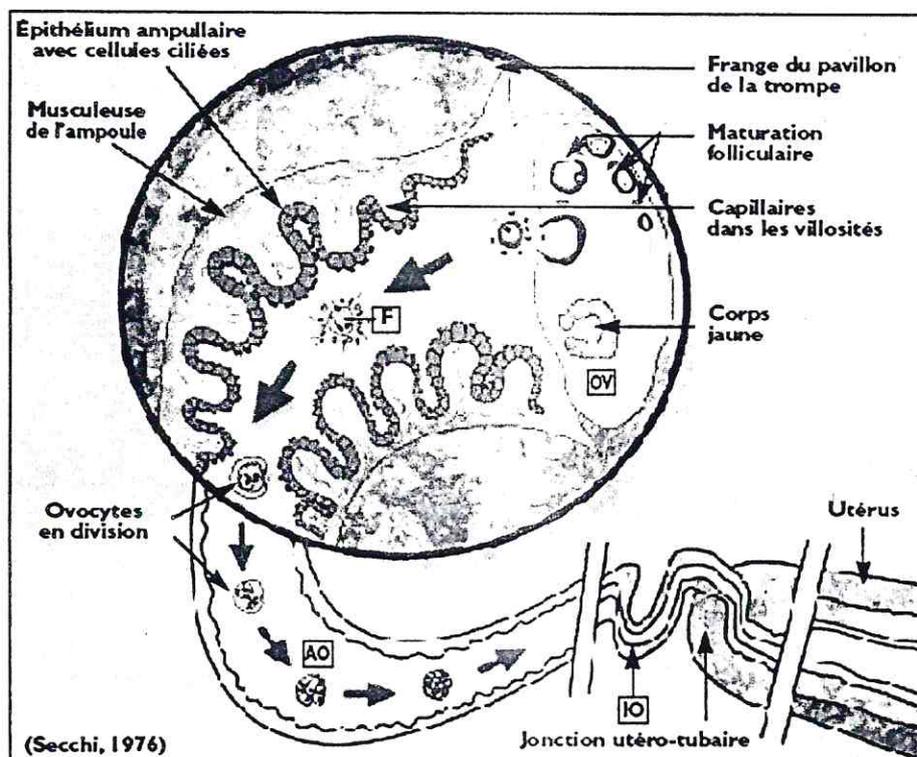


Figure 5 : Fécondation et premières divisions de l'embryon (Secchi, 1976)

### III.2.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation :

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 en quelques cellules plus volumineuses se

groupant en une petite masse (bouton embryonnaire), et autres cellules, plus petites, se placent à la périphérie formant une couche appelée trophoblaste, l'ensemble est appelé blastocyste.

L'éclosion c'est-à-dire la sortie du blastocyste hors de sa pellucide vers le 9<sup>ème</sup> - 10<sup>ème</sup> jour suivant la fécondation, ne résulte pas d'une lyse enzymatique, des membranes pellucides intactes peuvent être retrouvées dans l'utérus, mais de la formation d'un point de perforation. Ce processus à une durée moyenne de 12 heures. Diverses modalités ont été décrites : la phase d'expansion est continue et suivie de l'éclosion, elle peut être discontinuée et être entrecoupée de quelques phases de contractions se terminant ou non par une éclosion normale.

Vers le 11<sup>ème</sup> - 12<sup>ème</sup> jour de gestation, le blastocyste se compose de 100 cellules, environ 25% d'entre elles seulement constituant le bouton embryonnaire recouvert jusqu'à ce moment par le trophoctoderme. De la forme sphérique, le blastocyste prend progressivement un aspect ovoïde avant d'entamer vers le 12<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour sa phase d'élongation.

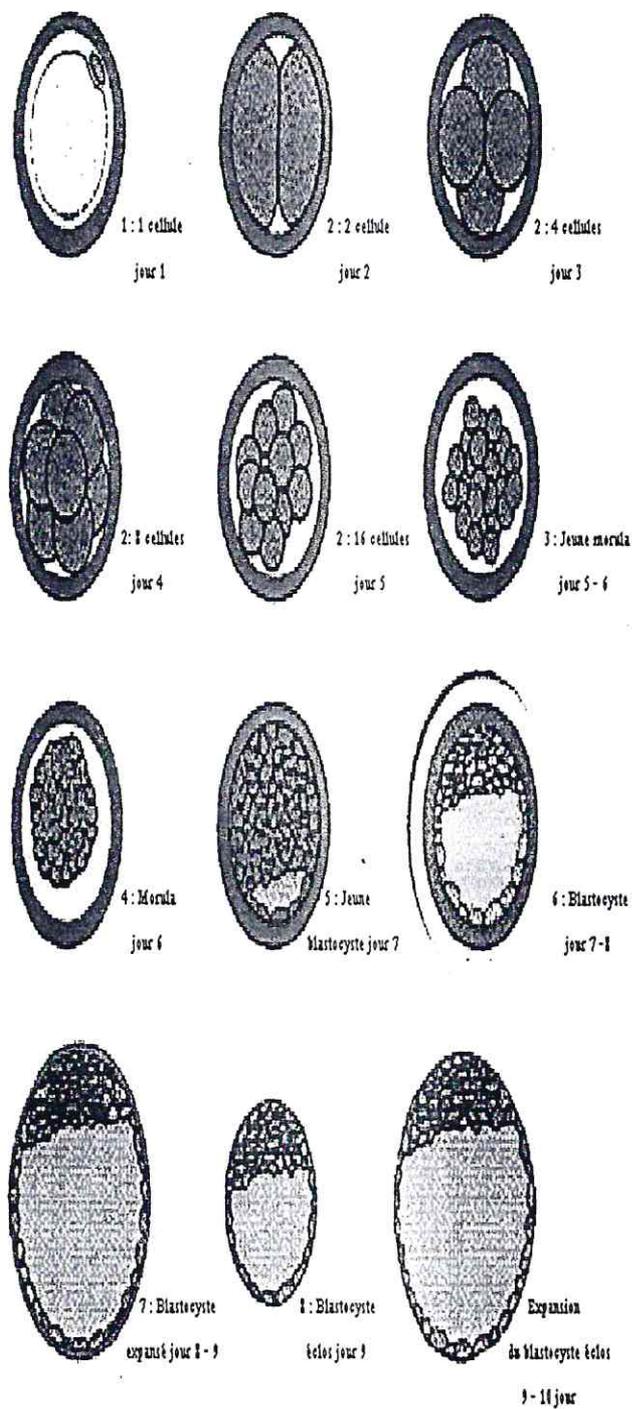
### III.2.3. L'implantation :

La fixation ou ovo-implantation représente une étape importante du développement. Pour que l'implantation ait lieu, il est nécessaire qu'un œuf normal arrive, à un moment convenable, au contact d'une muqueuse utérine ayant subi les modifications nécessaires à la suite de certaines incitations hormonales dans lesquels l'hypophyse et l'ovaire jouent un rôle prépondérant et même indispensable dans toutes les espèces (Derivaux et Ectors, 1980).

Le trophoblaste différencié vers le 5<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> jour de gestation, constitué de l'endoderme, et du trophoctoderme. Il débute à ce moment sa phase d'élongation jusqu'à atteindre une longueur de 2,5 cm en moyenne au 16<sup>ème</sup> jour de gestation (Betteridge et Flechon, 1988).

Les premiers contacts tissulaires entre le trophoblaste et la surface utérine s'observeraient selon les auteurs entre le 11<sup>ème</sup> jour et le 20<sup>ème</sup> -30<sup>ème</sup> jour de gestation qu'un processus d'adhésion entre les structures maternelles et embryonnaires se mettrait en place (King et al, 1982).

L'embryon est considéré comme implanté lorsque sa position dans l'utérus est fixée et que des contacts physiques et définitifs sont établis avec l'organisme maternel (Derivaux et Ectors, 1980).



**Figure 6 :** Correspondance de l'état d'évolution de l'embryon avec son âge (Peters et Ball, 1994)

**Chapitre II :**

**Superovulation et collecte  
d'embryons**

## Chapitre II : Superovulation et collecte d'embryons :

### 1. Introduction :

La superovulation est un traitement hormonal à base d'hormones gonadotropes utilisé chez les bovins depuis une vingtaine d'années pour produire des embryons in vivo, collectés chez les femelles donneuses 6 à 8 jours après insémination.

La stimulation ovarienne par les hormones hypophysaires permet d'obtenir une augmentation de la quantité de follicule préovulatoire et, par suite, une augmentation du nombre d'ovulation. Cette technique est surtout utilisée pour obtenir davantage d'embryons lors des transferts embryonnaires.

Le principe est de court-circuiter les phénomènes de sélection et de dominance et d'amener jusqu'à l'ovulation les follicules, qui privés de FSH (Follicle Stimulating Hormone) et de LH (Luteinising Hormone), auraient subi le phénomène d'atrésie. La superovulation est réalisée soit à partir d'hormones chorionique (PMSG, Pregnant Mare Stimulating Gonadotropin), soit d'origine hypophysaire (FSH).

### 2. Superovulation :

#### 2.1. Les différentes hormones utilisées dans le traitement de superovulation :

Deux préparations hormonales à activité gonadotrope ont été utilisées, la PMSG ou eCG et la FSH. L'avantage de l'utilisation de la eCG est sa simplicité, puisque seule injection suffit, l'apport de l'anti PMSG a considérablement amélioré les résultats de la superovulation par cette hormone.

La FSH par contre présente l'inconvénient d'avoir une demi-vie très courte, ce qui nous oblige à faire plusieurs injections à intervalle régulier, mais le résultat global est plus intéressant.

##### 2.1.1. Utilisation de l'eCG (PMSG) :

La PMSG sécrétée par le placenta de jument grvide entre le 50<sup>ème</sup> et le 150<sup>ème</sup> jour de gestation, est également dotée de propriétés FSH. Comme l'hormone hypophysaire, elle peut intervenir sur le développement folliculaire pour le transformer en follicule a antrum et a conduire a la superovulation (Parez et Duplan, 1987). La PMSG présente une double activité FSH et LH. /

Du fait de sa longue demi-vie (120h), elle représente une facilité d'emploi (1 seule injection suffit : 2000 à 3000UI par voie IM). Cependant, cette demi-vie longue présente l'inconvénient de continuer à stimuler la croissance folliculaire après la décharge de LH, d'où une sécrétion élevée d'oestradiol préjudiciable au développement embryonnaire (Nibart, 1991).

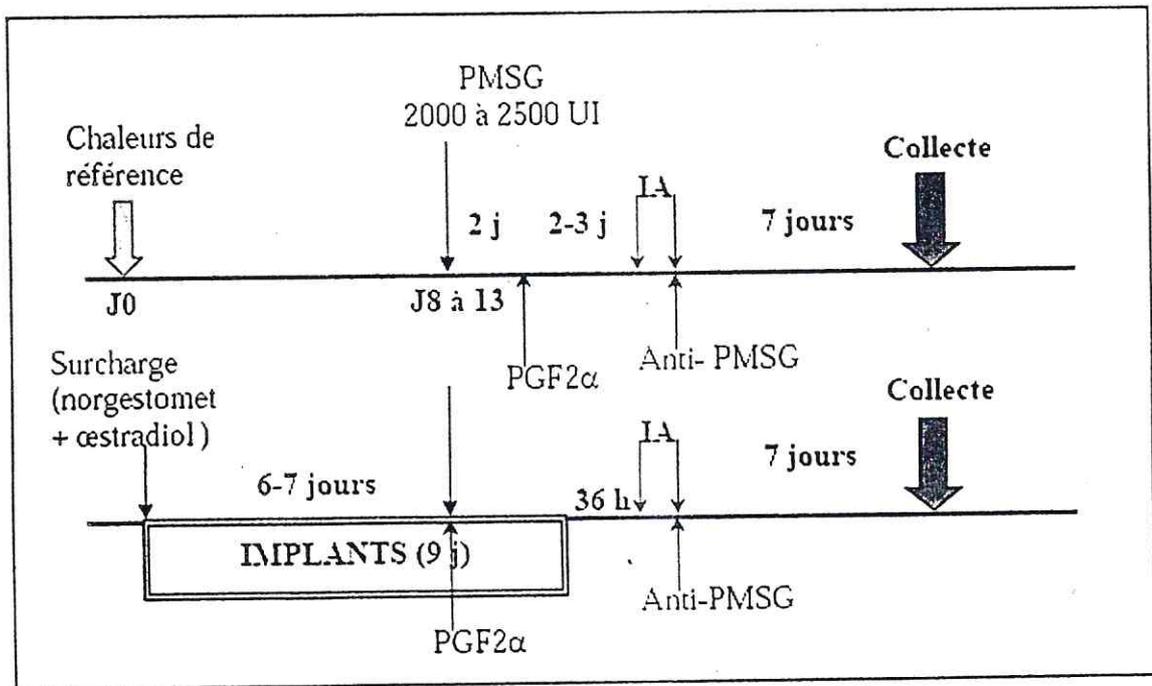


Figure 7 : Schéma de traitement de superovulation par PMSG (en phase lutéale d'un cycle maîtrisé par des implants de progestérones) (d'après Nibart, 1991)

### 2.1.2. Utilisation de la FSH :

Les extraits purifiés d'hypophyse de mammifères (principalement le porc), contiennent de la FSH et de la LH. La demi-vie très courte (70 minutes) nécessite une administration biquotidienne pendant 4 jours pour maintenir un taux de stimulation suffisant (Nibart, 1991).

Les doses administrées varient en fonction du type d'animaux stimulés : de 28 mg de FSH pour les génisses de race laitière à 50 mg pour les vaches, en injections à rythme constant et à dose décroissante (Nibart, 1991). L'utilisation des extraits hypophysaires a permis une nette amélioration de bons embryons, et plusieurs préparations ont été testées. Beckers et al, (1977) ont

remarqué une nette différence d'activité entre la FSH bovine et porcine, à cause de la faible teneur d'acide sialique de la FSH bovine. Leurs concentrations atteignent une valeur maximale 3 heures après leur injection, ils ne sont plus décelables 12 heures après l'injection, leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la PMSG.

La répétition d'un traitement de superovulation sur le même animal est possible, si un délai de 2 à 3 mois sépare chaque traitement et notamment si un type de traitement alterne avec l'autre (Parez et Duplan, 1987).

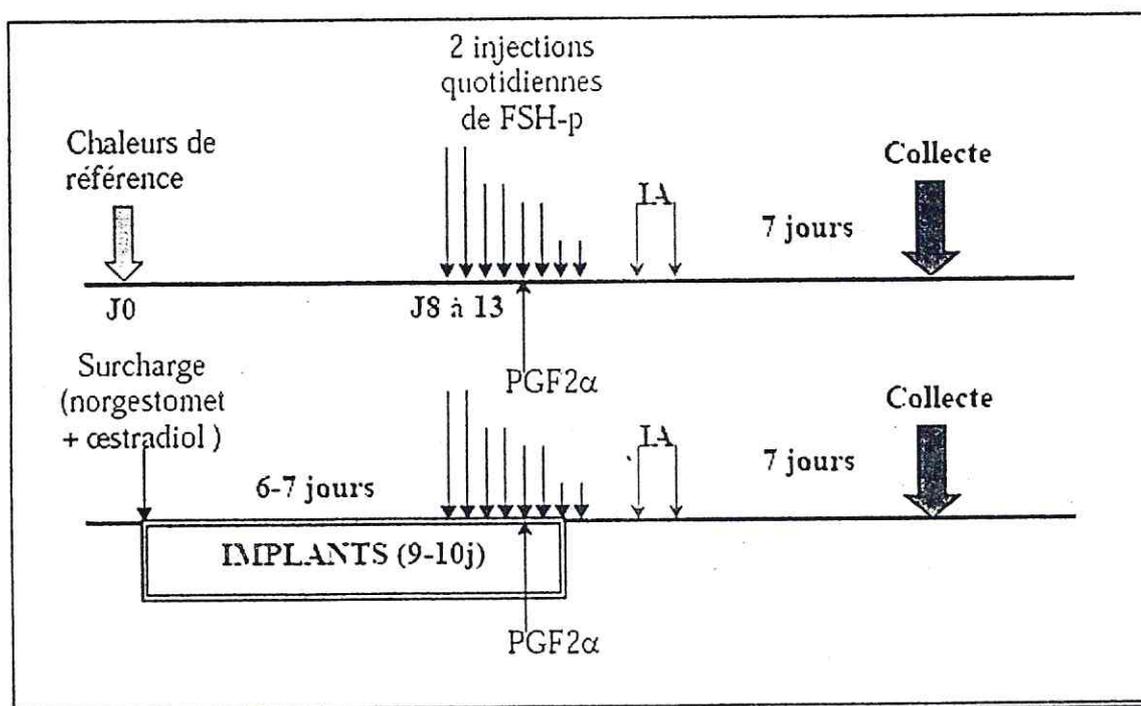


Figure 8 : Schéma de traitement de superovulation par FSH-p (en phase lutéale d'un cycle maîtrisé par des implants de progestérones) (d'après Nibart, 1991)

## 2.2. Importance du statut ovarien au moment du traitement :

### 2.2.1. Statut ovarien au début du traitement :

Traditionnellement, les traitements de superovulation débutent à J9 ou J10 du cycle (J0= oestrus). Selon Birnie et al (1998) le jour du cycle auquel débute le traitement de superovulation est corrélé à la réponse ovarienne, le 10<sup>ème</sup> jour du cycle étant le jour où la réponse est optimale (comparaison réalisée du 3<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour du cycle). Par contre, Wilson et al (1990) n'ont pas

enregistré de différences significatives sur le nombre de corps jaunes, ni sur le nombre d'embryons/ ovocytes non fécondés récoltés lorsque le traitement débutait entre le 10<sup>ème</sup> et le 13<sup>ème</sup> jour du cycle.

Cette recommandation est liée à la nécessité d'intervenir pendant la phase de sélection des follicules de J7 à J10 du cycle (Britt et Holt, 1988). Généralement cette période permet d'éviter les effets négatifs du follicule dominant et d'autoriser une meilleure efficacité du traitement de superovulation. A ce moment, la présence d'un corps jaune fonctionnel assure le développement synchrone de follicule et évite une sécrétion de LH. Selon Kafi et McGowan (1997), la présence de ce corps jaune est indispensable.

Enfin, comme l'émergence d'une vague de croissance folliculaire a lieu en début de cycle, Goulding et al (1990) ont cherché à débiter le traitement de superovulation au 2<sup>ème</sup> jour du cycle.

Ils ont eu une réponse plus faible en terme d'ovulation et d'embryons transférables qu'en milieu du cycle. L'explication serait selon Kohram et al (1998), qu'un pic de LH survenant dans les 2 jours précédents la superovulation, compromettrait la capacité des follicules à ovuler et à produire des embryons viables.

### 2.2.2. Effet de la présence ou non du follicule dominant :

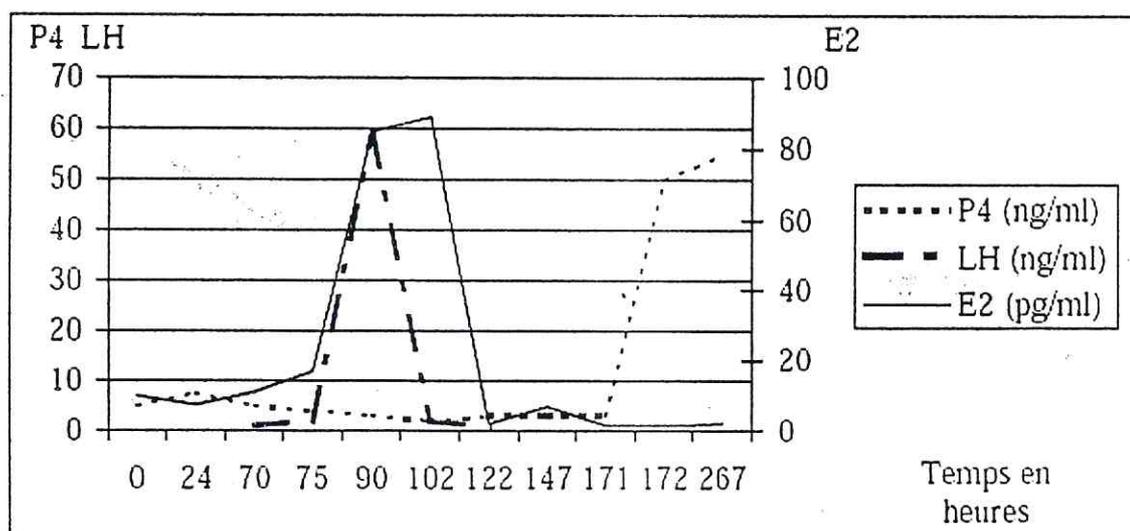
Dans toutes les études, la définition du follicule dominant est très importante afin de pouvoir comparer les résultats. Les critères retenus sont le diamètre et l'augmentation de la taille du follicule (Lee et al, 2000). Selon les auteurs, la définition du follicule dominant est différente : la croissance ou la stabilité du plus gros follicule (>9 mm de diamètre) pendant 4 jours (Guilbault et al, 1991) ou 3 jours (Huhtinen et al, 1992) est le plus couramment retenu. Cependant, les résultats diffèrent quelque peu selon la définition choisie, ce qui explique que certaines comparaisons entre études ne peuvent être interprétées.

L'examen échographique des ovaires doit donc être réalisé quotidiennement pour visualiser la croissance des follicules et définir avec certitude la présence du follicule dominant (Guilbault et al, 1991). Un examen échographique unique des ovaires ne peut pas clairement identifier la présence d'un follicule dominant (Huhtinen et al, 1992). En effet, un follicule dominant en voie de régression reste de taille plus élevée que les autres follicules pendant encore 3 à 4 jours après sa phase de dominance (Otoi et al, 1998).

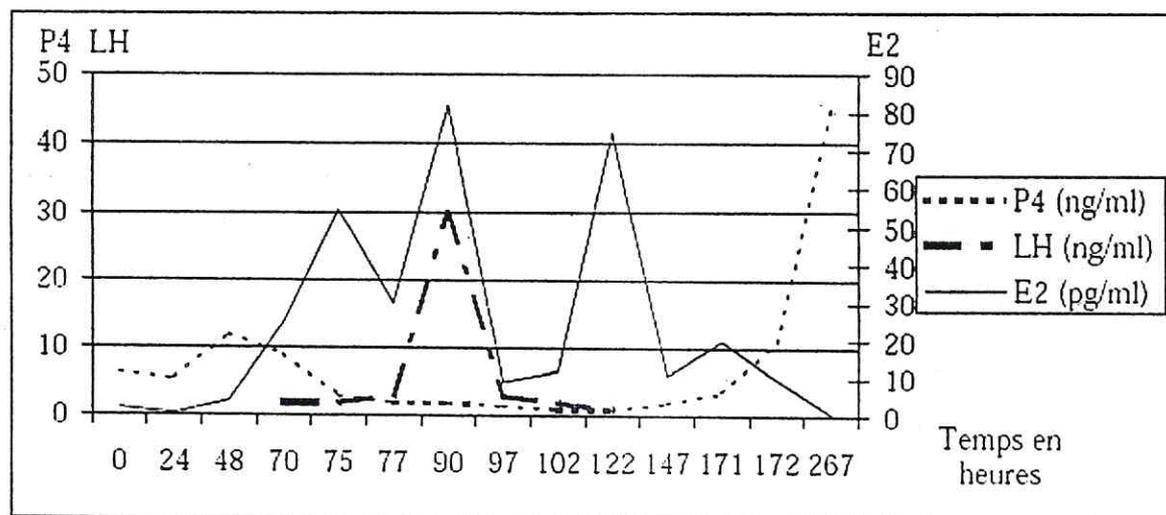
Dans le but de réduire la variabilité des résultats de collecte et d'augmenter le nombre d'embryons totaux, de nombreux auteurs ont préconisé d'éliminer le follicule dominant, que ce soit par ponction échoguidée ou par utilisation d'hormones.

### 2.3. Profils hormonaux observés pendant les traitements :

Chez les vaches soumises à un traitement de superovulation, les profils hormonaux de FSH, LH, œstradiol-17 $\beta$  et progestérone ont pu être établis par de nombreux auteurs (Nibart, 1991 ; Savio et al, 1991 ; Gosselin et al, 2000), Les figures 9 et 10 présentent deux exemples de ces profils.



**Figure 9 :** Courbes de concentration plasmatique d'œstradiol-17 $\beta$  (E2), de LH et de progestérone (P4) chez une vache ayant répondu au traitement de superovulation par FSHp (8 injections à doses décroissantes espacées de 12 heures) (h0=début du traitement) (D'après Nibart, 1991).



**Figure 10 :** Courbes de concentration plasmatique d'oestradiol-17 $\beta$ (E2), de LH et de progestérone(P4) chez une vache ayant répondu au traitement de superovulation par PMSG(h0=début du traitement) (d'après Nibart, 1991)

### 2.3.1. Caractéristiques des profils hormonaux (FSH, LH) :

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

Ces follicules produisent des œstrogènes à l'origine des modifications rencontrées lors des chaleurs. L'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse antérieure, ce qui va provoquer une baisse de la sécrétion de FSH (diminution qui provient également de l'inhibine sécrétée par le follicule). Seul va pouvoir continuer à se développer le follicule dominant car il a mis en place des stratégies pour se développer avec peu de FSH (Mialot et Chastant, 2000). L'œstradiol exerce également une rétroaction sur l'hypothalamus, en augmentant la fréquence des pulses de GnRH. Cette poussée de GnRH va créer un pic de LH qui déclenche l'ovulation.

Selon Nibart (1991), il n'y a pas de différence dans les pics de FSH et de LH chez les animaux superovulés comparés à ceux d'animaux non traités. Cependant, chez les femelles présentant une bonne réponse (>16 corps jaunes), les pics pré ovulatoires de FSH et LH sont plus précoces après l'injection de prostaglandines que chez celles présentant peu de réponse (<2 corps jaunes) ou lors d'un cycle normal.

Pour les animaux répondant au traitement, le niveau de base de LH est de  $1,6 \pm 0,3$  ng/ml pour une valeur maximale de  $46,3 \pm 9,5$  ng/ml (Nibart, 1991). Selon Kafi et McGowan (1997), la durée du pic est approximativement de 15 heures (de 8 à 20 heures chez des vaches superovulées avec de la FSH-p). Cependant, la PMSG entraînerait plus souvent des profils endocriniens anormaux (décharge de LH retardée ou absente) que les extraits hypophysaires (Nibart, 1991, Kafi et McGowan, 1997).

Chez les animaux ne répondant pas au traitement, les pics de FSH et LH peuvent être absents alors qu'ils sont toujours présents au moment des chaleurs chez ceux qui répondent. Chez les animaux n'ayant pas de pics préovulatoires, on constate le jour de la collecte (J7), soit des ovaires sans formations, soit des follicules kystiques, soit des follicules lutéinisés (Nibart, 1991), soit une absence de corps jaune (Humblot et al, 1994).

### 2.3.2. Caractéristiques du profil hormonal de l'oestradiol :

Les pics préovulatoires de FSH et LH sont précédés par des niveaux d'oestradiol plus importants chez les animaux ayant une bonne réponse, comparé à ceux ayant une faible réponse (Nibart, 1991).

Selon Nibart (1991), le type de traitement de superovulation (PMSG, PMSG + anti-PMSG, FSH-p) n'influence pas de façon significative les niveaux d'oestradiol ni au début, ni au cours du traitement, ainsi que sa valeur maximale et le moment de la décharge, chez les animaux répondant au traitement.

La concentration plasmatique d'oestradiol est multipliée par 2 ou 3 dans les 8 à 20 heures suivant le début de traitement de superovulation, que ce soit par de la PMSG ou de la FSH (Gosselin et al, 2000) et atteint un maximum 34 à 50 heures après la 5<sup>ème</sup> injection de FSH-p. Selon Nibart (1991), le niveau de base est de 5 à 10 pg/ml et la valeur maximale varie de 50 à 150 pg/ml chez la femelle superovulée.

Les animaux ayant les taux les plus élevés d'oestradiol plasmatique lors des chaleurs sont ceux qui ont la meilleure réponse à la superovulation, en terme de taux d'ovulation (Kafi et McGowan, 1997). Le niveau d'oestradiol- $17\beta$  mesuré au début des chaleurs est corrélé positivement avec le nombre d'ovulations dénombrées au moment de la collecte (Nibart, 1991), le nombre d'embryons/ovocytes non fécondés collectés, mais pas avec le nombre d'embryons transférables (Britt et Holt, 1988), certainement parce que des niveaux trop élevés d'oestrogènes

lors de l'œstrus sont associés avec des embryons dégénérés ou des ovocytes non fécondés (Britt et Holt, 1988).

Le retour à la valeur basale en œstradiol-17 $\beta$  se fait 12 heures après le pic de LH. Cependant, pour les animaux traités à la PMSG seule, de nouvelles augmentations d'œstradiol ont été enregistrées après les chaleurs (Nibart, 1991). Ces niveaux élevés proviennent de nouvelles croissances folliculaires sous l'effet de l'activité retard de la PMSG dont on peut mesurer une quantité non négligeable 10 jours après l'injection (Nibart, 1991). On aperçoit ici l'intérêt de l'emploi de l'anticorps anti-PMSG au moment des chaleurs.

### 2.3.3. Caractéristiques du profil hormonal de la progestérone :

C'est sur la concentration en progestérone que les recherches ont le plus été axées, afin de déterminer les variations de réponse à la superovulation.

Selon Nibart (1991) chez les animaux répondant à la superovulation, quelque soit le traitement (PMSG, PMSG + anti-PMSG, FSH-p), le niveau moyen de progestérone passe en moyenne de 5,2 ng/ml au moment de l'injection de l'hormone de superovulation à 7,7 ng/ml au moment de l'injection de prostaglandines. L'effet lutéotrope des préparations de PMSG serait supérieur à celui des préparations de FSH-p qui ne sont jamais entièrement purifiées et contiennent un reliquat de LH, selon Nibart (1991).

Une augmentation de la progestéronémie a été observée dans les premières 24 heures suivant le début du traitement de superovulation avec de la PMSG, de la FSH (Kafi et McGowan, 1997 ; Gosselin et al, 2000). Cette augmentation démontre l'effet lutéotrope des préparations de gonadotrophines. En effet, lorsque l'on utilise des préparations de FSH-p purifiée, il n'y a pas d'augmentation de la progestéronémie en début de traitement de superovulation (Gonzales et al, 1990 ; Kafi et McGowan, 1997).

Dans la majorité des cas, la lutéolyse se produit dans les 24 heures qui suivent l'injection de prostaglandines. Après l'injection de prostaglandines, il y a régression du corps jaune et chute du niveau de progestérone au-dessous de 1 ng/ml de plasma, en 12 heures avec de la FSH-p, et 10 à 32 heures avec de la PMSG (Kafi et McGowan, 1997). Cependant, les anomalies dans les profils de progestérone au cours du traitement et avant la collecte, sont plus fréquentes avec la PMSG qu'avec la FSH-p (Nibart, 1991 ; Kafi et McGowan, 1997).

#### 2.4. Protocoles de superovulation :

De nombreux essais avec de nouvelles préparations de FSH-p et des modifications dans les protocoles ont été réalisés en vue d'améliorer les résultats de superovulation (pré synchronisation par des progestagènes, préparation avec de la FSH ou GnRH, utilisation de préparations de FSH contenant différents niveaux de LH, utilisation de GnRH et LH au début de l'œstrus, (Foote et Ellington, 1988 ; Hahn, 1992).

Ces essais tendent à augmenter la collecte d'embryons dans certains cas, mais le pourcentage d'embryons transférables est souvent diminué et la variabilité des résultats demeure inchangée (Hahn, 1992).

##### 2.4.1. Intervention sur cycle maîtrisé :

On sait qu'un traitement combinant du benzoate d'œstradiol et des progestagènes permet d'entraîner l'atresie du follicule dominant et de synchroniser le développement folliculaire. L'association du traitement de superovulation avec un traitement de maîtrise des cycles reste une méthode dont les effets sont controversés. Certains auteurs rapportent une diminution de la production d'embryons viables lorsque la superovulation a lieu au cours d'un cycle maîtrisé (Smith et al, 1988 ; Savio et al, 1991), ou bien aucun effet significatif (Bo et al, 1991 ; Nibart, 1991 ; Lafri et al, 1999 ; Mapletoft et al, 1999), alors que Ellington et al (1987) ont obtenu des résultats favorables en terme d'embryons produits.

Si les résultats sont discutés, il semblerait que l'utilisation de progestagènes permette selon Humblot et al (1994), de réduire et de limiter la variabilité de l'intervalle entre l'injection de prostaglandines et le pic de LH avec l'utilisation de progestagènes. L'insémination peut ainsi être réalisée à un moment plus précis que lors de superovulation sur cycle naturel. L'utilisation des progestagènes présente également un autre intérêt : chez des vaches à faible fertilité, elle permet d'obtenir une réponse satisfaisante lors de superovulation. Il semblerait que le jour de la pose de l'implant puisse expliquer les moins bons résultats obtenus sur implant. Pour de nombreux auteurs, lors de superovulation sur cycle maîtrisé, il convient de se situer au moment de l'émergence d'une vague de croissance folliculaire, si l'on veut obtenir de bons résultats. En effet, Bo et al (1996) ont rapporté que des génisses traitées avec un implant de progestagènes à n'importe quel moment du cycle œstral, produisaient des embryons de moins bonne qualité que

des génisses ayant reçu en plus une injection d'œstradiol le jour de la pose de l'implant, pour synchroniser la vague de croissance folliculaire.

#### 2.4.2. Traitement supplémentaire en début de cycle :

/L'administration de FSH en début de cycle a été suggérée afin d'augmenter le nombre de follicules pouvant être stimulés lors du traitement de superovulation. Un tel prétraitement devait permettre de promouvoir le développement initial de petits follicules et ainsi, d'augmenter le nombre de follicules pouvant répondre au traitement de superovulation (Gray et al, 1992). /

Cependant, les avis sont partagés concernant l'intérêt de l'injection d'une faible dose de FSH en début de cycle (2,5 à 10 mg de FSH-p à J2 ou J3) afin de préparer l'ovaire à une superovulation débutant entre J8 et J16. Certains auteurs ont observé une augmentation du nombre total d'embryons (Rajamahendran et al, 1987 ; Touati et al, 1991), alors que d'autres n'ont pas observé d'amélioration (Rieger et al, 1988), certains notant même une réduction de la réponse ovarienne (Guilbault et al, 1992 ; Grasso et al, 1989). Notons que les comparaisons entre études ne sont pas réalisables car les protocoles sont différents pour la plupart (dose totale de FSH utilisée pour la superovulation, jour du cycle auquel débute le traitement de superovulation, jour et dose de FSH injectée en début de cycle).

#### 2.4.3. Traitement supplémentaire avant la superovulation :

/Les agonistes de la GnRH permettent de contrôler le développement folliculaire, l'induction de l'ovulation, la lutéinisation ou l'atrésie de follicules (Savio et al, 1991). Il a été montré que l'injection d'agoniste de la GnRH quelque soit le moment du cycle, induisait l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire 3 à 4 jours après le traitement et éliminait les gros follicules par ovulation et lutéinisation. /

Dans cette optique, Kohram et al (1998) ont injecté un analogue de la GnRH (Cystorelin<sup>®</sup>, Sanofi S.A., Victoriaville, Québec, Canada) 2 jours avant le traitement de superovulation. Bien qu'ayant augmenté la réponse ovarienne, le nombre d'ovocytes non fécondés ou d'embryons dégénérés était également augmenté. La survenue d'un pic de LH 2 jours avant la superovulation compromettrait donc la capacité des follicules à ovuler et à produire des embryons viables (Kohram et al 1998). Les auteurs invoquent une lutéinisation incomplète des follicules ayant ovulé après l'injection de GnRH pour expliquer cet effet.

## **2.5. Facteurs de variations de la réponse aux traitements superovulatoires :**

### **2.5.1. Facteurs extrinsèques :**

#### **2.5.1.1. Climat :**

Les études des effets de la saison sur la réponse au traitement de superovulation ont abouti à des résultats contradictoires. D'après Shankar et al (1998), Kaft et Mc Gowan et al (1999) ont identifié une influence de la saison sur la réponse à la superovulation.

Les effets directs du stress thermique sur la stéroïdogenèse et le développement folliculaire peuvent expliquer que le procédé de maturation des ovocytes soit touché. Ceci expliquerait la collecte d'un nombre plus élevé d'embryons de mauvaise qualité chez les animaux maintenus en condition de température ambiante élevée (Kafi et McGowan, 1997).

Sous des températures élevées, Benyei et al (1999) ont comparé des génisses et des vaches Holstein en lactation. Ils n'ont pas trouvé de différence significative en terme d'embryons/ovocytes non fécondés collectés chez les génisses, mais le nombre d'embryons dégénérés et d'ovocytes non fécondés était significativement plus élevé chez les vaches. De plus, les vaches avaient significativement moins d'embryons de qualité 1 que les génisses. Selon eux, les hautes températures seraient défavorables à la qualité des embryons ou des ovocytes. La différence entre vaches et génisses également observé par Putney et al (1988) semblerait due à une incapacité pour les vaches à maintenir une température corporelle normale à cause de leurs besoins métaboliques de lactation.

#### **2.5.1.2. Alimentation :**

Selon Fréret et al (2000), les apports nutritionnels notamment avant et au moment de l'insémination artificielle sont importants à considérer pour une production optimale de gamètes. L'environnement utérin peut ainsi être modifié et compromettre la survie des embryons. Il semble clair que la suralimentation et la sous-alimentation à court ou à long terme semble être défavorable à la qualité des embryons. Cependant, pour de nombreuses études, les comparaisons sont difficiles car les variations d'apports alimentaires peuvent être extrêmes et éloignées des conditions physiologiques.

Les apports nutritionnels peuvent influencer de façon complexe la reproduction et à différents niveaux : axe hypothalamo-hypophysaire, ovaire et utérus (O'Callaghan et Boland, 1999). Ainsi,

la croissance folliculaire et ovocytaire peuvent être affectés par les conditions alimentaires et l'équilibre énergétique (Fréret et al, 2000).

#### **2.5.1.3. Stress et maladies intercurrentes :**

Le stress est l'une des causes de baisse de fertilité dans les troupeaux. Toutes les maladies intercurrentes (mammite aiguë, boiterie, parasitisme...), toutes les hyperthermies d'origine diverses, sont des formes de stress et exercent une action défavorable sur la réponse ovarienne et la qualité des ovocytes ou des embryons (Nibart, 1991). Ainsi, Putney et al (1988) ont pu démontrer que, chez la vache laitière, l'hyperthermie provoquée par élévation de la température ambiante (>39°C) après l'ovulation, est responsable du retard de développement et de la dégénérescence des embryons.

Ainsi, tout stress avant et pendant le traitement de superovulation est néfaste puisqu'il conduit à augmenter la sécrétion d'ACTH (adreno-corticotrophine hormone), et/ou à empêcher la décharge de LH et favoriser ainsi, soit la formation de kystes ovariens, soit l'ovulation d'ovocytes de mauvaise qualité (Nibart, 1991).

#### **2.5.1.4. Influence des traitements utilisés :**

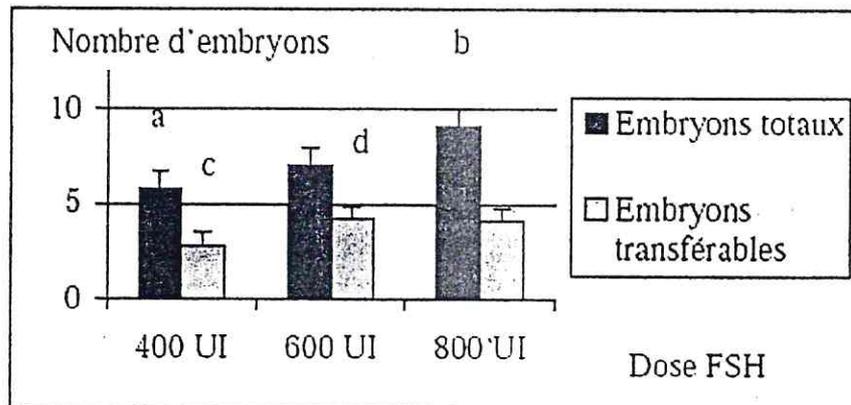
Une des raisons majeures de la variabilité rencontrée lors des superovulations réside dans le traitement. En effet, pour Kelly et al (1997), cet aspect est actuellement abordé de façon empirique. L'absence de données précises sur les relations entre concentration de FSH et profils de croissance folliculaire ne permet pas de raisonner convenablement les méthodes et la fréquence d'administration de la FSH. Les interactions entre la FSH et la LH lors de la maturation folliculaire ne sont pas non plus bien connues et il est difficile de préconiser un rapport FSH/LH idéal dans les préparations utilisées pour la superovulation.

##### **a) Traitement par FSH :**

Lors du traitement avec FSH-p, les meilleurs résultats sont obtenus d'après Nibart (1991) pour une dose totale de 32 à 40 mg chez la vache et de 28 mg chez la génisse, en doses décroissantes, en 2 injections par jour pendant 4 jours. Une injection unique de FSH semble aussi pouvoir être pratiquée. Ainsi, en superovulant des vaches par une unique injection sous-cutanée de FSH (Folltropin®, Vetrepharm, Can. Inc.) entre J8 et J10 du cycle œstral (Bo et al, 1994) ou bien sur cycle induit par œstrogènes et progestagènes (Bo et al, 1996) ou après ponction du

follicule dominant (Bergfelt et al, 1997), les auteurs n'ont pas constaté de différences significatives par rapport aux traitements classiques de 2 injections quotidiennes sur 4 jours.

Concernant la dose, Estrada et al (1998) ont évalué la réponse d'élevages adaptés aux conditions tropicales, suite à des traitements de superovulation constitués de 2 doses différentes de Folltropin®, 24 et 36 mg par vache. Ils ont enregistré des différences significatives entre les élevages pour le nombre d'embryons transférables, mais la dose de FSH (24 contre 36 mg) n'influçait pas de façon significative la réponse. Au contraire, Yaakub et al (1998) ont observé une augmentation linéaire de la réponse (nombre de corps jaunes et d'embryons/ovocytes non fécondés) avec l'augmentation des doses de FSH-p (400, 600 ou 800 UI). Cependant, le nombre d'embryons transférables n'était pas différent entre 600 et 800 UI.



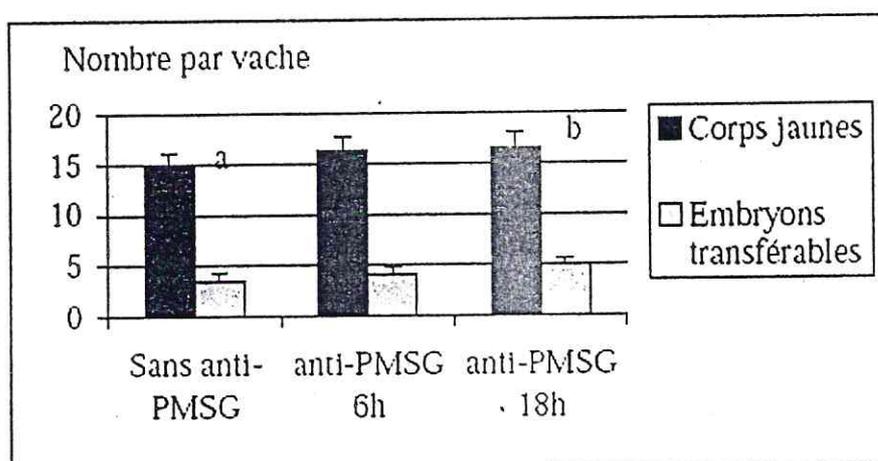
**Figure 11:** Effet de la dose de FSH utilisée lors de superovulation sur le nombre d'embryons totaux et transférables récoltés (d'après Yaakub et al, 1998)

a vs b : c vs d

#### b) Traitement par PMSG :

Afin de limiter les effets négatifs de la longue demi-vie de la PMSG, l'utilisation d'anticorps anti-PMSG après le pic de LH a été proposée. En effet, sans anticorps anti-PMSG, une seconde vague de croissance folliculaire démarre après l'ovulation, ce qui entraîne des concentrations en œstradiol dans le sang élevées au moment du développement embryonnaire, ce qui est néfaste pour l'embryon (Dieleman et Bevers, 1987). Les résultats en terme de nombre d'ovulations et du nombre d'embryons transférables seraient alors améliorés par l'injection d'anticorps anti-PMSG 48 à 60 h après l'injection de prostaglandines (Hahn, 1992 ; Dieleman et al, 1989).

L'administration d'anticorps anti-PMSG provoquerait indirectement l'atrésie des follicules non ovulés de diamètre supérieur à 10 mm avec une chute concomitante d'œstradiol. Par contre, l'injection trop précoce de l'anticorps inhibe complètement la superovulation. Pour Bevers et al (1993), le nombre de corps jaunes présents le jour de la collecte ne semble pas influencé par l'injection d'anticorps 6 ou 18 heures après le pic de LH. Cependant, la qualité des embryons lors d'utilisation d'anticorps anti-PMSG 18 heures après le pic de LH serait supérieure à celle des embryons collectés après utilisation de PMSG seule. La meilleure période pour l'injection d'anticorps anti-PMSG semble être 18 heures après le pic de LH (Bevers et al, 1993).



a vs b

**Figure 12** : Effets de l'administration ou non d'anti-PMSG 6 ou 18 heures après le pic de LH sur le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons transférables (d'après Bevers et al, 1993)

### c) Influence du type de préparation :

La pureté des préparations de gonadotrophines peut également être à l'origine de la variabilité des résultats. Ainsi, le rapport entre LH et FSH de la préparation affecte la réponse (Kelly et al, 1997).

Un contenu trop élevé de LH aboutit généralement à une plus faible réponse à la superovulation en race laitière (Gonzales et al, 1990 ; Kelly et al, 1997) ou allaitante (Yamamoto et al, 1993). En effet, un excès de LH peut provoquer une lutéinisation ou une ovulation prématurée des follicules stimulés par la FSH, ce qui modifie les interactions endocriniennes (Kelly et al, 1997).

Donaldson et Ward (1986) ont montré qu'une contamination des préparations par de la LH avait des effets négatifs sur la réponse à la superovulation. En retirant la LH des préparations de FSH, ils ont augmenté le nombre d'embryons transférables (+ 2,4 embryons transférables de moyenne).

L'augmentation du taux de LH réduisait la qualité des ovocytes ou des embryons. Cet effet délétère serait dû à des ovulations prématurées, à des perturbations de la maturation cytoplasmique et/ou nucléaire des ovocytes, à une lutéinisation des cellules de la granulosa, et à un décalage dans l'apparition du pic de LH (Kelly et al, 1997). Un faible taux de fécondation peut également être observé et serait dû à des ovulations non synchrones et/ou à une augmentation des concentrations d'oestrogènes ou un déséquilibre de l'équilibre oestrogènes/progestérone (Zeitoun et al, 1991).

#### **d) Influence du dosage de l'hormone de superovulation :**

Lors du traitement avec FSH-p en injections multiples, les meilleurs résultats sont obtenus, d'après Nibart (1991), pour une dose totale de 32 à 40 mg chez la vache et de 28 mg chez la génisse. En injection unique, la dose optimale de FSH diluée dans une solution saline, à administrer par voie sous-cutanée serait de 40 mg pour des vaches allaitantes. En augmentant la dose, le nombre de follicules non ovulés augmentait et le taux de fécondation diminuait (Hockley et al, 1992). Cependant, les effets de la dose à administrer sont variables selon l'âge et la race de l'animal. Selon Breuel et al (1991), dans une étude menée chez des vaches allaitantes de 4 races différentes (Simmental, Charolaise, Polled Hereford et Angus) dans 2 types d'élevage (en station ou en ferme), les relations entre l'âge, la dose de FSH-p et la production d'embryons totaux et d'embryons transférables n'ont pas pu être expliquées, les effets n'allant pas dans le même sens selon la race et la variable concernée.

#### **e) Répétition des traitements de superovulation :**

Selon de nombreux techniciens de collecte, il y aurait une réduction de la réponse à la superovulation lors de traitements répétés. Certains auteurs pensent que la réponse au traitement peut diminuer au cours des répétitions de traitements. Selon Nibart (1991), on pourrait alors obtenir une réponse satisfaisante en changeant d'hormone de stimulation. En effet, l'abaissement de la réponse ovarienne après le 3<sup>ème</sup> traitement serait d'origine immunitaire (apparition

d'anticorps anti-PMSG et anti-FSH, Nibart, 1991). Selon Drion et al (1998), l'exposition répétée d'un animal à une molécule gonadotrope exogène entraîne chez lui la formation d'anticorps spécifiques.

Dorn et al (1991) n'ont pas enregistré de différences significatives de la réponse ovarienne suivant des traitements répétés avec des préparations de FSH. Mais, Ponsart et al (2001) ont montré que le nombre d'embryons transférables diminuait significativement avec le nombre de collectes, alors que le nombre d'ovocytes non fécondés augmentait de façon significative chez les femelles collectées plus de 4 fois. Selon Nibart (1991), il est cependant possible de répéter des traitements de superovulation chez la même vache pendant plusieurs mois. La production totale d'embryons dépend alors du rythme des collectes et de la donneuse elle-même.

### **2.5.2. Facteurs intrinsèques :**

#### **2.5.2.1. Etat des ovaires :**

Les variations dans les résultats de la superovulation sont étroitement liées à l'importance de la réserve ovarienne en follicules primordiaux. En effet, il existe une forte corrélation entre la population folliculaire totale avant la superovulation et le nombre des structures lutéales dénombrées après ce traitement (Monniaux et al., 1983). Un ovaire contenant un nombre de follicules de diamètre supérieur à 70 $\mu$ m et inférieur à 200, donne une réponse lutéale inférieure ou égale à 5. Elle peut atteindre 8 lorsque le nombre de ces follicules est supérieur à 500 $\mu$ . L'échographie montre qu'il existe une corrélation entre le nombre de follicules de 2 à 5 mm de diamètre présents le jour du traitement et le nombre d'embryons collectés (Van Der Schams, 1988).

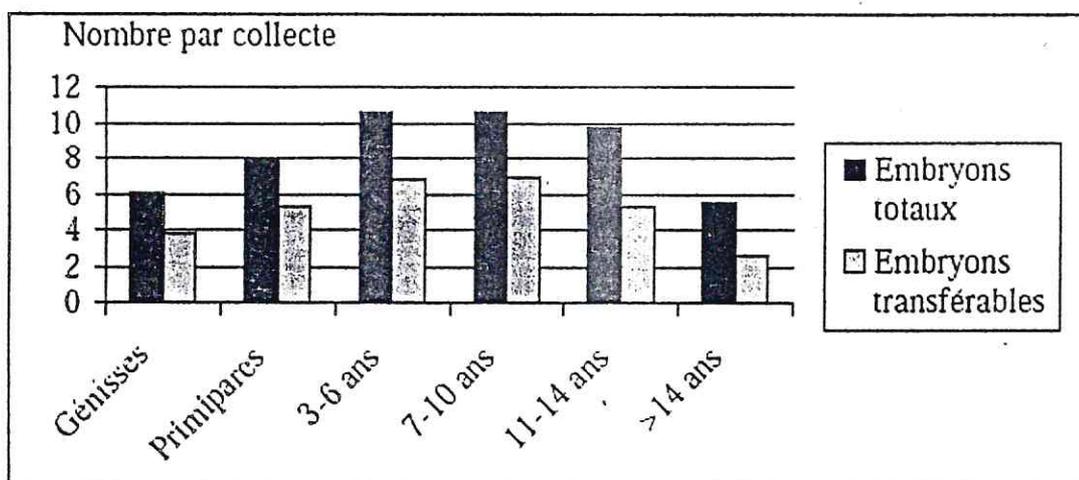
#### **2.5.2.2. Race :**

Pour Nibart (1991), il n'y aurait pas de différence significative en terme de production d'embryons entre les 3 races laitières Française Frisonne, Normande et Montbéliarde. Breuel et al (1991) ont observé des différences significatives entre 4 races allaitantes (1039 collectes), les vaches Simmentales produisant plus d'embryons totaux et transférables, après superovulation par de la FSH-p que les vaches Angus, Polled Hereford ou Charolaises.

### 2.5.2.3. Age et parité :

L'effet de l'âge et du rang de lactation n'est pas retrouvé par tous les auteurs (Breuel et al 1991 ; Kafi et McGowan, 1997). Cependant, certains auteurs ont observé une production inférieure d'environ 1 embryon chez les génisses par rapport aux vaches (Nibart, 1991 ; Laurière et al, 2001).

Chez les vaches, lorsque l'âge augmente, la production d'embryons diminue mais uniquement chez les vaches âgées (>9 ans : Nibart, 1991 ;  $\geq 3$  lactations : Ponsart et al, 2001 ; >3 lactations : Laurière et al, 2001).



**Figure 13 :** Influence de l'âge sur la réponse au traitement de superovulation pour 633 collectes chez des vaches laitières (d'après Nibart, 1991)

### 2.5.2.4. Génétique :

Manciaux et al (2000) ont recherché l'influence de l'origine paternelle des Donneuses Montbéliardes, sur la production d'embryons après superovulation. Ils ont trouvé une relation entre l'origine paternelle de la donneuse et le nombre d'embryons, le nombre d'embryons de qualité 1, et le nombre d'ovocytes non fécondés par collecte. Ceci laisse à penser que l'aptitude à produire des embryons est héritable.

Cependant, Tonhati et al (1999) estiment que la réponse individuelle des animaux à la superovulation est un caractère faiblement héritable.

Les résultats montrent que les facteurs environnementaux jouent un rôle important sur la réponse d'une vache au traitement de superovulation.

#### **2.5.2.5. Niveau de production laitière :**

Chez les vaches fertiles, il n'y a pas de différence significative pour la plupart des auteurs, entre vaches à différents niveaux de production laitière, en ce qui concerne la réponse ovarienne, à condition que l'alimentation soit en relation avec le niveau de production (Nibart, 1999).

Cependant, Manciaux et al (2000), chez des vaches Montbéliardes superovulées par FSHp, ont observé un effet significatif du niveau de production sur le nombre d'embryons transférables et de qualité 1, les meilleures productrices étant les vaches produisant entre 9000 et 11000 Kg de lait par apport aux vaches produisant moins de 7000 Kg ou plus de 11000 Kg de lait. Les vaches très hautes productrices (>11000 Kg de lait) produisaient moins d'embryons viables et congelables, et les vaches à faible niveau de production (<7000 Kg de lait) avaient le plus d'ovocytes non fécondés.

#### **2.5.2.6. Intervalle vêlage-traitement de superovulation :**

On considère qu'il faut un minimum de 60 jours après vêlage pour débiter un traitement de superovulation. Ceci permet de s'assurer qu'il y a eu une bonne involution utérine et que la donneuse est effectivement cyclée (Nibart, 1991).

Les cycles oestriques post-partum irréguliers constituent un frein à la réponse au traitement de superovulation. L'observation de 3 chaleurs à intervalles réguliers est conseillée par Nibart (1991), avant de mettre en oeuvre un traitement. Ceci constitue le meilleur moyen de s'assurer du bon fonctionnement de l'ovaire et de ses capacités de réponse.

### **3. Insémination, collecte et examen des embryons :**

#### **3.1. Protocole d'insémination :**

Plusieurs protocoles d'insémination ont été comparés pour optimiser la production d'embryons. Ils diffèrent selon :

Le nombre d'inséminations : 1 insémination *versus* 2 inséminations (Lacaze et al, 1991 ; Slimane et al, 1995).

- Le moment des inséminations par rapport au début des chaleurs et par rapport au pic de LH (Slimane et al, 1995),
- Le nombre de taureaux utilisés : 2 inséminations avec le même taureau *versus* 2 inséminations avec 2 taureaux différents (Hupka et al, 2000).
- Le type de semence : fraîche *versus* congelée (Goulding et al, 1994). Slimane et al (1995) ont ainsi montré que :
- Le nombre total d'embryons et le nombre d'embryons viables est significativement supérieurs dans un protocole avec 2 inséminations par rapport à celui ne prévoyant qu'une seule insémination. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la première insémination est pratiquée plus de 6 heures après le pic de LH.

### 3.2. Collecte :

Après fécondation, les embryons sont collectés dans l'utérus, après leur sortie de l'oviducte (J4-J5). Pour des raisons sanitaires et de fragilité, la réglementation internationale impose de collecter les embryons encore inclus dans leur zone pellucide donc avant l'éclosion qui a lieu à J9. La collecte est donc réalisée entre J6 et J8 après I.A et presque toujours à J7 (Nibart, 1991). La donneuse d'embryons est systématiquement placée dans une cage de contention surélevée dans sa partie antérieure et reçoit une injection épidurale basse d'un anesthésique local. Le rectum est vidé de son contenu et la région vulvaire est soigneusement lavée, désinfectée et essuyée.

La collecte consiste en un rinçage des cornes utérines avec le milieu de collecte. Une fois le col passé, l'extrémité de la sonde est placée dans la corne correspondant à l'ovaire qui a le mieux répondu au traitement (détermination par palpation transrectale avant la collecte), à la jonction entre le premier et le deuxième tiers de la corne. Le ballonnet situé à l'extrémité de la sonde rigide est alors gonflé : il permet de fixer la sonde dans la corne et évite le reflux du liquide de collecte. La sonde souple est progressivement dépliée jusqu'au fond de la corne et le rinçage commence. Après avoir injecté, en plusieurs fois, 350 à 400 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline), préalablement placé dans l'enceinte thermostatée, la sonde souple est progressivement retirée, le ballonnet est dégonflé et la même opération est réalisée dans l'autre corne (Nibart, 1991).

### 3.3. Examen des embryons :

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

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons sont exclusivement morphologiques. A J6, l'embryon est au stade morula compactée, à J7 au stade blastocyste.

La sortie de la zone pellucide se fait à J9. Les ovulations n'étant pas toutes synchrones, plusieurs stades embryonnaires peuvent être observés au cours d'une même récolte.

L'observation de l'intégrité de la zone pellucide, la taille et l'homogénéité de la masse cellulaire incluse dans celle-ci, la formation du blastocyste, du bouton embryonnaire et du trophoblaste permet de juger de la viabilité de l'embryon, il est important d'en apprécier la qualité avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques éventuelles. Divers critères ont été proposés. Les uns évaluent les caractéristiques morphologiques de la pellucide et des blastomères et vérifient si elles sont en accord avec le stade du développement. Des valeurs de diamètre externe de l'embryon et de l'épaisseur de la pellucide ont dans ce but été déterminées (Lonergan, 1992).

**Tableau 1 :** Diamètre externe (DE), épaisseur de la pellucide (EP) d'embryons bovins  
(D'après Lonergan, 1992)

| Stade de développement       | N  | DE ( $\mu$ ) | EP ( $\mu$ ) |
|------------------------------|----|--------------|--------------|
| 2 cellules                   | 13 | 148          | 13,7         |
| 4 cellules                   | 31 | 149          | 14,1         |
| 8 cellules                   | 15 | 149          | 13,4         |
| J6 morula                    | 37 | 150          | 14,5         |
| J6 morula /jeune blastocyste | 18 | 150          | 13,1         |
| J7 jeune blastocyste         | 18 | 158          | 11,7         |
| J7 blastocyste               | 30 | 167          | 9,6          |
| J8 blastocyste               | 46 | 182          | 7,9          |
| J9 blastocyste               | 56 | 200          | 5,6          |

Une fois récoltés, les embryons seront placés dans 2 à 3 ml de milieu de récolte propre et examinés aux grossissements 10-40 pour en préciser les éléments morphologiques généraux. Les blastocystes dits normaux seront isolés des autres. Les blastocystes jugés anormaux seront ensuite examinés au grossissement 120 pour en préciser les caractéristiques cellulaires. Ils seront à nouveau examinés après 4 à 6 heures. Dans la pratique courante, les critères morphologiques sont les seuls utilisés (Eldsen et al, 1978 ; Schneider et al, 1980).

Tous ces critères figurent dans la blastographie publiée par l'INRA-UNCEIA (1990) (tableau 2). Certaines équipes rajoutent une classe 5 qui correspond aux ovocytes non fécondés.

**Tableau 2 : Classification des embryons selon leur qualité**  
(D'après l'INRA-UNCEIA, 1990).

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

#### 4. Congélation des embryons :

##### 4.1. Introduction :

Aujourd'hui, grâce aux énormes progrès réalisés, la cryoconservation des embryons fait partie des biotechnologies de pointe. Les avantages économiques, sanitaires et génétiques apportés par cette technique sont très importants pour les éleveurs et les sélectionneurs. En Europe, en 2003, plus de la moitié des transferts embryonnaires bovins se sont faits à partir d'embryons cryoconservés.

Les premières conservations d'embryons par le froid datent des années 70 (Whittingham *et al* 1972 : chez la souris ; Wilmut et Rowson 1973 : chez la vache). Un refroidissement lent (0,2° C/min) en présence de DMSO (diméthylsulfoxyde), comme cryoprotecteur était utilisé, avant stockage des embryons dans l'azote liquide (- 196° C). Dans les années 80 se développe une nouvelle technique de cryoconservation, la vitrification, qui consiste à plonger très vite les embryons dans l'azote liquide (Rall et Fahy 1985, Scheffen *et al* 1986). A présent, une multitude de protocoles sont réalisés, allant de la congélation lente, à la vitrification traditionnelle ou ultra rapide, avec différents cryoprotecteurs organiques pénétrant dans les cellules ou non. Tous ces cryoprotecteurs ont pour but de préserver l'embryon de la formation de cristaux de glace intracellulaires pendant le refroidissement, de faciliter la déshydratation des cellules, de protéger les membranes cellulaires et d'éviter le phénomène de recristallisation lors du réchauffement de l'embryon avant transfert dans une femelle receveuse. La cryoconservation des embryons a un intérêt économique et génétique non négligeable. Elle permet la sauvegarde des espèces et des races en voie d'extinction.

##### 4.2. Principe de la congélation:

La cryoconservation doit permettre le ralentissement, voire l'arrêt de tous les phénomènes biologiques ; à des températures inférieures à - 150° C, les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées.

Cependant, à cette température, l'eau, constituant majeur de l'embryon, est sous forme solide. Le problème de la cryoconservation réside donc dans le fait d'atteindre des températures très basses et d'en revenir sans trop de dommages, c'est-à-dire de permettre à l'embryon, lors du réchauffement, de revenir à un état liquide viable.

### 4.3. Les techniques de congélation :

#### 4.3.1. La congélation lente :

La grande majorité des embryons de mammifères est congelée à l'aide de méthodes conventionnelles qui utilisent des cryoprotecteurs pénétrant lentement, un refroidissement lent et contrôlé et des vitesses relativement rapides de réchauffement (Palasz *et al*, 1996).

##### 4.3.1.1. Principe :

La congélation lente est basée sur l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon.

##### 4.3.1.2. Les cryoprotecteurs :

Les cryoprotecteurs employés sont : le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO, le 1,2-propanediol, le méthanol ...et à la concentration de l'ordre de 10% soit 1 à 1,5 M selon la masse molaire et la densité du cryoprotecteur employé.

L'incorporation des cryoprotecteurs a tendance à se faire en une seule étape actuellement, mais elle peut se faire en plusieurs étapes : les embryons sont alors déposés dans différents bains de concentrations croissantes en cryoprotecteurs (ex. : 0,5, 1 puis 1,5 M, avec environ 5 minutes dans chaque bain), afin d'éviter les chocs osmotiques importants. Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes de 0,25 ml, qui vont être réfrigérées suivant un protocole précis

##### 4.3.1.3. Conditionnement de l'embryon dans une paillette :

Aujourd'hui, les embryons sont congelés dans des paillettes en plastique. Il s'agit d'une paille de petite taille à paroi fine pouvant contenir 0,25 ou 0,5 mL.

La conductibilité du matériau composant la paillette ainsi que le ratio volume/surface sont à prendre en compte. En effet, auparavant les embryons étaient conditionnés dans de petites ampoules de verre, moins conductrices de la chaleur et de ratio volume/surface inférieur.

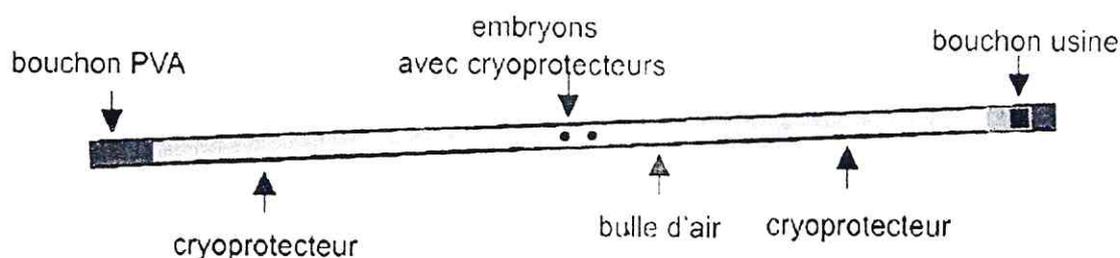
L'utilisation de la paillette donne de meilleurs résultats dans la congélation de jeunes embryons (Slade *et al*, 1985). Ces propriétés favorisent des échanges de température plus rapides et ce, aussi bien à la congélation qu'à la décongélation. Cela implique alors de manipuler très rapidement les paillettes. Les inscriptions de la paillette doivent aussi être facilement lisibles une fois qu'elles sont plongées dans l'azote liquide pour éviter de sortir les paillettes à chaque fois

que l'on veut lire ce qu'il y a écrit dessus. Pour cela, des visotubes ou des codes de couleur utilisés.

Lors de la mise en paillette de l'embryon, il faut :

- aspirer un peu du milieu dans lequel se trouve l'embryon.
- aspirer une bulle d'air.
- aspirer l'embryon.
- aspirer une bulle d'air.
- aspirer à nouveau un peu du milieu dans lequel se trouve l'embryon.

La présence des bulles d'air est primordiale car elles délimitent la région de la paillette dans laquelle se situe l'embryon. Emprisonné entre ces bulles d'air, l'embryon ne peut être entraîné vers l'une ou l'autre des extrémités où il risquerait de se coller au bouchon et d'être perdu.



**Figure 14 :** Schéma d'une paillette, embryon en place lors de congélation lente  
(INRA.Prod.Anim., 2005)

#### 4.3.1.4. Descente de température :

La paillette est ensuite déposée dans une boîte conservée à température ambiante qui sera placée dans le congélateur programmable. Les cryoprotecteurs sont ajoutés à la température ambiante, c'est donc à partir de 20, 25°C que débute le refroidissement. Dans un premier temps, les paillettes sont réfrigérées jusqu'à -6, -7°C à la vitesse de 1 à 3°C/min. C'est à ces températures que la cristallisation est induite en appliquant une barre métallique préalablement refroidie dans l'azote liquide ou grâce à un système incorporé dans le congélateur.

Après l'induction de la cristallisation, la vitesse de la descente de température est ralentie à moins de 1°C/min jusqu'à -30, -40°C. C'est à ce moment que la déshydratation des cellules embryonnaires se produit. Il faut ensuite mettre fin à la déshydratation en augmentant la vitesse de refroidissement. Pour cela, la paillette est plongée dans l'azote liquide.

#### **4.3.1.5. Avantages et inconvénients de la technique de congélation lente :**

##### **a) Avantages :**

Cette technique est facile à mettre en oeuvre. Les temps dans chacun des bains sont relativement longs, ce qui peut permettre à une personne peu expérimentée de pratiquer cette méthode. Les cryoprotecteurs sont utilisés à des concentrations relativement peu toxiques.

Or c'est la technique classiquement utilisées sur le terrain pour des collectes et transferts d'embryons bovins. Elle donne des résultats très reproductibles et qui sont à peine inférieurs à ceux obtenus après transfert des embryons frais, environ 10 à 15 de moins (Niemann, 1991 ; Hasler, 2001)

##### **b) Inconvénients :**

Cette technique est très coûteuse en temps et en argent. Pour le refroidissement, il faut nécessairement faire l'achat d'un congélateur programmable. Un cycle de refroidissement ne peut être lancé que lorsque tous les embryons sont prêts à être congelés ce qui fait que certains embryons peuvent attendre avant d'être refroidis.

#### **4.3.2. Vitrification et vitrification ultra rapide :**

##### **4.3.2.1. Principe :**

La vitrification est une technique qui permet d'éviter au maximum la formation de cristaux de glace au cours du refroidissement en transformant la phase liquide du cytoplasme en phase solide amorphe. Le milieu a alors une forte viscosité et il faut appliquer une vitesse de refroidissement et de réchauffement très rapide (-2500°C/min). Ceci implique l'utilisation de cryoprotecteurs à de très fortes concentrations.

La technique de vitrification ultra rapide repose comme son nom l'indique sur des vitesses de refroidissement encore plus rapide, de l'ordre de 20 000°C/min. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié et à la faible épaisseur des parois des paillettes dans lesquelles sont montés

les embryons : des paillettes étirées (Open Pulled Straw d'où le nom de la technique : OPS). Un autre système, la « cryoloop », permet également d'atteindre des vitesses de refroidissement très rapides (Guignot, 2003).

#### 4.3.2.2. Les cryoprotecteurs :

Comme dans la congélation lente, les embryons sont mis en présence du cryoprotecteur par étapes de concentrations croissantes. Les concentrations employées sont très élevées, entre 16 et 18 % pour les techniques de vitrification ultrarapide et jusqu'à 40 % pour la technique de vitrification classique dans les protocoles de Hochi *et al* (1994 et 1995). Ces fortes concentrations sont toxiques pour l'embryon, il faut donc réduire au maximum le temps de contact entre l'embryon et le cryoprotecteur. Sont surtout employés l'éthylène glycol et le DMSO en association avec du sucrose et/ou du ficoll, cryoprotecteurs extracellulaires.

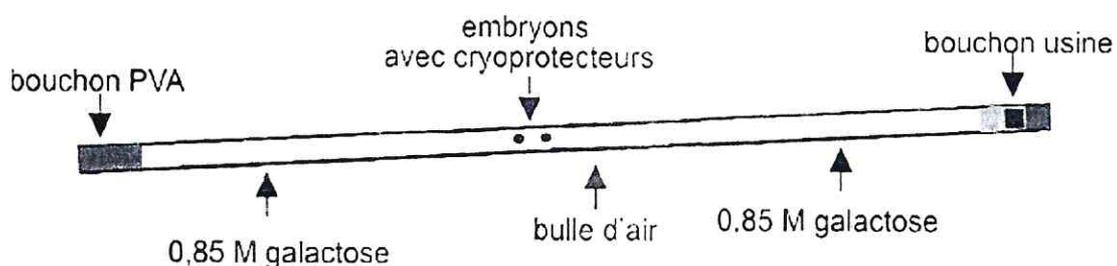
Les cryoprotecteurs sont ajoutés en deux étapes :

- une première de quelques minutes avec des concentrations « relativement basses » de cryoprotecteur,
- une seconde de l'ordre de 30 s avec des concentrations très élevées (toxiques) pour l'embryon et l'ajout de cryoprotecteurs extracellulaires

#### 4.3.2.3. Conditionnement de l'embryon : paillette, OPS et cryoloop :

##### A. Vitrification classique :

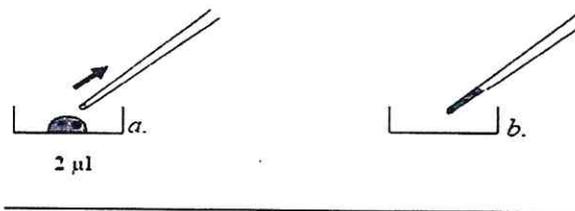
Dans la technique de vitrification classique, les embryons sont conditionnés dans les mêmes paillettes que celles employées pour la technique de congélation lente avec de part et d'autre de l'embryon, des bulles d'air et des colonnes de sucre.



**Figure 15 :** Schéma d'une paillette lors de vitrification classique  
(INRA. Prod. Anim., 2005)

### B. Technique OPS :

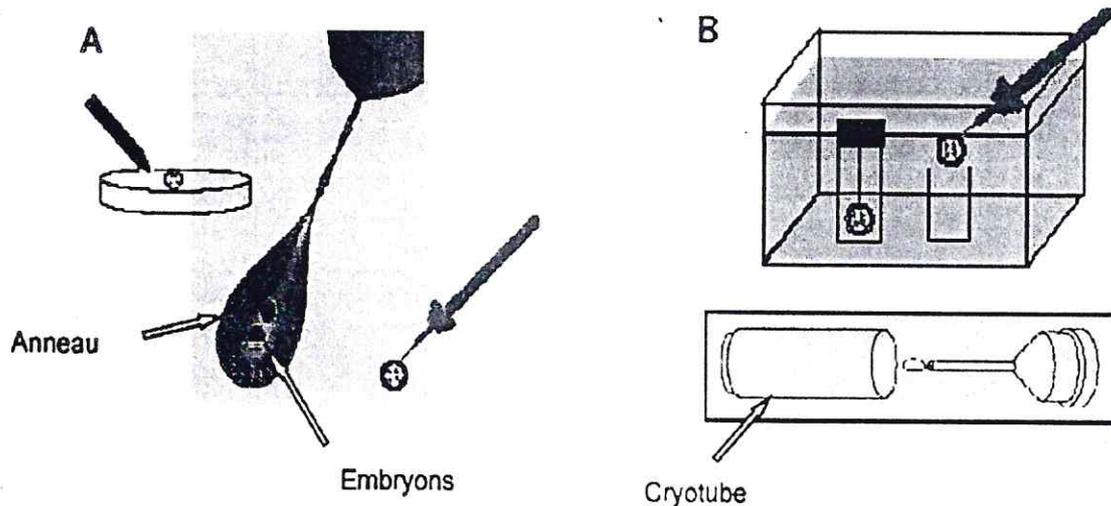
Dans cette technique, la montée des embryons dans la paillette étirée se fait par capillarité. A la fin des bains de cryoprotecteurs, l'embryon est déposé dans une goutte de 2  $\mu\text{L}$  « figure 16a ». Quand la paillette touche la goutte, le liquide contenant les embryons monte « figure 16b ». La paillette est ensuite immédiatement placée horizontalement dans l'azote liquide.



**Figure 16a et 16b** : Montée par capillarité dans la paillette OPS (d'après Vajta *et al*, 1998)

### C. Technique Cryoloop :

La cryoloop est au départ un petit anneau de nylon utilisé pour la vitrification des protéines. Elle a été adaptée à la cryoconservation des embryons et des ovocytes (Lane *et al*, 1999).



A : Une fois déposés dans le milieu avec les cryoprotecteurs, les embryons sont « emprisonnés » au centre d'un anneau où se forme un film de solution protectrice.

B : L'anneau est en suite plongé directement dans l'azote liquide et stocké dans un cryotube.

**Figure 17** : Cryoloop contenant deux embryons (d'après Lane *et al*, 1999).

Pendant que l'embryon est dans le mélange de cryoprotecteurs de la première étape, l'anneau est trempé dans celui de la deuxième étape et il se forme un film de cryoprotecteurs à l'intérieur de l'anneau. Il est ensuite appliqué sur l'embryon qui « se colle » au film. Le tout est ensuite immédiatement plongé dans un cryotube préalablement refroidi dans l'azote liquide puis plongé dans l'azote liquide (Oberstein *et al*, 2001).

#### 4.3.2.4. Descente de température :

La descente en température est linéaire et très rapide dans les techniques de vitrification comme le montre le schéma de la figure 18 :

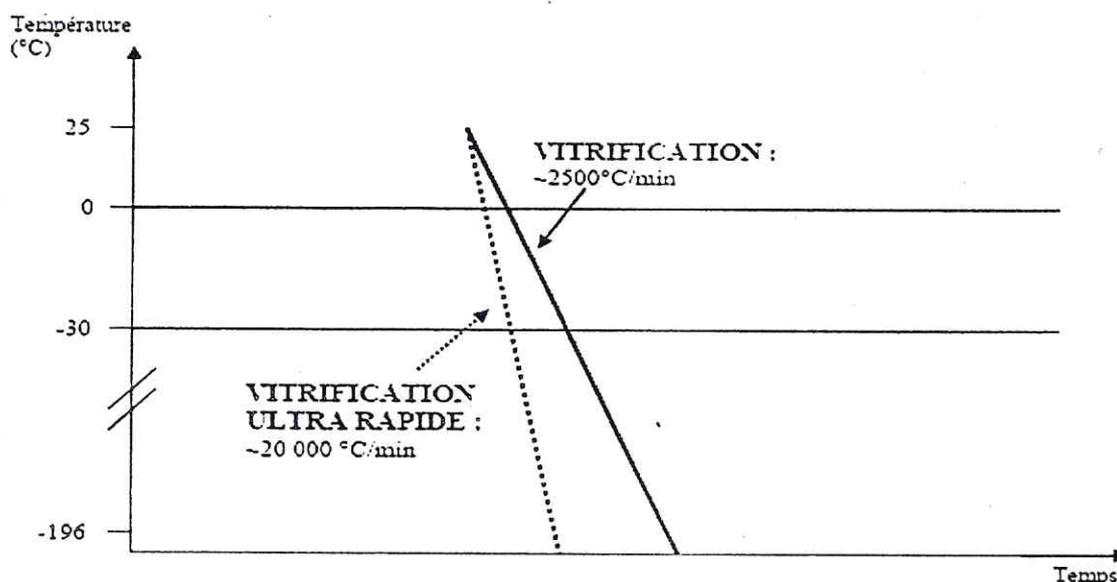


Figure 18 : Courbe de descente de température lors de vitrification et vitrification ultra rapide (INRA Production Animale, 2005)

#### 4.3.2.5. Avantages et inconvénients de la vitrification :

##### A. Avantages :

Cette technique est très rapide, elle ne nécessite pas d'équipements coûteux, et les embryons peuvent être vitrifiés au fur et à mesure de leur collecte (pas de temps d'attente contrairement à la technique de congélation lente).

Le passage direct de l'état liquide à l'état solide est un point très important surtout pour les embryons supportant mal le refroidissement.

**B. Inconvénients :**

Les très fortes concentrations de cryoprotecteurs sont hautement toxiques pour les embryons. Le temps de passage dans chacun des bains, surtout le dernier est très critique : la déshydratation de l'embryon doit s'arrêter à un temps précis, dépendant de la vitesse de pénétration des cryoprotecteurs et de leur concentration ainsi que de la température d'incubation. Il faut donc respecter scrupuleusement les temps imposés, d'où la nécessité d'avoir une main un peu experte pour réaliser cette technique.

**4.4. La décongélation :**

De nombreux travaux réalisés sur les souris (Leibo et al ; 1974) ; Whittingham et al, 1979 ; Leibo, 1981) nous montrent que lorsque les cellules sont fortement déshydratées, leur survie est élevée (supérieure à 70 %) à condition que la vitesse de réchauffement soit faible (3° C à 20° C/min) ce qui limite les variations osmotiques trop brutales. Par contre quand les cellules contiennent une certaine quantité de glace intracellulaire, ce qui est le cas lorsque les embryons passent de -35° C directement dans l'azote liquide, la survie de ceux-ci est bonne si la vitesse de décongélation est élevée (supérieure à 200° C/ min) ce réchauffement rapide évite la recristallisation de l'eau.

**4.5. Conclusion :**

La cryoconservation des embryons est une technique qui a fait d'énormes progrès depuis les années 70, au cours desquelles ont été rapportés les premiers succès de congélation d'embryons de mammifères domestiques.

Elle s'est diversifiée en plusieurs méthodes, alliant la rapidité de la congélation et la simplicité d'exécution. La méthode traditionnellement appliquée dans les espèces bovines reste la congélation lente, alors que la vitrification donne aussi de bons taux de survie embryonnaire mais vu sa complication reste un frein à son application sur le terrain. A l'heure actuelle, le rôle de la vitrification n'est donc pas dans le remplacement de la congélation lente, mais dans l'apport d'une solution technique pour des espèces ou des qualités d'embryons pour lesquelles la congélation lente n'a pas donné de résultats satisfaisants.

## 1. Introduction :

Au cours de la vie génitale d'une femelle plus précisément a l'âge de la puberté, la vache dispose au niveau de ces ovaires d'une réserve de follicules primordiaux qui va diminuer au cours de sa vie 117000 à 1 ans, ils ne seront plus que 22000 de 10 à 14 ans (Duplan et Parez, 1987). Et pourtant la plupart d'entre eux n'auront pas atteint le niveau de follicule préovulatoire, ils subissent l'atrésie et dégènèrent (Duplan et Parez, 1987).

Les traitements de superovulation permettent d'accroître le nombre d'ovules fournis par l'ovaire environ 10 fois plus par rapport a l'ovulation naturelle et de réduire fortement cet écart et ainsi d'augmenter remarquablement la production d'embryons au cours de chaque cycle de récolte (Duplan et Parez, 1987).

Le traitement de superovulation fait partie des techniques de biotechnologie qui permet de produire des embryons in utero après stimulation hormonale des femelles donneuses. Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leurs congélations.

La production d'embryons, dans l'espèce bovine, par des traitements de superovulation dépend de plusieurs facteurs, tel que la race, l'âge, la saison et l'état des ovaires pour ne citer que quelques uns. L'objectif dans notre travail est la maîtrise de la technique de superovulation ainsi que de tester la reponse de deux vaches de race améliorée au traitement de par un extrait hypophysaire qui est de type « Stimufol ».

## 2. Objectifs :

Notre principal but dans cette étude est la maîtrise de la technique de superovulation ainsi que l'étude de réaction des vaches laitières au traitement de superovulation. Le traitement repose sur l'utilisation d'hormone gonadotrope sur un lot composé de deux vaches de race laitière. Les animaux ont été traités après chaleurs de référence.

L'étude en question consiste à la collecte d'un certain nombre d'événements physiologique et leur évaluation :

- Délai d'apparition des chaleurs par rapport a l'injection de prostaglandine.
- Réponse des animaux au traitement de superovulation.

-Evaluation des structures ovariennes (appréciation par fouiller rectal du nombre de corps jaune, follicules).

-Au comptage et classification des embryons.

### **3. Matériels :**

#### **3.1. Animaux :**

L'étude a été effectuée sur un cheptel de la station expérimentale de la faculté agro-vétérinaire et biologie de l'université SAAD DAHLEB de BLIDA, composé de deux vaches de race laitière, dont une de race Montbéliarde (vache1) âgée de 6 ans, l'autre de race Holstein (vache2) âgée de 8 ans et sachant que les deux vaches se trouvent en stade de fin de lactation.

Au moment de notre étude les vaches étaient nourries à l'herbe en prairie et de la paille sous forme de lest à l'étable, associé à un complément alimentaire qui est composé principalement de maïs, soja et d'orge, distribué à une quantité de 2 kg/animal/jour.

Après les commémoratifs et l'examen général et spécial, on a eu comme suite :

Les vaches sont cyclées et elles ont manifestées trois fois les chaleurs à intervalle régulier avant le traitement, l'état d'embonpoint est de 2.5 pour la vache1 et de 2 pour la vache 2 et absence de pathologie d'ordre général et l'appareil génital n'a montré aucune pathologie.

#### **3.2. Extrait hypophysaire et traitement :**

La solution utilisée est le Stimufol produite par l'équipe du Pr.Beckers de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (Belgique).

Cette solution comporte deux gonadotropines purifiées à partir d'hypophyse porcine, la FSH et la LH avec un rapport FSH/LH 40% qui le plus adéquat pour les traitements de superovulation (Touati.K, 1993).

Pour la synchronisation nous avons utilisé des implants qui sont des petits cylindres d'une longueur de 18 mm et d'un diamètre de 2 mm, qui se place en position sous-cutanée sur la face externe du pavillon de l'oreille. Celui-ci contient 3 mg de Norgestomet, qu'il libère de façon régulière. Au moment de l'implant, 3 mg de Norgestomet et 3,8 mg de valérate d'oestradiol sont injectés par voie sous cutanée. Ce dispositif est commercialisé sous le nom de CRESTAR

### 3.3. Matériels d'insémination, collecte et de congélation des embryons :

- Un pistolet d'insémination.
- Paillettes d'inséminations.
- Une sonde souple avec mandrin métallique (sonde de Folley ),la sonde est a double voie,une voie pour gonfler le ballonnet situé a 5 cm de l'extrémité et d'une voie d'injection et de la récupération du liquide de lavage des cornes utérines.
- chemises sanitaires.
- Eau bidistillée.
- PBS (phosphate buffered saline) sous forme de comprimé, chaque comprimé est dissout dans 100 ml d'eau bi-distillée.
- Agitateur
- Milieu de conservation des embryons, PBS enrichi avec 4 % de BSA, en plus d'antibiotiques et antifongiques.
- Seringue de 50 ml qui sert a administré et récupérer le liquide de lavage de la corne.
- Un filtre " Encom " qui sert a filtré le liquide de récolte.
- Une bouteille stérile d'un litre permettant de contenir le liquide de lavage.
- Un dilataeur cervical.
- Permanganate de potassium pour la désinfection du matériel.
- Gants pour le fouiller rectal.
- Alcool chirurgical.
- xylocaine a 2 %.
- Boîtes de pétries carrées et rondes quadrillées, pour la recherche des embryons.
- Loupe binoculaire pour la mise en évidence des embryons.
- Une micropipette montée sur une seringue a insuline qui permet la manipulation des embryons.
- Un biocongélateur programmable.

#### 4. Méthode :

##### 4.1. Synchronisation des chaleurs :

Pour la synchronisation des chaleurs un implant est mis en place et laissé pendant 10 jours. Ce traitement est associé à une injection de prostaglandine "Estrumate" et de PMSG "Folligon" lors du retrait. Les vaches sont mises en observation à partir du lendemain du retrait de l'implant pour la détection des chaleurs. Les chaleurs obtenues servent dans notre travail à point de départ pour le prochain cycle qui sont nommées chaleurs de références, le traitement de superovulation sera mis en place 9 jours après ces chaleurs et dure quatre jours.

##### 4.2. Superovulation :

Le traitement de superovulation est réalisé à la FSH et LH porcines (Stimufol) dosé à 40 unités Armour (1 unité Armour correspond à 10 microgramme de FSH pure) avec un pourcentage de 40 % de LH.

Cette association FSH/LH est diluée dans 10 ml de NaCl isotonique, administrée en 8 injections intramusculaires biquotidiennes à 12 d'intervalle et à dose décroissante. A la 5<sup>ème</sup> injection de FSH, on injecte par voie intramusculaire de la prostaglandine "estrumate".

Le traitement commence au 9<sup>ème</sup> jours après apparition des chaleurs de références et dure pendant quatre jours, au 5<sup>ème</sup> jours du traitement l'animal reçoit une double insémination artificielle.

La collecte d'embryons est réalisée le 7<sup>ème</sup> jour après la première insémination.

# Partie Expérimentale

Tableau 3 : Protocole de traitement au de superovulation

| Jours        | Traitements   |
|--------------|---|
| Dim 25/12/05 | - Pose d'implant " Crestar "  |
| Mer 04/01/06 | - Retrait d'implant<br>- Injection de PG : 2ml<br>- Injection de PMSG : 500 UI    |
| Dim 15/01/06 | - Injection LH/FSH 40% : 2 ml (matin et soir)                                     |
| Lun 16/01/06 | - Injection LH/FSH 40% : 1,5 ml (matin et soir)                                   |
| Mar 17/01/06 | - Injection LH/FSH 40% : 1 ml (matin et soir)<br>- Injection de PG : 4 ml (matin) |
| Mer 18/01/06 | - Injection LH/FSH 40% : 0,5 ml (matin et soir)                                   |
| Jeu 19/01/06 | - Insémination artificielle (matin et soir)                                       |
| Jeu 26/01/06 | - Récolte d'embryons<br>- Injection de PG : 4ml                                   |

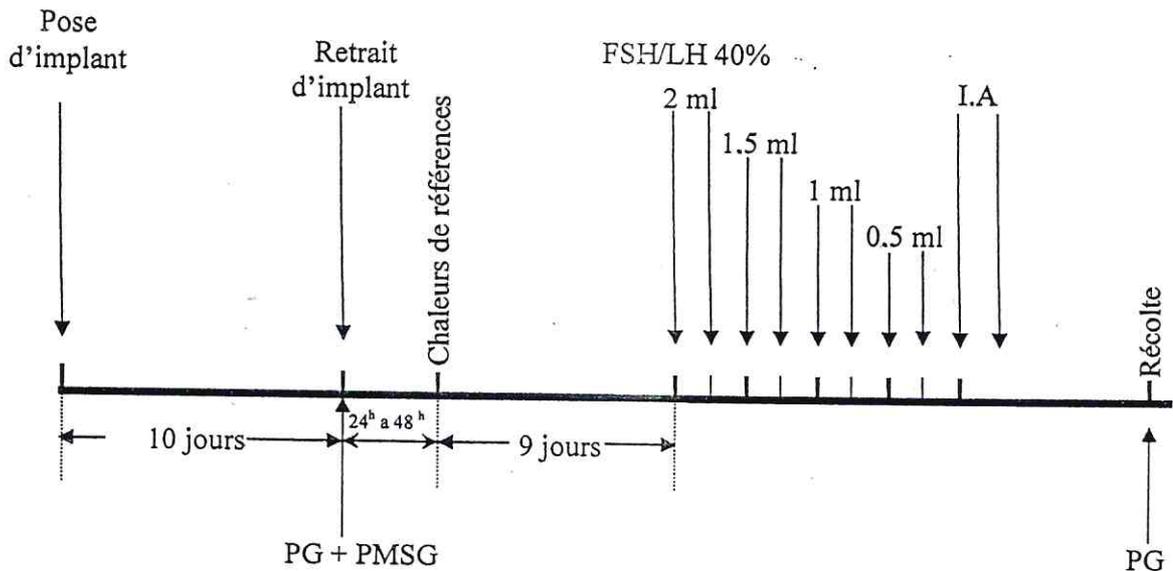


Figure 19 : Protocole de traitement de superovulation

#### 4.3. Insémination artificielle :

L'insémination artificielle est faite le matin et le soir du 5<sup>ème</sup> jour à compter de la 1<sup>ère</sup> injection de superovulation.

Les deux vaches ont été inséminées en deux fois à 48 heures et 60 heures de l'injection de prostaglandine, on a utilisé 4 paillettes par animal superovulé et cela en deux fois (48 et 60 heures), la semence employée a été fournie par le CNIAG (centre national de l'insémination artificielle et de l'amélioration génétique).

La semence des taureaux utilisés est :

- LECUYER 7495022208 03/12/2005 (FRANCE) pour la vache 1.
- PANDER (ET) 10395373 13/03/2005 CNIAG ALGERIE pour la vache 2.

### 5. Collecte des embryons :

La collecte des embryons est réalisée 7 jours après insémination artificielle par voie cervicale grâce à une sonde souple munie d'un ballonnet.

- L'animal est systématiquement placé dans un travail.
- Une anesthésie épidurale (4 ml de xylocaine à 2 %) pour la manipulation plus aisée du tractus génital.
- Le rectum est débarrassé des matières fécales et la région vulvaire convenablement lavée et désinfectée.

La sonde de récolte sera préalablement désinfectée, recouverte d'une chemise sanitaire, elle est introduite dans le vagin en longeant le plafond pour éviter le méat urinaire, une fois arriver au col, la chemise sanitaire sera rompue. Le col est alors manuellement ramené vers l'arrière et vient coiffer l'extrémité de la sonde. La progression de la sonde dans le col est assuré en prenant le col en avant de la sonde et en le manipulant de bas en haut et de gauche à droite. Une fois le col franchi, la sonde est alors introduite dans l'une ou l'autre corne. Le ballonnet sera placé 5 cm environ en avant de la bifurcation des cornes, une fois le ballonnet est alors gonflé grâce à une seringue et le mandrin retiré.

Le rinçage de la corne utérine dans le but de récupérer les embryons qui s'y trouvent, se fait en injectant et en récupérant à travers la sonde une solution de PBS, suivant des doses croissantes et en adoptant la démarche suivante : 2 fois 20 ml, 2 fois 30 ml, 2 fois 40 ml, une fois 50 ml, la dernière seringue comportera 20 ml de PBS et 30 ml d'air.

À chaque fois qu'on introduit une quantité de solution on la récupère pour la stocker dans un flacon identifié et propre à chaque vache. On déplace la sonde après avoir remis le mandrin métallique vers l'autre corne et on effectue la même opération, toutes ces opérations sont contrôlées par voie rectale.

## 6. Résultats :

### 6.1. Résultats obtenus lors d'induction des chaleurs :

Les résultats obtenus lors d'induction des chaleurs par les implants sur les deux vaches :

La vache1 est venue en chaleur (oestrus) 34h 30 après retrait de l'implant, les premier signes oestriques observés sont : renflement, agitation de l'animal, présence peu abondante de glaire cervicale, congestion et tuméfaction de la muqueuse vulvaire.

La vache2 est venue en chaleurs 44h00 après retrait, les premiers signes oestriques qui ont été observés sont : tuméfaction et congestion de la muqueuse vulvaire, présence de la glaire cervicale, plus l'animal est agité.

### 6.2. Résultat obtenus lors de la superovulation :

Les deux vaches qui sont traitées aux hormones LH/FSH 40%, l'analyse des résultats présentés nous permet d'évaluer la réponse des deux vaches au traitement de superovulation, nous remarquons qu'elles sont venues en chaleurs dans les 48 heures qui ont suivi l'injection de la prostaglandine.

Les premiers signes ont été observés soit 32h00 après l'injection de PG pour la vache 1 et soit 36h00 après l'injection de la PG pour la vache 2.

Il est à noter que pour la vache2 les signes oestriques étaient plus intensément, nous avons également observé une durée moyenne des chaleurs environ de 16h.

**Tableau 4 :** Evaluation globale de la réponse au traitement de superovulation

| Vaches  | Début des chaleurs par rapport à l'injection de PG | Fin des chaleurs par rapport à l'injection de PG |
|---------|--|--|
| Vache 1 | 32h00  | 50h00  |
| Vache 2 | 36h00  | 50h00  |

### 6.3. Evaluation des réactions ovariennes :

Lors de la récolte embryonnaire, les deux vaches ont été soumises à la palpation ovarienne lors d'examen par voie rectale pour apprécier leur réponse au traitement de superovulation, vu que dans le cas d'un cycle normal, on trouve qu'un corps jaune sur l'un ou l'autre ovaire, exceptionnellement deux (cas de gestation gémellaire hétérozygote), une estimation de 23 corps jaune, 8 sur l'ovaire gauche et 7 sur l'ovaire droit pour la vache 1 et 15 corps jaune soit 11 sur l'ovaire gauche et 12 sur l'ovaire droit de la vache 2 avec une moyenne de 19 corps jaune pour les deux vaches.

**Tableau 5 :** Appréciation de la réponse de la superovulation via la palpation transrectale

| Numéro de vache | Nombre de CJ estimés/vache | Corps jaune palpables |              |
|-----------------|----------------------------|-----------------------|--------------|
|                 |                            | Ovaire gauche         | Ovaire droit |
| Vache 1         | 23                         | 11                    | 12           |
| Vache 2         | 15                         | 8                     | 7            |

### 6.4. Résultats de récolte des deux vaches :

La récolte des embryons s'est passée dans des bonnes conditions, les 2 vaches ont été récoltées le même jour.

Les récoltes ont été transportées au laboratoire de biotechnologie de la reproduction du département Vétérinaire de BLIDA. Les culots sont ensuite récupérés de chaque bouteille puis une exploration très précise est faite sous loupe binoculaire, les embryons découverts sont prélevés et isolés dans des capules pour les évaluer et les classer.

Concernant les résultats de la récolte (Tableau 7), ils sont moyens pour la vache 1 avec 5 embryons mais qui est faible par rapport aux corps jaune totaux palpés qui sont environ 23, un résultat médiocre pour la vache1 avec un seul embryon récolté par rapport a un nombre de corps jaune estimé a 15, une moyenne de 3 embryons récoltés par vache, donc on peut déduire que le nombre d'embryons récoltés ne traduit pas la réalité de la réponse ovarienne au traitement de superovulation.

Une fois les embryons repérés et isolés, nous les avons classés selon leurs caractères morphologiques. Le principe de la méthode se base sur la concordance entre l'aspect morphologique et le stade du développement dont l'appréciation se fait sur la base d'un certain nombre d'observations proposées par l'INRA-UNCEIA (1990).

La qualité des embryons récoltés (Tableau 8), on note pour la vache 1 un nombre de 3 embryons transférables sur les 5 récoltés, un embryon dégénéré et un embryon de mauvaise qualité, pour la vache2 le seul embryon récolté est de très bonne qualité, avec une moyenne de 2 embryons transférables par vache, il est à noté que nous n'avons récoltés aucuns ovocytes non fécondés.

Tableau 6 : résultats de récolte des 2 vaches

| Vaches | Nbre de CJ estimés | Nbre d'embryons récoltés | Emb transférables | Emb congelables | Emb non fécondés | Emb dégénérés | Emb non transferable |
|--------|--------------------|--------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|----------------------|
| Vache1 | 23                 | 5                        | 3                 | 0               | 0                | 1             | 2                    |
| Vache2 | 15                 | 1                        | 1                 | 1               | 0                | 0             | 0                    |

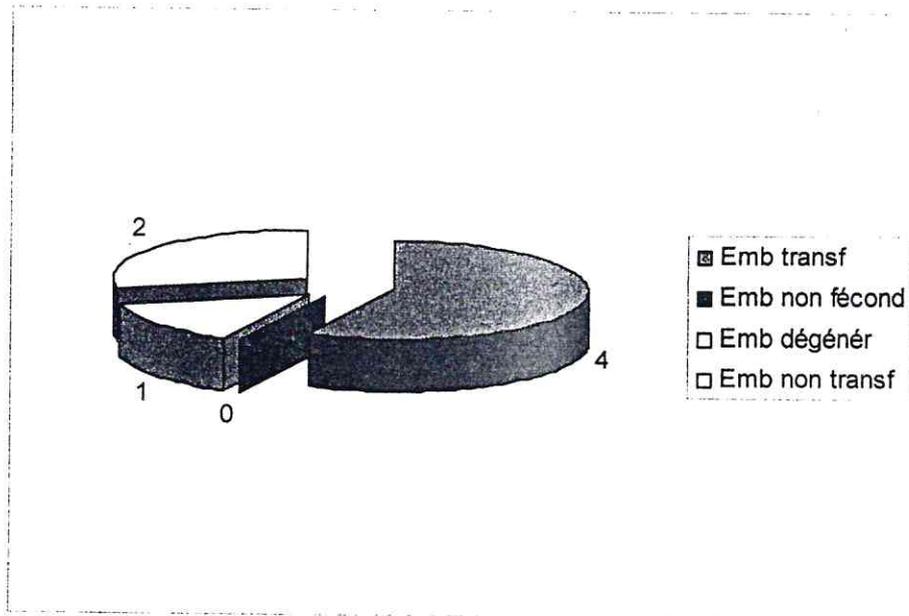


Figure 20 : résultats globaux de récolte des embryons des deux vaches

Tableau 7 : classification des embryons récoltés des deux vaches

| Vache  | Emb récoltés | Emb de classe 1<br>n (%) | Emb de classe 2<br>n (%) | Emb de classe 3<br>n (%) | Emb de classe 4<br>n (%) | Non fécondés<br>n (%) | Emb dégénérés<br>n (%) |
|--------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| Vache1 | 5            | 0 (0%)                   | 3 (60%)                  | 0(0%)                    | 1(20%)                   | 0(0%)                 | 1(20%)                 |
| Vache2 | 1            | 1(100%)                  | 0(0%)                    | 0(0%)                    | 0(0%)                    | 0(0%)                 | 0(0%)                  |

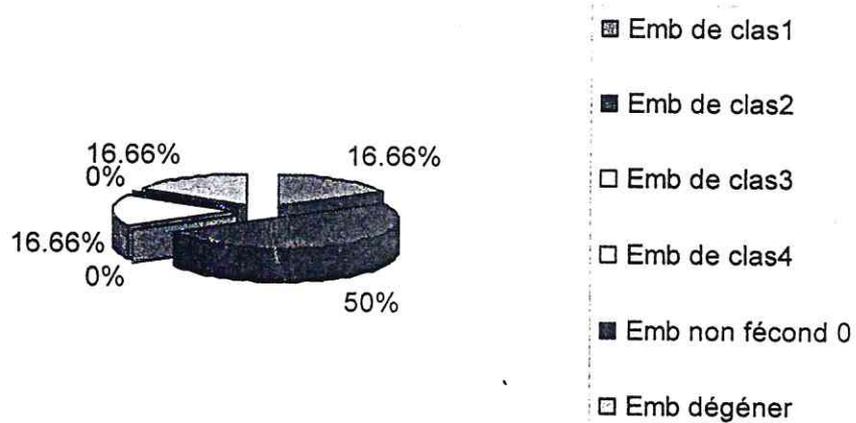


Figure 21 : Classification des embryons récoltés des deux vaches

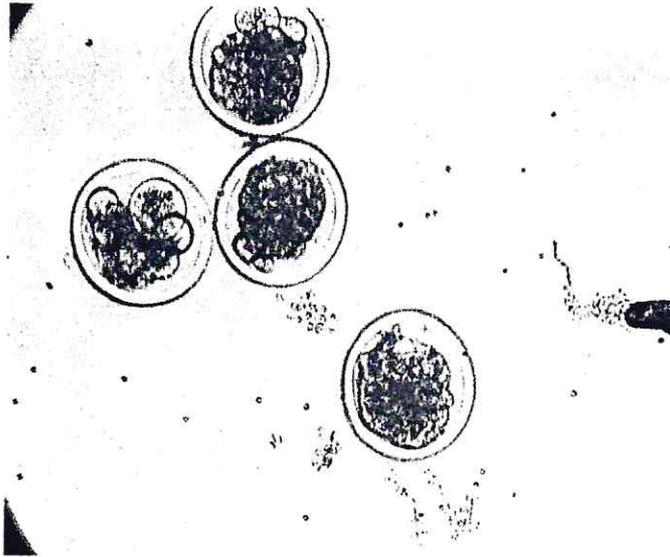


Figure 22 : Embryons de différentes classes issus de la vache 1



Figure 23 : Morula classe 2. issu de la vache 1

## 7. Discussion :

Dans la première partie de ce travail nous avons tenté d'évaluer la réponse des vaches au traitement à base d'extrait hypophysaire, dans un deuxième temps nous avons essayé de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres travaux avec la même solution.

La réaction des vaches traitées au STIMUFOL sur le plan clinique était satisfaisante dans l'ensemble, la venue en chaleur s'est fait dans les délais limites (48 heures après injection de prostaglandine). Le nombre de corps jaune étaient de 23 pour la vache 1 et de 15 pour la vache 2 avec une moyenne de 19, comparant à Adel (2003) avec un nombre moyen de 7 corps jaunes par vache ou à celui obtenu par Chupin(1988) qui est de 14.7 corps jaune ou Chupin et Procureur(1983) avec un nombre de  $15.9 \pm 15$ , P.E.H. Diop et al (1995) avec  $5.6 \pm 2.6$ , Awana (1994) avec un nombre de 5.4, Elaidi et al (1993) avec  $9.5 \pm 2.6$ , Diop et Coll(1994) avec 5.06 de corps jaune moyens par vache.

Les résultats obtenus lors de la collecte des embryons étaient inférieurs à ceux obtenus par d'autres auteurs, un nombre de 5 embryons pour la vache 1 avec un nombre de 3 embryons transférables et tous sont de classe 2, un seul embryon pour la vache 1 qui est de classe 1, avec une moyenne de 2 embryons transférables par vache comparant à d'autres résultats obtenus par le Adel (2003) avec le même extrait hypophysaire et avec le même rapport FSH/LH c'est-à-dire 40% avec un nombre moyen de 4.5 par vache avec environ 2.83 embryons transférables ou avec Touati (1993) avec un nombre  $8.5 \pm 0.54$  d'embryons récoltés et  $5.5 \pm 0.43$  d'embryons transférables, H.Lakhdissi (1993) obtient un nombre de  $10.3 \pm 6.27$  d'embryons totaux avec un nombre de 4.12 d'embryons transférables, P.E.H. Diop et al (1995) avec un nombre de 4.25 d'embryons récoltés avec un nombre de 3.25 soit 69.23% d'embryons transférables, L. Elaidi et al (1993) avec un nombre de  $6 \pm 2$  d'embryons et  $3.2 \pm 2$  embryons transférables, UNCEIA (2000) avec un nombre de 9.3 d'embryons totaux récoltés avec un nombre de 5.4 d'embryons transférables, Henzen (2005) obtient un nombre de 4.4 transférables ou, Chupin et Procureur(1983) on eu un nombre de  $5.3 \pm 6.2$  d'embryons transférables ou avec Donaldson en 1984 a obtenu  $2.5 \pm 3.4$  embryons transférables ce en utilisant la FSH BURNS-BIOTEC.

## 8. Conclusion :

Notre expérimentation a porté sur l'une des biotechnologies embryonnaires les plus récentes et les plus utilisées dans le monde scientifique, nommée superovulation mais malheureusement ce traitement reste dans notre pays en stade expérimental, le principe est de produire plusieurs ovocytes ou embryons d'une vache par opposition à ce qui se fait naturellement c'est-à-dire un embryon par cycle oestral d'une durée de 21 jours chez les bovins. 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.

Pendant notre expérimentation on a remarqué que les vaches ont bien répondues au traitement de superovulation malgré que les résultats de collecte obtenus étaient inférieurs aux résultats obtenus par d'autres auteurs et cela peut être du a un défaut de collecte qu'on a suspecté lors d'utilisation du filtre "Encom" ou même le problème majeur dans notre pays, est vraisemblablement la sous alimentation et dont son influence est énorme sur la qualité des embryons et la reproduction normale des animaux. Néanmoins le travail que nous avons effectué nous a permis non seulement de tester les réponses des vaches au traitement de superovulation mais également d'apprendre et de maîtriser les techniques de collecte, examen et la congélation des embryons.

La variabilité de la réponse aux traitements de superovulation reste l'inconvénient majeur de la production d'embryons *in vivo*. Cette variabilité est due à la non maîtrise des résultats de superovulation, qui 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.

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.

**9. Recommandation :**

Lors de notre étude de la superovulation, les résultats obtenus sur les deux vaches laitières nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux liés aux traitements de superovulation. Plusieurs facteurs limitants cités dans le deuxième chapitre pourraient être jugulés afin d'augmenter et améliorer les réponses de superovulation et nous avons constaté aussi que nous pouvions avoir de très bons résultats avec les produits appropriés. La première recommandation est de répéter ces traitements plusieurs fois, en essayant à chaque fois d'éliminer les facteurs limitants tel que l'alimentation et les facteurs d'environnement, et que ces traitements se fassent d'abord en station expérimentale, c'est-à-dire au niveau de l'université avant de les appliquer sur terrain, car nous avons vu dans toutes les étapes de ce protocole que la station offrait des avantages non négligeables, dont la liberté d'action, la proximité des laboratoires et la possibilité de suivi continu.

D'autre part, afin de faciliter le travail, il est impératif de prévoir un équipement adéquat, notamment les loupes appropriées pour l'identification des embryons. 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.

## Références Bibliographiques

- Adashi E.Y, Resnick CE, Hernandez ER. Insulin-like growth factor-1 as amplifier of follicle stimulating hormone action: studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1998; 122: 1583-1591.
- ✕-Armstrong DT. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39: 7-24.
- Awana A. (1994), Induction de la superovulation chez la femelle bovine Ndama pendant la saison des pluies au Sénégal Th. Méd. vét. ; Dakar, n°11.
- Beckers J.F., Closset J. Maghuin Rogister G., Hennen G., Bovine follitropin. Isolation and characterization of the native hormone and its  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *Biochimie*, 1977. 59, 825-831.
- Benyei B., Fari M., Baarros C.W.C., Solti L. (1999). Superovulatory response in continuously heat stressed holstein-friesian cattle in Brazil. *Theriogenology*. 51, 260.
- Bergfelt D.R., Bo G.A., Mapletoft R.J., Adams G.P. (1997). Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. *Ani. Reprod. Sci.* 49, 1-12.
- ✕-Betteridge, K.J. and Fléchon, J.E. (1988). The anatomy and physiology of reimplantation embryo. *Theriogenology*. 29, 155-187.
- Bevers M.M., Dieleman S.J., Gielen J.T., Wurth Y.A., Janszen B.P.M., Van de broek J., Willemse A.H. (1993). Yield of embryos in PMSG-superovulated cows treated with anti-PMSG six or 18 hours after the peak of luteinising hormone. *Veterinary Record*. 132, 186-189
- Birnie L.M., Broadbent P.J., Hutchinson J.S.M., Watt R.G., Dolman D.F. (1998). Can superovulatory response in heifers be predicted? *J. Repro. Fertil.* 21, 32-33, abst series.
- Bo G.A., Pierson R.A., Mapletoft R.J. (1991). The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. *Theriogenology*. 36, 169-183.
- Bo G.A., Hockley D., Nasser L.F., Mapletoft R.J. (1994). Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology*. 42, 963-975.
- Bo G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. (1996). Effect of progestagen plus oestradiol-17-beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*. 45, 897-910.
- Breuel K.F., Baker R.D., Butcher R.L., Townsend E.C., Inskoop E.K., Dailey R.A., Lerner S.P. (1991). Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*. 36, 241-255.
- Britt J.H., Holt L.C. (1988). Endocrinological screening of embryo donors and embryo transfer recipients: a review of research with cattle. *Theriogenology*. 29, 189-202.

- 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. Repro. Fertil.* 101, 583-591.
- Callesen H., Greve T. & Hyttel P. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25: 71-86.
- Caraty A., Evans M., Thiery J.C., Malpax B., Chemineau P., 1997. Contrôle central de la sécrétion des gonadotropines par les neurones à GnRH. In : les gonadotropines. Ed. Combarous Y., Volland-Nail P. INRA, Paris, 225-239.
- \*-Chupin D. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Colloque Soc Fr Etude de la fertilité. Masson Ed Paris 1988 ;26 :213-232.
- Combarous 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.*
- Combarous Y., 1997. Structure et relation structure médiateurs. In : *Les Gonadotropines. Ed. Combarous Y., Volland-nail P. INRA, Paris.*
- \*-Crozet, N.. Ultrastructural aspects of *in vivo* fertilization in the cow. *Gamete Res.* (1984) 10, 241-251.
- \*-Derivaux. J et Ectors. F, 1980. Physiologie de la gestation et obstétrique vétérinaire: Les éditions du point vétérinaire: pp: 76
- Dieleman S.J., Bevers M.M. (1987). Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG treated cows. *J. Repro. Fertil.* 81, 533-542.
- Dieleman S.J., Bevers M.M., Wurth Y.A., Gielen J.T., Willemsse A.H. (1989). Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. *Theriogenology.* 31, 473-487
- Diop P.E.H., Fall R., Mbaye M., Faye L., Fall A., Faye A. (1994), Le transfert d'embryons en milieu villageois Sénégalais *Dakar Médical* 39 : 135-141.
- Diop.P.E.H.,(1995). Service de Chirurgie- Reproduction, Ecole inter-etats des sciences et Medecine Vétérinaire BP 5077 Dakar, Sénégal
- Domanski E, Chomica LK, Ostrowska A, Gajeurska A, Matensiak 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.
- Donaldson L.E.,Effect of age of donor cows on embryo production.,1984.

- Donaldson L.E., Ward D.N. (1986). Effect of LH on embryo production in superovulated cows. *Vet. Record*. 119, 625-626.
- Dorn C.G., Baker J.F., Lunt D.K., Kraemer D.C. (1991). Repeated, short interval superovulation in virgin heifers. *Theriogenology*. 35, 302
- \*-Driancourt M.A. & Fry Roc 1992. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim. Reprod. Su.* 27: 279-292.
- \*-Driancourt MA, Gogeon A,D Royere, Thibault C (1991). La fonction ovarienne. la reproduction chez les mammiferes et l'homme. E. Marketing. Paris, France. Ministère de la Recherche et de la Technologie @IST): 273-298.
- \*-Drion P.V., Beckers J.F., Ectors F.J., Hanzen C., Houtain J.Y., Lonergan P. (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogenèse et atresie. *Le point Vétérinaire*. 28, numéro spécial, 881-891.
- Drion P.V., Remy B., Houtain J.Y., Mcnamara M., Baril G., Heyman Y., Cognie Y., Theau-Clement M.C., Leboeuf B., Ectors F., Segers K., Beckers J.F. (1998). Utilisation répétée des gonadotropines exogènes dans le contrôle de la reproduction: justifications, relations structure-activité biologique, effets secondaires potentiels. Une synthèse. *Ann. Méd. Vet.* 142, 373-396.
- Dupoul., 1997. Hormones et grande fonction. Tome I et II.
- Ellington J.E., Elefson E.E., Mccall R.M. (1987). Use of Norgestomet implant as an aid when superovulating low fertility dairy cattle. *Theriogenology*. 27, 227.
- Elsden R.P., Nelson L.D., Seidel G.Eo Jr. 1978. Superovulation of cattle with pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 9: 17-26.
- Ennuyer, M., 2000. Les vagues folliculaires chez la vache : Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction. *Point Vét.* 2000, 31 (209) 377-383.
- \*-Erickson B.H., 1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary .J. *Reprod. Fert.*, 10, 97-105. In: Drion et al.,2000. *Anim. Méd.* 144: 385-404.
- Estrada J.L., Pachon L.A., Olivera M., Pidrahita J., Westhusin M. (1998). Superovulatory response of colombian creole cattle to two doses of FSH. *Theriogenology*. 49, 377.
- Findlay J.K. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, 1993, 48, 15-23
- \*-Fontaine., 1995. VADE-MECUM du vétérinaire, XV<sup>ème</sup> editions
- Foote R.H., Ellington J.E. (1988). Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology*. 29, 111-123
- Freret S., Grimard B., Ponter A., Humblot P. (2000). Variation du niveau d'apport nutritionnel et production d'ovocytes et d'embryons chez les ruminants: étude bibliographique. *Elev. Insem.* 297, 3-25.

- x-Gandolfi, Brevini, T.A.L., Modina, S., Bianchi, R. and Passoni, L. (1993). Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 189-192.
- Gonzales A., Lussier J.G., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. (1990). Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*. 33, 519-529.
- x-Gordon I (1994). Laboratory production of cattle embryos. Wellingford. University Press.
- Gosselin N., Price C.A., Roy R., Carroérep.D. (2000). Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone. *Theriogenology*. 54, 507-521
- Goulding D., Williams D.H., DuffY P., Boland M.P., Roche J.F. (1990). Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*. 34, 767-778
- Goulding D., Williams D.H., Roche J.F., Boland M.P. (1994). Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen. *J. Repro. Fertil.* 100, 505-510
- Grasso F., Guilbault L.A., Roy G.L., Lussier J.G. (1989). Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSHp at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*. 31, 1209-1220
- Gray B.W., Cartee R.E., Stringfellow D.A., Riddle M.G., Riddle K.P., Wright J.C. (1992). The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology*. 37, 631-639.
- Guignot, F. (2003) Le point sur la cryoconservation des embryons. *dans Biotechnologies de la Reproduction : quoi de neuf, Association pour l'Etude de la Reproduction Animale, Maison-Alfort, France.* 77-88.
- Guilbault L.A., Grasso F., Lussier J.G., Rodier P. & Matton P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* 91: 81-89.
- Guilbault L.A., Lussier J.G., Grasso F. (1992). Interrelationships of hormonal and ovarian responses in superovulated heifers treated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*. 37, 1029-1040
- x-Guthrie HD, Grimes RW, Cooper BS, JM Hammond (1995): Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *Journal of Animal Science* 73: 2834-2844.
- x-Hahn J.(1992). Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*. 38, 269-275.
- x-Hanzen Ch., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache. Aspect morphologique et cynétique. *Anim. Méd. Vét.* 2000, 144,223-235.

- Hanzen Ch. La production d'embryons in vivo. 2<sup>ème</sup> Doctorat : Chapitre 29, Année 2005-2006.
- Hare W.C.D., Mitchell D., Betteridge K.J., Eaglestone M. D. & Randall G.C.B. 1976. Sexing two week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: preliminary methods and results. *Theriogenology* 5: 243-253
- Hasler J.F., McCauley A.D., Chermthorn EDC. ; Foote R.H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 19: 83-99.
- Hasler J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415. Hochi S., Fujimoto T., Oguri N., 1995. Large
- Hochi, S., Fujimoto, T., Braun, J. et Oguri, N. (1994) Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 42, 483-488.
- Hochi, S., Fujimoto, T. et Oguri, N. (1995) Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 113-117.
- Hockley D.K., Bo G.A., Palasz A.T., Del Campo M.R., Mapletoft R.J. (1992). Superovulation with a single subcutaneous injection of follitropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*. 37, 224
- 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.
- Huhtinen M., Rainio V., Aalto J., Bredbacka P., Maki-Tanila A. (1992). Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*. 37, 457-463
- \*-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. Quartely*, 16, 78-80
- Humblot P., Rodrigues J.L., Nibart M., Silvestrini Tiezzi F.L., Jeanguyoy 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. *Elev. Insem.* 261, 7-18.
- \*-Hunter, R.H.F., Experimental studies of sperm transport in sheep, cows and pigs, *Vet. Rec.*, (1985) 116, 118.
- Hupka S., Meinecke-Tillmann S., Detterer J., Meinecke B. – 2000 – Variables influencing embryo collection results in superovulated German Holstein cattle. – In : *Proceedings 16<sup>th</sup> AETE meeting, Santander, 08-09 septembre 2000* : 166
- INRA, *Prod. Anim.*, 2005, 18 (1), 27-35
- \*-INRAP, 1988. Institut national de la recherche agronomique et production

- INRA-UNCEIA (1990). Blastographie. *Elev. Insem.* 235, 39 pages
- Jolly PD, Tisdail DA, Heath DA, Lun S, McNatty KP (1994): Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to folliclestimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biology of Reproduction* 51: 934-944
- Kafi M., McGowan M.R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Ani. Reprod. Sci.* 48, 137-157.
- 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. *Ani. Reprod. Sci.* 46, 1-14.
- x-King, G. J. , Atkinson, B.A., Robertson, K.A., Implantation and early placentation in domestic ungulates, *J. Reprod. Fert.*, (1982) Suppl. 31, 17-30.
- Kohram H., Bousquet D., Durocher J., Guilbault L.A. (1998). Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. *Theriogenology.* 49, 1165-1174.
- x-Kolb, 1975 . Physiologie des mammifères domestiques.
- Lacaze S., Coupet H., Blattes M., Garreau S., Hennequin M. – 1991 – Influence du nombre d'inséminations artificielles sur le pourcentage d'embryons utilisables après traitement de superovulation. – In : *Proceedings 7<sup>th</sup> AETE meeting, Cambridge, 14-15 septembre 1994* : 156.
- Lafri M., Nibart M., Durand M., Morel A., Jeanguyot N., Humblot P. (1999). Effect of the interval between LH peak and first AI on embryo quality in cattle. *Theriogenology.* 51, 410.
- Laidi. L, 1993. Service Santé Animale, S.N.D.E. RABAT. Effet de différents traitement sur la réponse à la superovulation chez la race bovine « Oulmes Zaer ».
- Lakhdissi.H, (1993). Département de Reproduction et Insémination artificielle- Institut Agronomique et Vétérinaire. HASSAN II. RABAT.
- Lane, M., Bavister, B.D., Lyons, E.A. et Forest, K.T. (1999) Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature* 398, 1234-1236.
- Lauriere P., Maniere J., Chastant S., Grimard B. (2001). Facteurs de variation de la production d'embryons chez des vaches Charolaises superovulées en région Bourgogne. *Rencontre Recherche Ruminants.* 361-364.
- Lee D.W., Lee B.C., Roh S., Lee E.S., Lim J.M., Hwang W.S. (2000). Effects of dominant follicle puncture on ovarian responses of hanwoo cattle (*Bos taurus coreanae*) to exogenous gonadotropins. *Theriogenology.* 53, 500
- Leibo S.P., Mazur P., Jackowski S.C, factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing, *Exptl. Cell. Res.*, 1974, 89, 79-88.

- Leibo S.P., Preservation of ova and embryo by freezing. In " New technology in animals breeding " Eds. B.J. Brakett, G.E. Seidel and S.M., Academic press, N.Y., 1981, 127-140
- Lohuis MM (1995): Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 5 1-60.
- \*-Lussier JG; Matton P, Duffour JJ: Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod Fertil* 1987. 81: 301-307.
- Manciaux L., Ponsart C., Grisouard D., Humblot P. (2000). Sources of variation in embryo production following superovulation in the monbeliard breed. *Theriogenology*. 53, 502.
- Mapletoft R.J., Martinez M.F., Adams G.P., Kastelic J., Burnley C.A. (1999). The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology*. 51, 411.
- \*-Mialot J.P., Chastant S. (2000). Communication personnelle. Mitchell B.R., Martinez M., Bentley D.M., Mapletoft R.J. (1998). A comparison of estradiol 17b and GnRH in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in holstein cows. *Theriogenology*. 49, 380.
- Monniaux D, Chupin D, Saumande J: Superovulatory responses of cattle *Theriogenology* 1983; 19: 55-81.
- Moser M.T, Garverick H.A, Smith M.F, 1989. Follicular growth and fined endocrine patterns of prepuberal heifers administered bovine follicular and(or) follicle stimulating hormone.
- Murphy B.D., Mapletoft RJ., Manns J., Humphrey W.D. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21: 117-125.
- Nakamura.T, Takio.K, Eto.Y, Activin-binding protein from Rat ovayis follistatin science,1990, 247, 836-838.
- Nibart M. (1991). Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexege. *Rec. Med. Vet.* 167, 261-290.
- Nicholas FW (1996): Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science* 42: 205-2 14.
- Niemann, H. (1991) better results from the superovulation of donor cows. *Tierzuchter* 43, 34-35.
- Oberstein, N., O'Donovan, M.K., Bruemmer, J.E., Seidel, G.E., Jr., Carnevale, E.M. et Squires, E.L. (2001) Cryopreservation of equine embryos by Open Pulled straw, Cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 55, 607-613.
- O'callaghan D., Boland M.P. (1999). Nutritionnal effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim. Science*. 68, 299-314

- Otoi T., Koyama N., Yamamoto K., Tachikawa S., Suzuki T. (1998). Superovulatory responses in Japanese black beef cows following largest follicle aspiration or human chorionic gonadotrophin (hCG) treatment. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 961-963.
- Palasz, A.T., Nibart, M., Martin-Sportiello, I. et Humblot, P. (1996) Progrès récents de la congélation d'embryons et d'ovocytes de mammifères. Principes généraux. *Elevage et Insémination* 273, 1-13.
- Parez, M ; Duplan J.M, 1987. L'insémination artificielle bovine. Reproduction et amélioration génétique. P: 105-124.
- Peters. A.R and PJH. Ball. Reproduction in cattle - 1987 – 1994 Butter worths - UK
- Picard L, Sirard MA, King A (1989): Biotechnologies associées au transfert d'embryons. Symposium Bovins Laitiers: 81-87
- Ponsart C., Govignon A., Rohou A., Manciaux L., Delcroix P., Grisouard D., Humblot P. (2001). Effects of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the prim holstein and montbeliarde breeds. *Theriogenology*. 55, 369.
- Putney D.J., Drost M., Thatcher W.W. (1988). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*. 30, 195-209.
- Rajamahendran R., Canseco R.S., Denbow C.J., Gwazdauskas F.C., Vinson W.E. (1987). Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology*. 28, 59-65.
- Rall W.F., Fahy G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at - 196 degrees C by vitrification. *Nature*, 313, 573-575
- Rieger D., Desaulnier D., Goff A.K. (1988). Ovulatory response and embryo yield in superovulated Holstein heifers given a priming dose of FSH-P at day 2 of the estrous cycle. *Theriogenology*. 30, 695-699.
- Rieutort., 1995. Abrege. Physiologie Animale 2 : Les grandes fonctions.
- 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,
- ✖ - Rüsse I (1983): Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica* 24: 77-92.
- Sairam, (M.R) et Coll 1974, « LH » in Vaissaire.
- Saumande J. 1980. Concentrations of luteinizing hormone, cestradiol-1713 and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrinol.* 84: 425-437.
- Saumande J., Procureur R & Chupin D. 1984. Effect of injection time of anti-PMSG serum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology* 21: 727-731

\*-Saumande J, 1991. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec Med Vet* 167: 205-218.

-Savio J.D., Bongers H., Drost M., Lucy M.C., Thatcher W.W. (1991). Follicular dynamics and superovulatory response in holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. *Theriogenology*. 35, 915-929.

-Scheffen B., Van der Zwalmen P., Massip A., 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters*, 7, 260-269.

-Schneider H.J.Jr., Castelberry R.S., Griffin J.L., commercial aspects of bovine embryo transfert. *Theriogenology*, 1980. 13,73-85. 1980.

γ-Scriban R. 1999. *Biotechnologie. 5ème édition, P 629-761*

-Secchi, 1976. In: Deltang F. Et Hivorel F., to control reproduction is to control the futur. Doc. SANOFI S.A.

-Shankar U., Agarwal S.K., Yadav M.C. (1998). Seasonal influence on superovulation response and production of embryos in cattle. *Indian Vet. J.* September 1998, 807-809.

-Slade, N.P., Takeda, T., Squires, E.L., Elsdon, R.P. et Seidel G.E., Jr., 1985) A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology*. 24. 45-58.

-Slimane W., Nibart M., Thuard J.M., Keita J.B., 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 11<sup>th</sup> AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995*: 240.

-Smith J.F., Padgitt D.D., Hayman D.L. (1988). The effects of incorporating a norgestomet ear implant into a superovulation regime. *Theriogenology*. 29, 310. 176

\*-Soltner, 1999. La reproduction des animaux d'élevage.

-Sreenan J.M. 1975. Successful non-surgical transfer of fertilized cow eggs. *Veterinary Record* 96: 490-491.

\*-Tilly JL, Kowalski KL, Johnson AL, Hseuh AJW (1991): Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129: 2799-2801.

-Tonhati H., Lobo R.B., Oliveira H.N. (1999). Repeatability and heritability of response to superovulation in holstein cows. *Theriogenology*. 51, 1151-1156

-Touati K., Beckers J.F., Ectors F. (1991). Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment. *Theriogenology*. 35, 285

- Touati, K., (1993). Contribution à l'étude de la production et de la cryoconservation d'embryons et demi-embryons dans l'espèce bovine ; These de Doctorat vétérinaire, 106 pages.
- \*-Trounson, A.O., Moore, N.W., The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, (1974) 41, 97-105-
- Vaissaire, J.P., 1977. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Maclouine, Paris.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T. et Callesen, H. (1998) Open Pulled Straw (OPS) vitrification : A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*.
- Van Der Schams., Prediction of follicular development and embryo production by echography after superovulation induction. *Theriogenology*, 1988. 29(1), 321.
- \*-Wandji S.A., Fortier M.A., Siurard M.A. 1992. Differential response to gonadotropins and prostaglandins E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. *Biol. Reprod.*, 46, 1034-1041.
- 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.
- \*-Westergaard L., Callesen H., Hyttel P., 1985. Meiosis inducing substance (MIS) in bovine preovulatory follicles. *Zuchthygiene*
- Whittingham D.G., Wood M., Farrant J., Lee H., Halsey J.A., Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 °C. *J. Reprod. Fert.* 1979, 56, 11-21.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P., 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196° C and -269° C. *Science*, 178, 411-414.
- \*-Wilmot I., Rowson L.E.A., 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 1973, 92, 686-690.
- Wilson J.M., Jones A.L., Miller D.R. (1990). Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. *Theriogenology*. 33, 349.
- \*-Wolf D.P., The mammalian egg's block to polyspermy. In: *Fertilization and embryonic development in vitro*, Mastroianni, L., Biggers, B.G., Plenum Press, New York, 183-197, 1981.
- Woodruff T.K., Lyon R.J., Hansen S.E., Rice G.C. & Mather J.P. 1990. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 127: 3196-3205.

-Xiao S., Findley J.K., Robertson J.M., 1992, the effect of bovine activin and follicle stimulating hormone(FSH) suppressing protein / follistatin on FSH induced differentiation of rat granulose cells in vitro. *Mol. Cel. End.* 133: 134-139

-Yaakub H., Duffy P., O'callaghan D., Boland M.P. (1998). Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to gonadotropin treatment on superovulatory response, and on embryo yield and quality in beef heifers. *Ani. Reprod. Sci.* 52, 191-204.

-Yamamoto M., Ooe M., Fujii C., Suzuki T. (1993). Superovulation of Japanese Black heifers treated with FSH-P and FSH-R. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 133-134.

\*-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.

-Zeitoun M.M., Yassen A.M., Hassan A.A., Fathelbab A.Z., Echternkamp S.E., Wise T.H., Maurer R.R. (1991). Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and a monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology*. 35, 653-667