

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad DAHLEB de Blida -1-

Faculté des sciences Naturelles et de la vie



*Mémoire en vue de l'obtention du diplôme Master II en  
Reproduction Animale*

**Thème**

Effet du stress et des maladies  
métaboliques sur les résultats de la  
superovulation et sur la qualité  
embryonnaire et ovocytaire **chez les  
vaches laitières**

**Réalisé Par :**

**OUSAADI Lilia**

**MEMBRE DU JURY:**

**PRESIDENT** : ROUIBI ABDELHAK M.C.A SNV-BLIDA

**EXAMINATEURS:** ABDELLI AMINE M.A.A ISV-BLIDA

BESBACI MOHAMED M.A.A ISV-BLIDA

**PROMOTEUR** : KAIDI RACHID PROFESSEUR ISV- BLIDA

**CO-PROMOTEUR:** KALEM AMAR M.A.A ISV- BLIDA

Promotion 2016

## *Remerciements*

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier Pr. KAIDI Rachid pour avoir accepté d'être mon promoteur et pour le temps qu'il a consacré à la relecture de mon manuscrit.

Je tiens à exprimer ma sincère et profonde reconnaissance à Dr. Kalem pour avoir accepté d'être mon Co-promoteur dans des circonstances pas des favorables et j'aimerais lui adresser un grand merci pour sa disponibilité, son encouragement motivant, sa générosité et notamment pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées durant la réalisation de mon projet.

Mes vifs remerciements pour Dr Djilali DEGUI pour son esprit de groupe, pour sa générosité, pour sa bonne volonté , pour être toujours prêt à m' aider quand je suis amenée à faire appel à lui .Merci camarade.

Je remercie les membres du jury d'évaluation de ce mémoire Monsieur ABDELLI Amine et Monsieur BESBACI Mohamed qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps pour juger ce travail, et cela malgré leurs maintes et innombrables occupations. Je leur suis entièrement reconnaissante de l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire.

Un grand merci à mes parents pour leur support inconditionnel ; leur encouragement et d'être toujours là pour moi.

Je tiens à remercier ma sœur Mila pour ses encouragements et l'appui moral que j'ai trouvé auprès d'elle tout au long de ce travail .merci sœurlette.

Merci à mon adorable petit frère et ami « Ahmed » pour ses encouragements et sa présence toujours à mes côtés.

Je ne peux terminer sans dire merci à mon amie et sœur de cœur Khawla pour ses encouragements tout au long de ce mémoire.

Merci à khalida Abir .amina , zoulikha et saida pour leur gentillesse et leur amitié .

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents pour leur affection et leur soutien moral, pour leur tolérance, leur patience et leurs sacrifices. Que ce travail soit témoin de ma reconnaissance éternelle, de mon respect et de mon amour pour eux.*

*A mes très chères sœurs, et mon adorable frère «Ahmed» pour leurs amour et pour avoir toujours crus en moi.*

*Je le dédie en particulier à ma très chère sœur Mila qui m'a accompagné tout au long de ce travail.*

*Je le dédie à ma sœur Kahina, à son mari Bousaad et à mes deux anges « LEA et LAHNA»*

*Je le dédie à la mémoire de mes deux grandes mères allah yarhemhoum, qui ne cessent de me manquer et qui resteront à jamais dans mon cœur.*

*Je le dédie à tous mes enseignants et a tous mes camarades de la promotion master II reproduction animale 2016 en particulier à djallel ;zaki, djilali ;khalida et soraya .*

*Je le dédie à toutes les personnes qui ont continué de croire en moi malgré tout.*

## Summary:

The objective of this study is to confirm the impact of the metabolic disorders and the stress on the results of the super ovulation and embryonic and oocyte quality by the means of certain biochemical and hormonal parameters and the follow-up of the body condition scoring (BCS) before and during the ovarian stimulation protocol.

21 primiparous dairy cows belonging to a research center at Baba Ali and presenting of embryo donors performances were the subject of our study; five selected cows underwent the treatment of ovarian stimulation on natural or induced heats and by a single or repeated injection FSH.

The average **BCS** of the five selected cows recorded was of **2.83** before the treatment and **2.80** for the period that covers the embryonic transfer operation. Three cows presented a decrease of (- **0.07**), (- **0.16**) and of (- **0.44**) of the average **BCS** between the selection phase and the treatment phase. The two others have recorded an increase of (+ **0.25**) and of (+**0.17**).

A decrease and an increase of **0.25** were noted for the **BCS** of two cows out of the five studied between the evaluation before the treatment and the day of the beginning of the injections, however they remained stable for the rest of the observations. The three others have presented a **BCS** of **2.75** throughout the superovulation protocol.

Four cows out of the five selected have present normal uraemias at the beginning of treatment and of hypo-uraemias of (**0.14 g/l**), (**0.13 g/l**), (**0.18 g/l**) and of (**0.17g/l**) at the end of the protocol. The last cow recorded a hyper-uraemia of **0.9g /l** at the beginning of the treatment which dropped to **0.12 g /l** on the day of embryonic harvest.

Normal physiological rates of cholesterol have been recorded at the beginning and the end of the embryonic transfer operation for the whole cows except one for which an above normal value (**1.91g/l**) was noted at the beginning of the treatment.

Ditto for albumin, of the normal physiological rates at the beginning and the end of the protocol were recorded except for the value **26.3g/l** observed at the beginning of the treatment. The five cows presented normal protéinémias.

Hypoglycemias of (**0.51g/l**), (**0.54g/l**) and of (**0.45g/l**) was recorded before the beginning of the treatment. Hyperglycemias of (**0.79g/l**), (**0.74g/l**) and (**1.01g/l**), hypoglycemias of **0.54 g/l**, **0.44g/l** and **0.36g/l** but also a normal value of **0.6g/l** were recorded during the treatment.

On a group scale, one recorded an average rate of the Beta-Hydroxy-Butyrate (**BHB**) de**1.23 mmol/l** and on the individual level, of the rates of **0.7mmol/l**, **0.8 mmol/l** and de **2.2 mmol/l** before the treatment and of the rates of **0.4mmol/l**, **0.8mmol/l**, **0.2mmol/l**, **0.3mmol/l** and **1.13mmol/l** during the protocol.

The average rate of the Non-Esterified Fatty acids ( **NEFA**) was of **0.7mmol/l** before the treatment; of **0.86mmol/l** the day of the beginning of the injections and **1.36mmol/l** the day of the IA and **1.29mmol/l** the day of embryonic harvest. High rates were raised; **0.86 mmol/** before the treatment, **1.31 mmol /l** , **1.40 mmol/l** at the beginning of the injections, **2.92mmol/l** and **1.06 mmol/l** the day of the IA and **1.03mmol/l** , **1.55mmol/l** et **1.28mmol/l** the day of embryonic harvest.

Before the treatment, only one cow presented a hyper-cortisolemia of **8.85 ng/ml** contrary to the day of harvest where all the cows were in hyper-cortisolemia with concentrations of **9.35ng/ml**, **9.25ng/ml**, **8.77ng/ml**, **12.27 ng /l** and of **6.45ng/ml**.

**50** yellow bodies, **08** not fertilized oocytes, of the ovarian cysts and only one degenerated embryo are the result of the treatment of superovulation which one carried out. Parallely to this result, a case of hepatic Steatosis, ketosis of the type I, acidosis, a cervicite and situations of stress were diagnosed.

**Key words:** Embryonic transfer, embryonic quality, oocyte quality, super ovulation, stresses, diseases metabolic, energy deficit, BHB, BCS, Cortisol.

## Résumé :

L'objectif de cette étude est de confirmer l'impact des troubles métaboliques et du stress sur les résultats de la super ovulation et sur la qualité embryonnaire et ovocytaire, par le biais de certains paramètres biochimiques et hormonaux et le suivi de la note de l'état corporel (NEC) avant et pendant le protocole de stimulation ovarienne.

21 vaches laitières primipares appartenant à un centre de recherche à Baba Ali et présentant des performances de donneuses d'embryons ont fait l'objet de notre étude ; cinq vaches sélectionnées ont subi le traitement de stimulation ovarienne sur chaleurs naturelles ou induites et par une injection unique ou répétée de FSH.

La NEC moyenne des cinq vaches sélectionnées enregistrée était de **2.83** avant le traitement et de **2.80** pour la période qui couvre l'opération du transfert embryonnaire. Trois vaches ont présenté une diminution de **(-0.07)**, **(-0.16)** et de **(-0.44)** de la NEC moyenne entre la phase de sélection et la phase du traitement .Les deux autres ont enregistré une augmentation de **(+ 0.25)** et de **(+0.17)**.

Une diminution et une augmentation de **0.25** ont été relevées pour la NEC de deux vaches sur les cinq étudiées entre l'évaluation avant le traitement et le jour du début des injections, cependant elles sont restées stables pour le reste des observations .Les trois autres ont présenté une NEC de **2.75** tout au long du protocole de super ovulation.

Quatre vaches sur les cinq sélectionnées ont présenté des urémies normales en début de traitement et des hypo-urémies de **(0.14 g/l)** ,**(0.13 g/l)** , **( 0.18 g/l )** et de **(0.17g/l )** à la fin du protocole .La dernière vache a enregistré une hyper-urémie de **0.9g /l** au début du traitement qui a chuté à **0.12 g /l** le jour de la récolte embryonnaire .

On a enregistré des taux physiologiques normaux du cholestérol au début et à la fin de l'opération du transfert embryonnaire pour l'ensemble des vaches à l'exception d'une seule pour laquelle on a noté une valeur au-dessus de la normale ( **1.91g/l** ) au début du traitement.

Idem pour l'albumine, des taux physiologiques normaux au début et à la fin du protocole ont été enregistrés sauf pour la valeur **26.3g/l** observée au début du traitement. Les cinq vaches ont présenté des protéinémies normales.

On a relevé des hypoglycémies de **(0.51g/l)**, **(0.54g/l)** et de **(0.45g/l)** avant le début du traitement. Des hyperglycémies de **(0.79g/l)**, **(0.74g/l)** et **(1.01g/l)**, des hypoglycémies de **0.54 g/l** et **0.44g/l** et de **0.36g/l** mais aussi une valeur normale de **0.6g/l** étaient relevées au cours du traitement.

A l'échelle du groupe, on a enregistré un taux moyen du Beta-Hydroxy-Butyrate ( **BHB** ) de **1.23 mmol/l** et sur le plan individuel des taux de **0.7mmol/l** , **0.8 mmol/l** et de **2.2 mmol/l** avant le traitement et des taux de **0.4mmol/l** , **0.8mmol/l**, **0.2mmol/l** , **0.3mmol/l** et de **1.13mmol/l** au cours du protocole.

Le taux moyen des Acides Gras Non Esterifiés (AGNE) était de **0.7mmol/l** avant le traitement ; de **0.86mmol/l** le jour de l'entame des injections et **1.36mmol/l** le jour de l'IA et de **1.29mmol/l** le jour de la récolte embryonnaire. Des taux élevés ont été relevés ; **0.86 mmol/l** avant le traitement ,**1.31 mmol /l** , **1.40 mmol/l** à l'entame des injections, **2.92mmol/l** et **1.06 mmol/l** le jour de l'IA et **1.03mmol/l** , **1.55mmol/l** et **1.28mmol/l** le jour de la récolte embryonnaire.

Avant le traitement, Une seule vache a présenté une hyper-cortisolémie de **8.85 ng/ml** contrairement au jour de la récolte où toutes les vaches étaient en hyper-cortisolémie avec des concentrations de **9.35ng/ml** et **9.25ng/ml** ,**8.77ng/ml**, **12.27ng/l** et de **6.45ng/ml**.

**50** corps jaunes, **08** ovocytes non fécondés, des kystes ovariens et un seul embryon dégénéré sont le résultat du traitement de superovulation que l'on a menée. Parallèlement à ce résultat ,un cas de Stéatose hépatique , de cétose du type I , d'acidose , une cervicite et des situations de stress étaient diagnostiqués .

**Mots clés :** Transfert embryonnaire, qualité embryonnaire, qualité ovocytaire, super ovulation, stress, maladies métaboliques, déficit énergétique, BHB, NEC, Cortisol.

## ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو التأكيد على تأثير الاضطرابات الأيضية والضغط على نتائج الإباضة المفرطة وجودة الجنين والبويضة، من خلال بعض القياسات البيوكيميائية والهرمونية ورصد قيمة الحالة الجسدية (NEC) قبل وأثناء تنشيط المبيض.

21 من العجول الحلوب ولادة ينتمون إلى مركز بحث في بابا علي وذات ميزات الايقار المانحة للأجنة كانت موضوع دراستنا. خمس ايقار مختارة خضعت لعلاج تنشيط المبيض وفق شبق طبيعي او محفز وبواسطة حقنة واحدة أو متكررة من FSH

القيمة المتوسطة للحالة الجسدية للأيقار الخمس المختارة المسجلة قبل العلاج هي 2.83 و 2.80 للفترة التي تغطي عملية نقل الاجنة. أظهرت ثلاث ايقار انخفاض (-0.07) (-0.16) و (-0.44) من متوسط NEC بين مرحلة الاختيار ومرحلة العلاج. الاثنان المتبقيتان سجلتا زيادة (+0.25) و (+0.17).

تم تسجيل انخفاض وزيادة قدرها 0.25 ل NEC من طرف بقرتين من الخمسة قبل العلاج ويوم بدء الحقن ومع ذلك، فإنها ظلت مستقرة لبقية الملاحظات. الثلاثة الأخرى أظهرت NEC بقيمة 2.75 اثناء كل بروتوكول الإباضة.

وقد قدمت أربع بقرات على خمسة يوريميا طبيعية في بداية العلاج وقصور اليوريميا من (0.14 جم / لتر) (0.13 غرام / لتر) (0.18 غرام / لتر) و (0.17 غرام / لتر) في نهاية البروتوكول. البقرة السابقة الذكر سجلت فرط يوريميا من 0.9 غرام / لتر عند بداية العلاج الذي انخفض إلى 0.12 غرام / لتر يوم حصاد الأجنة.

سجلت مستويات فسيولوجية طبيعية من الكوليسترول في بداية ونهاية عملية نقل الأجنة لجميع الأبقار إلا بقرة واحدة سجلت قيمة فوق المعدل الطبيعي (1.91 g / لتر) في بداية العلاج.

ذات الشيء بالنسبة للزلال، فقد سجلت مستويات فسيولوجية طبيعية في بداية ونهاية بروتوكول باستثناء قيمة 26.3 غرام / لتر لوحظت في بداية العلاج. سجلت هذه الأبقار الخمس مستويات فسيولوجية طبيعية من البروتين.

لوحظ نقص سكر الدم في (0.51 غرام / لتر)، (0.54 غرام / لتر) و (0.45 غرام / لتر) قبل بدء العلاج. ارتفاع السكر في الدم (0.79 غرام / لتر)، (0.74 غرام / لتر) و (1.01 غرام / لتر)، نقص السكر في الدم 0.54 غرام / لتر و 0.44 غرام / لتر و 0.36 غرام / لتر ولكن أيضا قيمة طبيعية 0.6 غرام / لتر لوحظت خلال فترة العلاج.

على مستوى المجموعة، سجل لبيتا هيدروكسي الزبدات (BHB) معدل 1.23 مليمول / لتر ومعدل الفرد 0.7 مليمول / لتر، 0.8 مليمول / لتر و 2.2 مليمول / لتر قبل العلاج ومعدل 0.4 مليمول / لتر، 0.8 مليمول / لتر، 0.2 مليمول / لتر، 0.3 مليمول / لتر و 1.13 مليمول / لتر اثناء العلاج.

كان متوسط معدل الأحماض الدهنية الغير مأسطرة (AGNE) قبل العلاج 0.7 مليمول / لتر؛ و 0.86 مليمول / لتر يوم بداية الحقن و 1.36 مليمول / لتر في يوم عملية التلقيح الاصطناعي و 1.29 مليمول / لتر في يوم حصاد الاجنة. سجلت معدلات عالية؛ 0.86 مليمول / لتر قبل العلاج، 1.31 مليمول / لتر، 1.40 مليمول / لتر عند بداية العلاج و 2.92 مليمول / لتر و 1.06 مليمول / لتر يوم عملية التلقيح الاصطناعي و 1.03 مليمول / لتر، 1.55 مليمول / لتر و 1.28 مليمول / لتر يوم حصاد الاجنة.

قبل العلاج، بقرة واحدة سجلت ارتفاع في مستوى الكورتيزول (8.85 نانو غرام / مل) في المقابل يوم حصاد الاجنة سجلت لجميع الأبقار تركيزات عالية 9.35 نانو غرام / مل، 9.25 نانو غرام / مل، 8.77 نانو غرام / مل، 12.27 نانو غرام / لتر و 6.45 نانو غرام / مل.

50 جسم اصفر، 08 بويضات غير مخصبة، كيسات المبيض و جنين واحد ذونوعية سيئة هي نتائج العلاج فرط الإباضة الذي قمنا به في هذه الدراسة. بالتوازي مع هذه النتائج، تم تشخيص حالة مرض الكبد الدهني، حالة التخلون من النوع الاول، الحمض، التهاب عنق الرحم والمواقف العصبية.

**كلمات البحث:** نقل الأجنة، نوعية الجنين، جودة البويضة، الإباضة المفرطة، الإجهاد العصبي، الأمراض الاستقلابية، العجز في الطاقة، BHB، NEC، الكورتيزول.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## **PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE I : BIOTECHNOLOGIE DE LA PRODUCTION DES EMBRYONS BOVINS IN VIVO**

Introduction .....	2
I.1. Transfert embryonnaire .....	3
I.2. Production des embryons in vivo .....	4
I.2.1. Choix de la donneuse .....	4
I.2.2. La super ovulation .....	5
I.2.3. Fécondation .....	8
I.2.4. La récolte embryonnaire: .....	8
I.2.5. Conservation des embryons produits in vivo .....	9
I.2.6. Choix des receveuses: .....	10
I.3. Les limite de la production d'embryons in vivo .....	11

### **CHAPITRE II : QUALITE OVOCYTAIRE ET EMBRYONNAIRE**

II.1. L'ovocyte .....	12
II.1.1. Origine .....	12
II.1.2. Croissance ovocytaire et folliculogenèse .....	12
II.1.3. Compétence de l'ovocyte .....	16
II.1.4. Maturation ovocytaire .....	17
II.1.5. La qualité ovocytaire .....	21
II.1.5.a. Caractéristiques morphologique de la qualité ovocytaire .....	22
II.1.5.b. Facteurs de variation de la qualité ovocytaire .....	25
II.2. EMBRYON .....	30
II.2.a. La fécondation .....	30

II.2.b. Développement préimplantatoire. ....	31
II.2.c. La qualité embryonnaire .....	36
II.2.d. Evaluation de la qualité embryonnaire .....	38

### **CHAPITRE III : FACTEURS DE RISQUE**

III. 1.Le stress. ....	42
III.1.1Définition .....	42
III.1.2.Origine et types du stress .....	43
III.1.3.Marqueurs de stress .....	44
III.1.3.1. Les marqueurs comportementaux du stress.....	44
III.1.3.2.Marqueurs biologiques.....	45
III.1.3.3. Les marqueurs biochimiques .....	47
III.1.4. Effet du stress sur la reproduction .....	49
III.2. Maladies métaboliques .....	50
III.2.1.Introduction.....	50
III.2.2Maladies liées au métabolisme des minéraux .....	50
III.2.2.a. Hypocalcémie .....	50
III.2.2.b. Hypomagnésiémie.....	51
III.2.2.c. L'hypokaliémie.....	52
III.2.3.Principales maladies liées au métabolisme des protéines .....	52
III.2.3.a. Alcalose .....	52
III.2.4.Principales maladies liées au métabolisme énergétique .....	52
III.2.4.a. Acidose .....	52
III.2.4.b. Cétose .....	53
III.2.4.b 1.Cétose de type I .....	53
III.2.4.b2. Cétose de type II (Stéatose).....	55
III.2.4.c. Impact sur la reproduction .....	56



## **PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>I. A. CADRE D'ETUDE</b> .....	57
I.A.1.Organisme.....	57
I.A.2.Situation géographique .....	57
<b>I.B. METHODOLOGIE D'APPROCHE</b> .....	58

### **II. MATERIEL ET METHODES**

II.1.Materiel.....	59
II.1.a.Matériel biologique .....	59
II.I.b.Matériel non biologique .....	59
<b>II.2.METHODES</b>	
II.2.1.Choix des animaux .....	60
II.2.2.Evaluation des profils biochimiques et hormonaux .....	61
II.2.3.Traitement de superovulation .....	61
II.2.4.La récolte et la recherche embryonnaire .....	64

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.I. Résultats</b>	
Note de l'Etat Corporel : NEC.....	66
Paramètres biochimiques .....	67
Paramètres hormonaux .....	73
Resultat de la superovulation et de la recolte embryonnaire .....	75
<b>III.2.Discussion</b> .....	76

<b>IV. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS</b> .....	81
--	----

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNEXES**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Protocole de superovulation N°1 .....	61
<b>Tableau 2</b> : Protocole de superovulation N°2.....	63
<b>Tableau 3</b> : Evaluation des NEC des 5 vaches super-ovulées.....	66
<b>Tableau 4</b> :Taux de glucose durant la période de l'opération du transfert embryonnaire.....	69
<b>Tableau 5</b> : Taux de BHB durant la période de l'opération du transfert embryonnaire.....	71
<b>Tableau 6</b> : Taux des AGNE durant la période de l'opération du transfert embryonnaire.....	72
<b>Tableau 7</b> : Resultats du traitement de superovulation et de la recolte embryonnaire.....	75

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Schéma de traitement de super ovulation par PMSG .....	7
<b>Figure 02</b> : Schéma de traitement de super ovulation par FSH – p.....	8
<b>Figure 03</b> : Représentation schématique des différents stades de croissance des follicules...16	
<b>Figure 04</b> : vacuoles ovocytaires.....	23
<b>Figure 05</b> : Fuseau méiotique chez l'ovocyte humain vivant en métaphase II avec le Polscope piste avant l'ICSI.....	24
<b>Figure 06</b> : Configuration de la chromatine chez la souris.....	24
<b>Figure 07</b> : le blastocyste est composé d'une masse cellulaire interne et d'une couche de cellules trophoblastiques extérieure.....	33
<b>Figure 08</b> : Progression des premiers stades embryonnaires précoces.....	34
<b>Figure 09</b> : Développement précoce jusqu'au stade 8 cellules d'un embryon top qualité ....	38
<b>Figure 10</b> : fragmentation des membranes cellulaires des embryons.....	39
<b>Figure 11</b> : De l'équilibre (homéostasie) au stress.....	43
<b>Figure12</b> : situation géographique de la ferme CNIAAG, Baba Ali. Alger .....	57
<b>Figure 13</b> : Méthodologie d'approche .....	58
<b>Figure 14</b> : Scores corporels décrits par Edmonson 1989.....	60
<b>Figure 15</b> : Digramme de superovulation du Protocole N° 1 sur chaleur naturelles.....	62
<b>Figure 16</b> : Diagramme de superovulation du protocole 1 sur chaleurs induites.....	62
<b>Figure 17</b> : Diagramme du protocole N° 2.....	63
<b>Figure 18</b> : Etapes de la récolte embryonnaires.....	64
<b>Figure 19</b> ; Différents stades du développement embryonnaire.....	65
<b>Figure 20</b> : Evolution de BCS dans le troupeau.....	66
<b>Figure 21</b> : Variation des moyennes de la glycémie, cholestérolémie et Urémie entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.....	67
<b>Figure 22</b> : Variation des taux de l'urée et du cholestérol pour les vaches super ovulées.....	68

<b>Figure 23 :</b> Variation des moyennes de la protéinémie et de l'albumine entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.....	69
<b>Figure 24 :</b> Variation des taux de protéinémie et de l'albumine entre J0 et J11 pour les vaches super-ovulées.....	70
<b>Figure 25 :</b> Taux du BHB pour l'ensemble des vaches étudiées.....	71
<b>Figure 26 :</b> Variation du taux du Cortisol entre J0et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.....	73
<b>Figure 27 :</b> Taux de cortisol avant le traitement et le jour de la récolte.....	74
<b>Figure 28:</b> Variation du taux de progestérone entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.....	74

# Glossaire :

**Affections podales** : Pododermatite, piétin du bétail, fourbure.

**Apathie** : Apathie désigne une absence d'énergie, incapacité à réagir, mollesse. La personne atteinte d'apathie se montre généralement indifférente à l'émotion, la passion, la motivation.

**Atonie ruminale** : Relâchement, faiblesse ou diminution de la tonicité normale du rumen.

**Calcitonine** : Hormone polypeptidique sécrétée par la thyroïde, qui facilite la fixation du calcium sur le tissu osseux, diminuant le taux de calcium dans le sang.

**Coasting** : Suspension d'une hormone (la gonadotrophine) avant l'ovulation.

**Congélation lente** : équilibration progressive entre des concentrations relativement faibles de cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de la cellule et un refroidissement très progressif (0.3°C/min) jusqu'à une température d'au moins - 30°.

**Epizootie** : Maladie contagieuse qui affecte un grand nombre d'animaux à la fois

**Éthogramme** : inventaire descriptif de tous les comportements d'une espèce animale particulière.

**Fièvre vitulaire** : Maladie métabolique, forme d'éclampsie. Elle survient généralement chez des vaches fortes productrices ayant déjà mis bas au moins deux fois.

**Fourbure** : Maladie chronique ou inflammation d'une partie du pied des animaux dotés de sabots .

**Le sexage** : Technique développée parallèlement au transfert d'embryons chez les bovins, consiste à étudier les chromosomes sexuels. Le sexage peut être réalisé sur environ 60% des blastocystes éclos mais l'inconvénient de ce procédé est qu'actuellement les embryons ne peuvent pas être stockés qu'après le sexage.

**Maladies intercurrentes** : Maladies qui surviennent dans le cours d'une autre maladie.

**Métrites** : Affection inflammatoire de l'utérus.

**Opiïdes endogènes** : Toute substance morphinomimétique sécrétée par certaines structures cérébrales et dont le type est l'endomorphine. Qui possède des effets semblables à ceux de l'opium.

**Parathormone** : Hormone polypeptidique hypercalcémiant sécrétée par les glandes parathyroïdes, qui régule l'équilibre phosphocalcique de l'organisme. Son action concerne : l'os (résorption), le rein (diminution de la calciurie), l'intestin (augmentation de l'absorption calcique). Elle est antagoniste de la calcitonine. Abréviation : PTH.

**Rétention placentaire** : Rétention dans la muqueuse utérine, après la délivrance, de villosités placentaires pouvant empêcher l'involution physiologique de l'utérus et entraîner des métrorragies.

**Stéréotypies** : Répétition continuelle de mots, de gestes, de tics, etc., observée au cours de certaines maladies du système nerveux.

**Testage sur descendance** : Contrôle de descendance (progeny-test), méthode de sélection des animaux domestiques appliquée aux reproducteurs mâles.

**Tympanisme ruminal** : Augmentation pathologique de la sonorité du rumen.

**Vitrification** : Procédé de congélation ultra rapide qui, contrairement à la congélation conventionnelle, offre l'avantage d'éviter la formation de cristaux à l'intérieur de l'embryon ou de l'ovocyte.

**$\beta$ -endorphines** : Neuropeptide endogène d'opioïde trouvé dans les neurones du système nerveux central et périphérique.

## INTRODUCTION

Le transfert embryonnaire est une technique de reproduction assistée fréquemment utilisée dans l'élevage de bovins laitiers et de boucheries sur des animaux possédant une conformation et un rendement supérieurs à leurs congénères. Cette technique contribue à l'intensification de l'amélioration génétique du cheptel bovin,

Cependant beaucoup de difficultés sont rencontrées ; la variabilité des résultats en relation avec la réponse des donneuses aux traitements de superovulation, les échecs d'implantation des embryons et la synchronisation des cycles des receveuses avec l'âge des embryons à transplanter.

Selon Monniaux et al, 2010, Thatcher et al, 2001 et Hasler, 2006, l'un des facteurs limitants de la réussite du programme de transfert embryonnaire chez la vache est la variation importante du nombre et de la qualité d'embryons obtenus après traitement de superovulation.

Des facteurs intrinsèques et extrinsèques à la donneuse d'ovocytes tels que les aspects biochimiques, hormonaux et nutritionnels ont été rapportés par Kendrick *et al.* 1999 comme étant à l'origine des fluctuations des résultats. [36]

De leur côté, Bouissou et Boissy ; 2005, ont considéré que l'évolution des systèmes d'élevage constitue en partie une source de stress susceptible de porter atteinte au bien être de l'animal et à ses fonctions biologiques à moyen terme. [58]

Le traitement de superovulation est constitué d'injections répétées d'une hormone que la vache sécrète déjà naturellement, la FSH (Follicule Stimulating Hormone). Une pratique qui peut engendrer des situations de stress chez la vache. Les chercheurs essaient de mettre en place un protocole assurant une bonne réponse au traitement de superovulation en nombre et en qualité tout en diminuant la manipulation des vaches.

Dans notre étude effectuée au niveau d'un centre de recherche à Baba Ali, on va s'intéresser à l'effet du stress et des maladies métaboliques (troubles nutritionnels) ; susceptibles de changer le microenvironnement de l'ovocyte et de l'embryon ; sur les résultats de la superovulation en nombre et en qualité embryonnaire et ovocytaire.

## I. Biotechnologie de la production des embryons bovins *in vivo* :

La baisse de la fertilité des vaches de haute qualité génétique a poussé la recherche à trouver des alternatives de sélection génétique afin de résoudre cette problématique. L'utilisation des techniques de reproduction assistée est la plus populaire chez les producteurs laitiers. [62]

Au cours des dernières années, les technologies comme le transfert des embryons, la production embryonnaire *in vitro* et la cryo-préservation embryonnaire se sont développées pour améliorer l'efficacité des programmes de sélection génétique et les résultats de l'insémination artificielle. [62] [36]

Les biotechnologies de l'embryon sont l'ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l'embryon [79] [78]. Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80, d'abord dans l'espèce bovine où la reproduction des animaux était, depuis déjà trente ans, largement organisée autour de l'insémination artificielle. Aujourd'hui elles sont également de plus en plus largement appliquées dans d'autres espèces telles la brebis, la chèvre et la jument. [79]

Il est classique de distinguer trois générations de biotechnologies de l'embryon. La première génération a permis de produire des embryons *in utero* après stimulation hormonale des femelles donneuses (super ovulation). Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation. [79][14][78]

La deuxième génération s'appuie sur la production d'embryons en culture, après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant ou après abattage (FIVETE : Fécondation *in vitro* et transfert d'embryons, OPU : Ovum Pick Up). [79][14][36][78]

Les progrès des connaissances sur la physiologie de l'embryon de mammifères permettent maintenant l'émergence d'une troisième génération de techniques. Celles-ci tirent parti de l'extraordinaire plasticité des premiers stades de l'embryogenèse et visent à modifier encore plus en avant les caractéristiques de l'embryon ; le transfert nucléaire et la transgénèse en sont les illustrations. A ces techniques viennent s'ajouter le sexage de l'embryon et l'ICSI (Intra Cytoplasmic Spermatozoa Injection). [79][14][78]

Dans l'espèce bovine, le transfert embryonnaire est un outil de choix pour l'accélération du progrès génétique et sa diffusion nationale et internationale. Il participe aussi à la préservation des ressources génétiques existantes grâce au stockage des embryons dans des cryobanques. [27]



### I.1. Transfert embryonnaire :

La transplantation embryonnaire est une méthode de reproduction artificielle qui consiste à placer un tout jeune embryon d'une origine génétique donnée dans l'utérus d'une autre femelle appelée porteuse ou receveuse. Celle-ci assure la gestation jusqu'à son terme. [44]

Les embryons peuvent être obtenus soit *in vivo* après superovulation de la femelle donneuse, soit *in vitro* après fécondation in vitro (F.I.V). [44]

Cette technologie a pu voir le jour grâce aux connaissances accumulées sur la physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, notamment à partir des progrès décisifs obtenus avec le contrôle hormonal de la croissance folliculaire et celui du moment de l'ovulation. [79]

C'est en 1951 que le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse est né. [79][78][14]

La technique de transfert embryonnaire augmente le nombre de produits des femelles d'élite (possédant une conformation et un rendement supérieurs à leurs congénères) par superovulation, puis transfert à l'état frais des embryons chez des receveuses. Cette technique a été vite utilisée dans les programmes de sélection en substitution de l'IA pour produire les futurs reproducteurs. [14] [27]

Le transfert d'embryons, qui s'est d'abord développé par transposition des méthodes chirurgicales (toutes espèces) proposées par la recherche vétérinaire, n'est véritablement devenu une pratique d'élevage qu'avec la mise au point d'une méthode de transplantation adaptée de l'insémination artificielle, consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus, par voie cervicale (bovins, équins). [86][79][14][88]

Des techniques ont été développées pour accroître l'efficacité et la rentabilité du transfert d'embryons, notamment la cryoconservation, le sexage, les micromanipulations la micro-injection et la fécondation in vitro. [88][14]

Les intérêts de la transplantation embryonnaire sont multiples : [44]

➤ Sur le plan génétique :

Elle permet la multiplication du nombre de descendants des femelles d'élite (mères taureaux). [44][12]

Elle contribue au progrès génétiques annuels par l'augmentation de l'intensité de sélection, la réduction de l'intervalle de génération et une meilleure précision de l'estimation de la valeur génétique des mères, par la connaissance d'un plus grand nombre de filles. [44] [12]

➤ Sur le plan commercial : [44]

La transplantation embryonnaire permet des reconversions rapides dans un contexte économique donné. Elle rend par exemple possible la production de vaux charolais par des vaches laitières Holstein. [44]

Le commerce international d'embryons (à l'état congelé) est également possible.

Enfin, elle permet une meilleure adaptation du veau à l'environnement du pays importateur grâce à la protection apportée par les anticorps de la porteuse pendant la période périnatale. [44]

➤ Sur le plan sanitaire :

La transplantation embryonnaire permet la sauvegarde du patrimoine génétique en cas d'épizootie et une meilleure sécurité sanitaire pour l'échange de génétique entre troupeaux, sous forme d'embryons sans introduction d'animaux vivants (ex : élevages porcins intensifs). [44] [12]

Actuellement, plus de 98 % des embryons transférables sont produits *in vivo* dans le cadre des programmes *multiple ovulation and embryo transfer* (MOET). [27]

## I.2. Production des embryons in vivo :

Chez les bovins, on administre généralement à la femelle donneuse à haut potentiel génétique des hormones pour accroître sa ponte ovulaire (superovulation) et donc sa production d'embryons par rapport au nombre qu'elle pourrait produire dans les conditions naturelles. [88][27]

L'insémination artificielle (I.A) avec le sperme d'un taureau sélectionné assure la fécondation et les embryons pourront être récupérés aisément lorsqu'ils auront migrés dans l'utérus vers le 7<sup>ème</sup> jour, à l'aide d'une sonde de collecte, par rinçages successifs des deux cornes utérines avec une solution physiologique stérile. [44]

Une sélection morphologique au microscope des embryons récoltés est réalisée pour écarter les œufs non fécondés ou en voie de dégénérescence et garder les embryons normalement développés (blastocystes à 7 jours) aptes à être transplantés ou congelés. [44]

Chaque embryon est placé dans l'utérus d'une receveuse synchronisée (transfert en frais quand la conservation de l'embryon est limitée à quelques heures). La tolérance entre l'âge de l'embryon et le cycle de la receveuse est de plus ou moins 12 heures. [44]

Environ 500 000 embryons sont ainsi produits annuellement dans le monde et plus de 90 % des futurs taureaux reproducteurs soumis au testage sur descendance pour les schémas de sélection génétique sont issus de transfert embryonnaire. [27][44]

### I.2.1. Choix de la donneuse :

Il se fait sur des exigences physiologiques et sanitaires en vue d'optimiser les conditions de la réussite du traitement superovulatoire et de la fécondation. [12]

Habituellement, l'éleveur choisit une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse (Valeur génétique). [79][12]

Commémoratifs cliniques et pathologiques. [80]

Il convient d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité. [79]

Il est indispensable d'identifier la présence éventuelle de lésions du tractus génital (métrites, salpingites, kystes). [79][80]

Pas d'antécédents de complications puerpérales ou du post-partum telles qu'une rétention placentaire, une infection utérine, une fièvre vitulaire ou de l'acétonémie. [79]

Elle aura accouché depuis 60 voire 90 jours au moins et sera en phase de bilan énergétique positif. [79][80]

Elle aura manifesté deux ou trois chaleurs à intervalles réguliers. [79][80]

A l'exploration manuelle, le col et les cornes utérines doivent être de diamètre normal (< 5 cm). [79]

Présence d'un corps jaune sur l'ovaire. [79]

L'examen vaginal au moyen d'un spéculum éliminera la possibilité d'une infection utérine. [79]

Certains examens complémentaires (tests de perméabilité tubaire, examen échographique) seront le cas échéant effectués. [79]

Les traitements antiparasitaires et vaccinations auront été effectués 30 jours au moins avant le traitement de superovulation. [79] [80]

### **I.2.2.La superovulation [79]**

La superovulation est la première étape du processus de production d'embryons. C'est un traitement à base d'hormones gonadotropes exogènes capables de stimuler la croissance, la maturation et l'ovulation de nombreux follicules en inhibant l'atresie des follicules dominés et en favorisant le développement de follicules plus jeunes. [25][27]

L'objectif des traitements de superovulation est d'augmenter, dans des conditions contrôlées, le taux naturel d'ovulations. Ceci est afin de produire, au cours d'un même cycle, après fécondation *in vivo*, plusieurs embryons, qui seront ensuite collectés à J7 après fécondation.

#### **➤ Les traitements de superovulation :**

##### **❖ La gonadolibérine (GnRH) : [79]**

La GnRH s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation. Cependant, elle peut être utilisée en association à d'autres schémas de stimulation ovarienne.

Certains échecs d'ovulation et de fécondation chez les animaux donneurs d'embryons ont été imputés à une absence de libération ou à une libération anormale de l'hormone LH lors de l'œstrus suivant un traitement de superovulation à base de PMSG. [79]

Certains auteurs observent un effet bénéfique de l'injection de GnRH après un traitement de superovulation à base de PMSG ou de FSH p, d'autres au contraire remettent en question l'opportunité d'un tel traitement, constatant même dans certains cas un effet négatif de la GnRH sur le pourcentage d'ovocytes fécondés et d'embryons transférables. [79]

**❖ La Pregnant Mare Serum Gonadotrophin PMSG : [79]**

La PMSG est une hormone gonadotrope, de nature protéique extraite du sérum de jument gravide entre le 42ème et le 100ème jour de gestation possède une double activité à la fois de type FSH et LH avec un rapport constant FSH/LH égal à 0.2. Ce rapport dépend du stade de gestation de la jument. [79] [12]

Sa persistance métabolique permet de procéder à une seule injection par voie intramusculaire (IM) et dont la dose est comprise entre 2.000 et 3.000 UI. [79] [12]

Il est indispensable de lui adjoindre une injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG au moment des chaleurs pour inhiber l'action excessive de la PMSG et pour éviter la formation de follicules kystiques. [79][12]

La PMSG à une demi-vie particulièrement longue (120 heures) imputable à sa richesse en acide sialique (13 %) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale .Sa concentration est maximale dans l'organisme 15 à 32 heures après son injection. [79]

La réponse au traitement augmente avec la dose injectée mais également il y a augmentation du risque d'anovulations et d'obtention d'embryons de moins bonne qualité. [79]

La répétition des injections de PMSG à un, voire deux mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné la réaction antigénique possible. [79]

**❖ La Human Menopausal Gonadotrophin : [79]**

L'hMG (Human Menopausal Gonadotrophin) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé. [79]

**❖ Les extraits hypophysaires : [79]**

Les extraits hypophysaires (d'origine porcine le plus souvent, FSHp, mais aussi bovine, bFSH, ou ovine sachant que la FSH bovine est moins active que la FSH porcine) sont de plus en plus largement utilisés. [79]

La FSH est de nature glycoprotéique, se trouve caractérisée par une durée de demi-vie très courte de l'ordre de 5 ou 6 heures étant donné leur moindre richesse en acide sialique (5 %), ce qui nécessite des injections répétées pour obtenir une stimulation efficace (généralement 2 injections quotidiennes pendant 4 jours). Leur concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et ne sont plus décelables 12 heures après. [12][79]

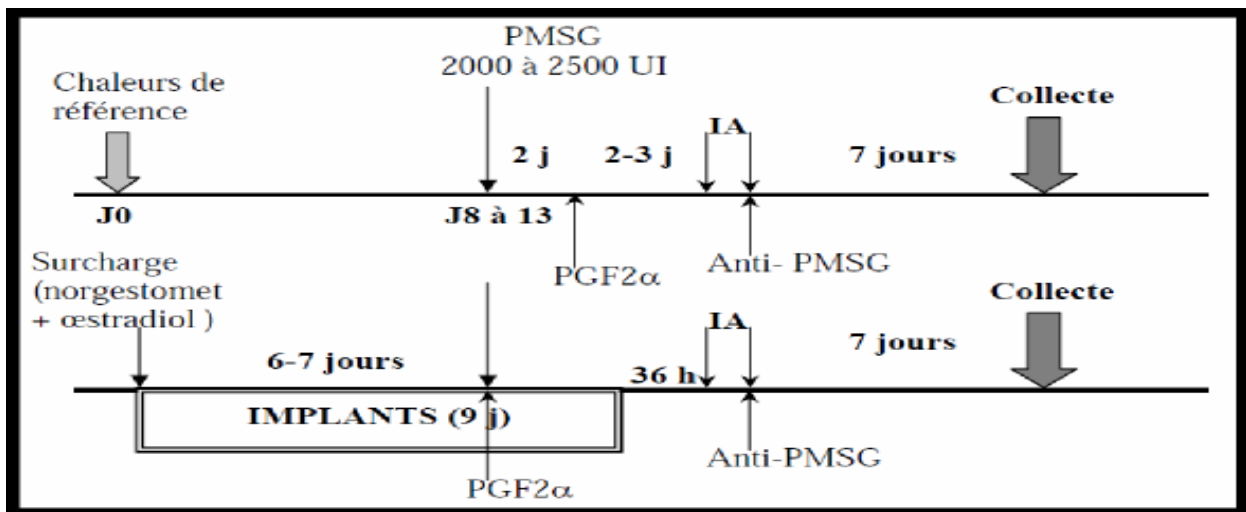
Leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la PMSG. [79]

➤ **Protocole :**

La connaissance de la folliculogénèse et du déterminisme de l'ovulation a été mis à profit en association avec les techniques de maîtrise des cycles sexuels, pour induire la ponte de plusieurs ovules par une vache sélectionnée comme donneuse pour ses qualités génétiques. [44]

La plupart du temps la stimulation de l'ovaire débute en phase lutéale, entre le 8ème et le 12ème jour du cycle (J0=œstrus), ceci afin de se situer au moment du démarrage d'une vague de croissance folliculaire. L'utilisation d'implant de progestagènes permet de réaliser des superovulations sur des vaches sans avoir besoin de repérer les chaleurs de référence (difficile à prévoir d'une manière exacte). Une « surcharge » est alors injectée le jour de la pose de l'implant. Cette surcharge est constituée de GnRH. [27] [12]

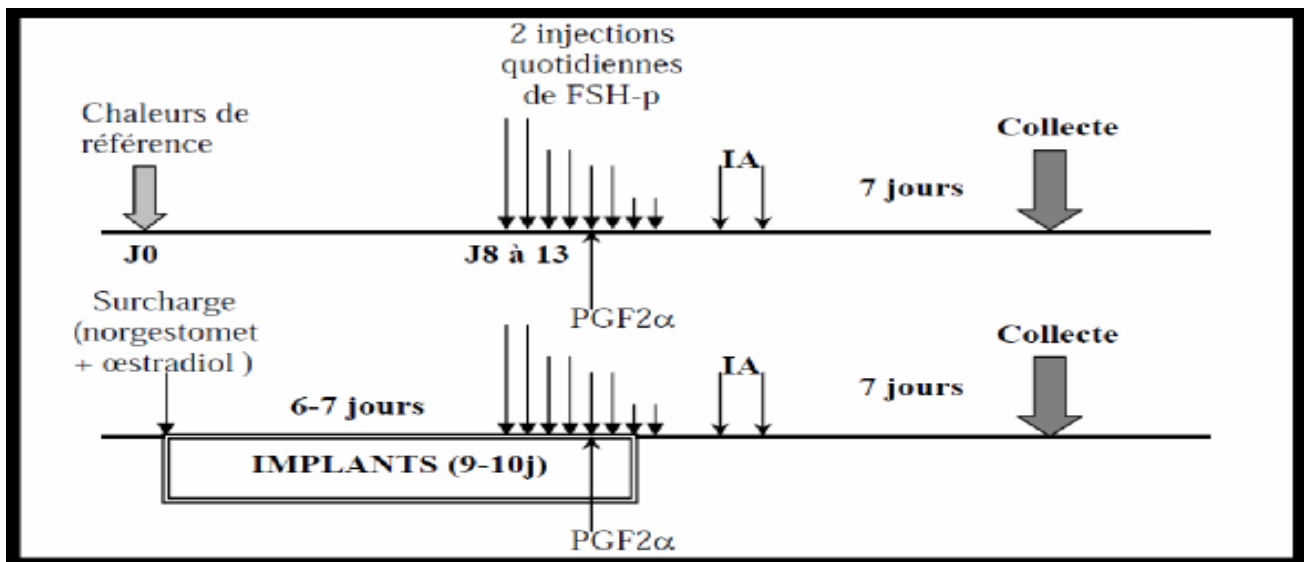
La stimulation de la croissance folliculaire est suivie de la lutéolyse par l'injection de prostaglandine, qui déclenche la venue en chaleur et les ovulations multiples chez les donneuses. [44][12]



**Figure 01 :** Schéma de traitement de superovulation par PMSG (en phase lutéale d'un cycle naturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes). [27]

Une vague d'amélioration est observée dans les années 1980 résultant principalement de la mise au point de protocoles de superovulation plus performants, utilisant des préparations de FSH à la place de traitements PMSG. De plus, les préparations à base de FSH d'origine porcine et/ou ovine, devinrent plus pures et présentaient un rapport FSH / LH plus stable. [14]

Des doses de FSH comprises entre 32 et 50 UA (Unité Armour) sont administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bi-journalières (matin et soir) pendant 4 jours, la dose totale est de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA chez la vache viandeuse. [79][14]



**Figure 02** : Schéma de traitement de superovulation par FSH - p (en phase lutéale d'un cycle naturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes). [27]

En dépit des améliorations obtenues grâce à l'utilisation systématique de préparations de FSH purifiées (augmentation du nombre d'embryons produits et diminution de la variabilité des réponses) au lieu de PMSG, la variabilité de la réponse au traitement de superovulation reste le facteur le plus limitant des programmes de superovulation. [27] [14] [12]

### I.2.3.Fécondation :

En raison de l'étalement des ovulations à 12 et 24 heures après le début des chaleurs, deux inséminations artificielles (matin et soir) sont alors réalisées afin d'augmenter les chances de fécondation. Une semaine plus tard, la récolte d'embryons peut avoir lieu. [86][12]

### I.2.4.La récolte embryonnaire :

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. [27]

A J7 après l'insémination, la récolte des embryons et ovocytes se fait essentiellement par voie cervicale (technique non chirurgicale) par lavages successifs du corps et des deux cornes utérines par un liquide dit de récolte ou de perfusion (PBS : Phosphate Buffered Saline additionnée d'albumine bovine). [27][12][77] [33]

Généralement 70 à 80% des embryons sont récoltés (8 à 9 embryons pour 12 ovules pondus). [12]

Afin de ne pas entreprendre une récolte sur des animaux dont la réponse est nulle ou faible, un examen des ovaires par palpation transrectale ou par échographie permet de dénombrer les corps jaunes, témoins des ovulations effectives (ne pas confondre avec d'éventuels gros follicules kystiques). [12]

L'administration de l'anesthésie épidurale afin de permettre le placement de la sonde s'est révélée d'une valeur indéniable pour le succès des lavages utérins. [33]

La récolte peut se faire au moyen d'une sonde à 3 voies (Sonde de Cassou) ou à 2 voies (Sonde de Folley et Hann). [27] [12]

Le liquide récolté est directement déversé dans un filtre à embryons pour que ces derniers soient observés par la suite sous une loupe binoculaire et classés selon les normes de *The International Embryo Society*. [27]

Ils vont séjourner pendant 1 à 2 heures dans les milieux de collecte avant d'être transférés ou congelés. [77]

### **I.2.5. Conservation des embryons produits *in vivo* :**

La transplantation d'embryons est étroitement associée à la congélation, le plus souvent au stade blastocyste, par des méthodes compatibles avec une décongélation réalisée juste avant la transplantation. [79]

La cryoconservation des embryons a fait d'énormes progrès depuis les années 70, elle s'est diversifiée en plusieurs méthodes, alliant la rapidité de la congélation et la simplicité d'exécution. [34]

La vitrification a révolutionné le domaine de la cryoconservation, cependant, la multiplicité des protocoles de vitrification et surtout la rigueur et l'expertise nécessaires pour réussir cette technique semblent être un frein à son application massive sur le terrain alors qu'elle donne d'aussi bons taux de survie embryonnaire.[34][14]De ce fait, la méthode traditionnellement appliquée, notamment dans les espèces bovine et ovine, reste la congélation lente.[34]

Une procédure très simple de congélation/décongélation basée soit sur l'utilisation de l'éthylène glycol ou sur la combinaison glycérol-saccharose, permet de transférer les embryons directement sans avoir à les visualiser ni à les manipuler. Elle est aujourd'hui l'une des méthodes classiques les plus largement utilisées. [14]

La cryoconservation des embryons a permis une réduction du coût des interventions puisque le nombre de femelles receveuses qu'il faut préparer peut être ajusté au nombre d'embryons collectés. [18][79]. Elle permet de dissocier totalement les opérations de collectes d'embryons de leurs transplantations dans des porteuses. [44]

La cryo-préservation a un intérêt économique et génétique important pour l'industrie puisqu'elle permet une commercialisation plus facile et rapide des embryons de haute valeur génétique [62] [88]. Elle ouvre la voie aux échanges d'embryons entre élevages (de tous pays) et elle est utilisée en complément du maintien d'animaux vivants pour conserver la diversité génétique des races domestiques.[79]

### I.2.6. Choix des receveuses :

Les embryons récoltés sont soit réimplantés directement (transfert en frais) sur des receveuses dont le cycle est en parfaite synchronisation avec celui des donneuses, soit congelés dans de l'azote liquide pour une utilisation ultérieure. [86][25]

Une synchronisation aussi parfaite que possible entre l'âge de l'embryon et l'état physiologique de l'utérus de la receveuse constitue un élément essentiel pour la réussite du transfert d'un embryon. [78]

Le choix des receveuses introduites dans un programme de transfert se fait selon qu'elles soient cyclées (présence d'un corps jaune à la palpation), qu'elles présentent un bon état général (l'équilibre énergétique, absence d'infections ...etc.), qu'elles soient 45 à 60 jours post-partum (qualité de l'involution utérine) et indemnes de traitements antiparasitaires ou de vaccinations (< 30 j). [12][86]

Il est couramment conseillé d'attendre que les animaux aient atteint 60% de leur poids adulte avant leur mise à la reproduction. [86]

BROADBENT et al. (1991) expliquent que les génisses sont préférables aux vaches car elles ne conduisent pas de lactation en même temps que la gestation, ce qui évite un stress nutritionnel potentiel. De plus un utérus vierge est plus compatible avec un transfert embryonnaire (absence d'adhérences) [86]. Elles présentent un risque plus faible d'infections utérines et une manipulation plus aisée du tractus génital. [78]

CHAGAS E SILVA et al (1999) ont observé que les génisses avaient un taux de gestation moyen de 53,7%, significativement supérieur à celui des vaches (40,2%,  $p < 0,01$ ). [86]

Leurs inconvénients, selon BROADBENT et al. (1991), est que le col peut être plus difficile à franchir (10% des génisses) et que la fréquence des dystocies est plus importante chez elles que chez les vaches [86] [78]. A l'inverse cependant, les vaches présentent un col plus facile à cathétériser. Les pluripares doivent être préférées aux primipares. [78]

CHAGAS E SILVA et al (1999) ont montré qu'il y a plus de transfert traumatique chez les vaches que chez les génisses, en raison de la difficulté qu'il y a à manipuler des appareils génitaux de taille importante. [86]

Les conditions de part nécessitent que ces animaux soient en état corporel correct, sains, de préférence sérologiquement positifs à la BVD et les parasites. Toute forme de stress est à éviter. [2]

Le rationnement doit permettre de satisfaire une croissance correcte en respectant les apports énergétiques et azotes recommandés, sans oublier d'occuper la capacité d'ingestion de ces animaux par des fibres. [2]

Tout changement brutal de la ration doit être évité au cours du mois précédant et suivant le transfert. [78]

Les taux de gestations obtenus sont de l'ordre de 60% après transfert en frais et 50% après congélation. [44]



### I.3. Les limites de la production d'embryons *in vivo* : [44]

Les contraintes sont principalement celles liées au traitement de superovulation, avec la nécessité de réaliser des injections répétées en raison de la demi-vie courte de l'hormone FSH.

La variabilité quantitative de la réponse des donneuses au traitement de stimulation ovarienne est grande.

On observe en moyenne 12 ovulations par vache qui après insémination artificielle et collecte permettent de récupérer 6 à 9 embryons, dont 5 à 6 en moyenne sont normalement développés au stade blastocyste et aptes à être transplantés. [79][44]

Environ 20% des donneuses traitées ne produisent aucun embryon transférable, alors que 25% en produisent plus de 6. Il en résulte une planification difficile du nombre de receveuses et un coût technique élevé. [79]

Il est d'autre part nécessaire de respecter un intervalle minimum de six semaines entre deux traitements.

Enfin, les traitements hormonaux de superovulation actuels sont remis en cause (interdiction d'extrait hypophysaire FSH dans certains pays). [44]

## **II.QUALITE OVOCYTAIRE ET EMBRYONNAIRE :**

### **II.1.L'OVOCYTE :**

L'ovocyte est la cellule germinale féminine impliquée dans la reproduction. C'est une des plus grandes cellules du corps féminin. [87]

L'ovocyte doit subir une longue différenciation le préparant à former avec le gamète mâle la première cellule souche d'un nouvel être. En l'occurrence, il doit subir une longue évolution cytologique et moléculaire durant toute la croissance folliculaire. [36][62][89] [87]

L'ovocyte supporte exclusivement le clivage précoce de l'embryon jusqu'au stade de 4 à 8 cellules [87]. Il procure une abondance de facteurs sous forme d'ARNm ou de protéines pour permettre la progression des premiers stades du développement embryonnaire. [18] [89]

L'aspect graduel de la progression méiotique de l'ovocyte, fait de lui une cellule très particulière dont le noyau reste bloqué en prophase grâce à un système d'inhibition intra-folliculaire jusqu'à son éventuelle ovulation après la puberté. [89] [87]

L'ovocyte est une cellule totipotente à l'origine de tous les tissus composant un être vivant, et possède le potentiel de remettre à zéro le programme génétique d'une cellule somatique différenciée lors de transfert nucléaire (clonage) pour assurer la constitution de tous les tissus de l'embryon et de l'adulte. [18]

#### **II.1.1.Origine :**

Cette cellule étonnante a comme origine les cellules germinales primordiales. À la suite de leur migration dans le fœtus vers la crête uro-génitale, les cellules germinales primordiales alors appelées ovogonies chez la femelle se multiplient par une multitude de mitoses successives. La division rapide de ces ovogonies mène à la formation de grappes et c'est à ce moment que des connections avec les cellules somatiques environnantes se forment. Suite à cette période de prolifération, les ovogonies entrent en méiose pour devenir des ovocytes. Ces derniers ne terminent pas leur première méiose immédiatement puisqu'ils s'arrêtent plutôt au stade diplotène de la prophase I pour y rester en état de latence pendant une période de temps plus ou moins longue dépendant des espèces. À ce moment de l'ovogenèse, le noyau de l'ovocyte est appelé la vésicule germinale (GV) et ce stade nucléaire est maintenu jusqu'à la reprise méiotique induite lors de l'ovulation. [18][84][87]

#### **II.1.2.Croissance ovocytaire et folliculogénèse :**

Le développement de l'ovocyte est intimement lié à celui du follicule engagé dans les différentes étapes de la folliculogénèse. [84][62]

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de la réserve jusqu'à sa rupture lors de l'ovulation ou à son involution lors de l'atrésie. [62][87][36]

Plus de 99% des follicules sont voués à l'atrésie, ils dégèrent sans avoir pu évoluer jusqu'à terme. [36]

L'initiation du développement folliculaire est caractérisée par l'incorporation de la thymidine tritiée par les cellules folliculeuses [36] et par des modifications morphologiques, incluant un changement dans la forme des cellules de la granulosa, une prolifération de ces cellules, une croissance de l'ovocyte et la formation de la membrane pellucide. [87][36]

Au cours de leur développement les follicules passent par différents stades. On distingue les follicules pré-antraux (primordiaux, primaires et secondaires), les follicules cavitaires ou antraux (tertiaires) et le follicule de De Graaf désignant le follicule mûr. [36] [47]

La phase de croissance folliculaire allant du stade primordial au stade pré-antral est dite phase basale ou précoce. Elle est essentiellement dépendante de facteurs de croissance (GDF-9, Steel, IGF-1) ou endocriniens (insuline). Il n'existe aucune différence morphologique entre les follicules de la cohorte durant cette phase. [87][36]

À partir du stade antral, on parle de croissance folliculaire terminale. Les follicules deviennent dépendants des gonadotrophines pour poursuivre leur développement [85] [87] [47]. Elle correspond à la durée de la phase folliculaire du cycle. [36]

Les premières vagues de follicules antraux apparaissent donc à la puberté durant les premiers cycles hormonaux. [85]

Cette phase de croissance folliculaire dépendante des gonadotrophines peut être divisée en trois phases distinctes, soit le recrutement, la sélection et la dominance. [82]

Une cohorte d'environ cinq à dix follicules (4 à 5 mm) sera tout d'abord recrutée suite à une augmentation de la concentration de FSH. À ce moment, tous les follicules de la cohorte ont une chance équivalente d'atteindre l'ovulation. Une fois le recrutement effectué grâce à la FSH, un processus de sélection va mettre en place. Les follicules vont alors supprimer la sécrétion de FSH via la sécrétion d'inhibine et d'œstradiol et ce, même si la FSH est toujours requise pour permettre la croissance des follicules. [82]

Lorsque le plus gros follicule de la cohorte aura atteint une taille d'environ 8,5 mm, soit après environ trois jours de croissance, un phénomène de déviation va se produire et ce follicule va augmenter rapidement en taille par rapport aux autres pour éventuellement devenir dominant. Les cellules de granulosa des follicules de plus de 9 mm vont alors exprimer l'ARNm des récepteurs de l'hormone lutéinisante (LH) alors que tous les follicules en croissance de plus petite taille expriment seulement l'ARNm des récepteurs à la FSH. Le follicule dominant continuera de croître quelques jours suivant cette sélection grâce à la sécrétion pulsatile de LH. [82]

En absence du pic de LH essentiel à l'ovulation, le follicule dominant commencera à régresser et une nouvelle cohorte de follicules sera recrutée pour former la vague folliculaire suivante. [82]

La croissance de l'ovocyte se produit alors qu'il est bloqué au stade diplotène de la prophase méiotique. Cette période de croissance est caractérisée par une intense activité de synthèse d'ARNs et de protéines. [84]

➤ Dans le follicule primordial :

Le mécanisme induisant la formation du follicule primordial est peu connu mais il est indépendant de la concentration en FSH, l'ovocyte ne possédant pas de récepteur à cette hormone. [85] [36]

En début de croissance, l'ovocyte est une cellule de 20 à 50µm de diamètre, bloqués en fin de prophase I, contenant un noyau de grande taille, la vésicule germinative, située en position excentrée. [84][36]

L'ovocyte est entouré par une couche de cellules folliculaires aplaties auxquelles il est relié par des petites jonctions adhérentes. [84][87][18][23]

L'entrée en croissance de l'ovocyte se manifeste par une augmentation du nombre des mitochondries de forme allongée et des microvillosités. [84]

➤ Dans le follicule Primaire :

Les follicules primaires (>60 µm de diamètre) sont caractérisés par un ovocyte primaire entouré par une couche monocellulaire de cellules de la granulosa de forme cuboïde. [87] [62] [85] [23]

On observe l'apparition de quelques petites sections de zone pellucide entre l'ovocyte et les cellules de granulosa en division. [85] [23]

La croissance des ovocytes est accompagnée par la formation d'une zone pellucide (ZP). [62]

L'ovocyte contient de nombreuses mitochondries en cours de division. Le réticulum endoplasmique est plus abondant et le nombre de poly ribosomes augmente ; ces changements en relation avec une activité métabolique et synthétique accrue. [84]

➤ Dans le follicule secondaire :

La progression vers le stade de follicule secondaire se caractérise par l'apparition d'une deuxième couche de cellules de la granulosa et par le dépôt initial de glycoprotéines autour de l'ovocyte qui feront partie de la zone pellucide (ZP). [62] [18] [85] [87] [23]

La zone pellucide est traversée par des prolongements des cellules péri-ovocytaires (corona) qui établissent des jonctions perméables (gap junctions) avec la membrane plasmique de l'ovocyte. [84] [18] [85] [87]

Ces connexions, sont indispensables à la croissance adéquate de l'ovocyte au sein du follicule puisqu'elles permettent le passage d'éléments nutritifs et de signaux impliqués dans la croissance de l'ovocyte, ainsi que dans son arrêt méiotique. [84] [18] [87]

Les granules corticaux qui jouent un rôle important au moment de la fécondation se forment dans le complexe golgien, à proximité du noyau. [84] [62] [23]

➤ Dans le follicule tertiaire :

Alors que la très grande majorité des follicules ovariens est figée aux stades primordiaux, primaires et secondaires (>95%), une faible proportion des follicules est recrutée lors des vagues folliculaires pour entrer au stade tertiaire. [18]

Le follicule tertiaire est caractérisé par la formation de la cavité antrale. [84] [62] [23]

Chez la souris, l'ovocyte a complètement terminé sa croissance au moment de la formation de l'antrum. Par contre, chez d'autres espèces comme les ruminants ou le porc, l'ovocyte termine sa croissance au cours du développement du follicule antral. [84] [36] [18]

La formation de l'antrum amène la séparation des cellules de granulosa en 2 types distincts : les cellules de granulosa murales qui tapissent la paroi du follicule et les cellules de cumulus qui sont les cellules de granulosa qui demeurent en contact avec l'ovocyte. [18][85][62]

Les thèques sont alors différenciées autour du follicule : thèque interne, d'aspect glandulaire riche en cellules et capillaires et thèque externe riche en fibres de collagène et séparées des cellules de la granulosa par la lame basale. [36] [62]

Pendant la formation de l'antrum, l'ovocyte atteint sa taille presque définitive (80%). À partir de ce moment, le follicule s'accroît car la prolifération cellulaire continue mais surtout, parce que l'antrum s'agrandit. [36]

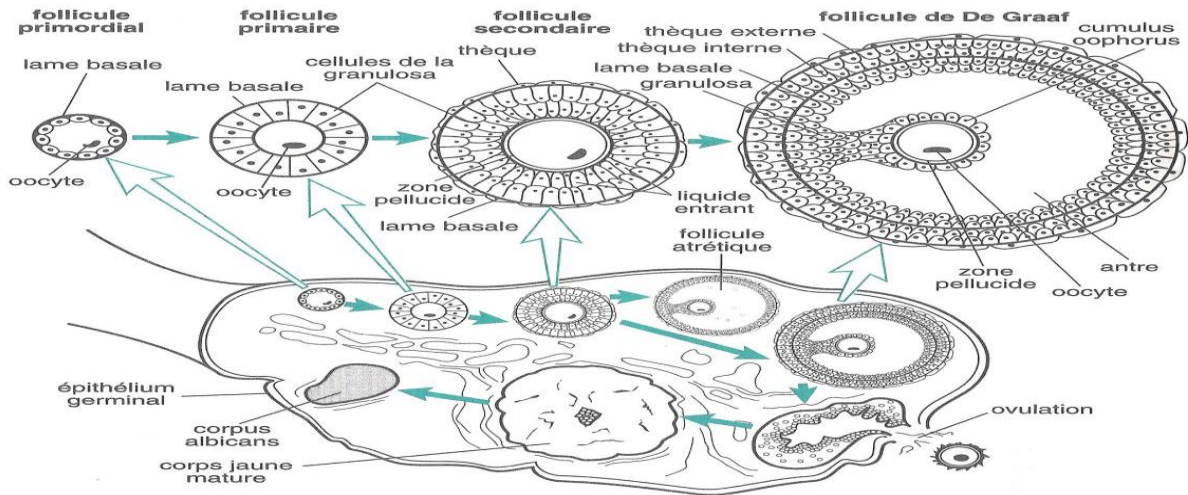
L'ovocyte est maintenant complètement entouré de la zone pellucide, traversée par les prolongements cellulaires des cellules de la corona radiata, la couche de cellules folliculaire directement en contact avec l'ovocyte. [85] [18] [23]

Ce stade de développement est marquée aussi par l'acquisition de l'ovocyte sa compétence à reprendre la méiose. [23]

La diminution, voire même l'arrêt total de l'activité transcriptionnelle, coïncide avec la capacité de reprise de la méiose. [23]

Entre 5 et 6 jours avant l'ovulation, le follicule entreprend une expansion rapide ; résultat d'une prolifération des cellules de la granulosa et d'une accumulation du fluide folliculaire ; et migre vers la surface ovarienne. Le follicule porte maintenant le nom de Follicule De Graaf et est prêt pour l'ovulation. [87]

À la fin de la folliculogénèse, l'ovocyte doit acquérir sa compétence afin de reprendre sa méiose, être fécondé, se développer jusqu'à l'activation du génome embryonnaire afin de soutenir le développement jusqu'au stade de blastocyste et assurer le succès d'une gestation viable. [62]



**Figure 03** : Représentation schématique des différents stades de croissance des follicules. [85]

### II.1.3. Compétence de l'ovocyte :

Un ovocyte compétent est un ovocyte capable de réaliser une maturation correcte, d'être fécondé, de réaliser une bonne implantation et finalement de donner naissance à un enfant en bonne santé. [87][85][23][89]

Cette compétence est acquise progressivement au cours de la croissance ovocytaire. L'ovocyte devient d'abord capable de réinitier la méiose (éclatement de la vésicule germinative) et de progresser jusqu'en Métaphase I, avant de devenir apte à effectuer la première division méiotique et à évoluer jusqu'en Métaphase II. Chez la souris, l'ovocyte devient compétent à maturer lorsqu'il a atteint 80% de sa taille définitive. [84]

L'acquisition de la compétence à maturer représente une étape fondamentale de l'ovogenèse. [84]

#### ➤ Compétence à reprendre la méiose :

Chez toutes les espèces étudiées, la compétence méiotique est acquise en fin de croissance quand l'ovocyte a accumulé suffisamment d'ARNs. Chez le porc et les ruminants, l'ovocyte devient apte à maturer dans les follicules antraux de 2 à 4 mm de diamètre, au moment où s'achève la période d'intense activité transcriptionnelle et de remaniement nucléaires. [84]

Les ovocytes de mammifères qui ont terminés leur croissance sont capables de reprendre spontanément leur méiose et d'évoluer jusqu'en Métaphase II, lorsqu'on les isole de leur follicule et qu'on les cultive in vitro. [84][62]

L'accumulation de p34<sup>cdc2</sup> apparaît donc, chez certaines espèces, comme une condition nécessaire pour la mise en place de la compétence méiotique. [84]

➤ **Compétence de l'ovocyte à se diviser après la fécondation :**

Une fois que l'ovocyte a atteint le stade de métaphase II (MII), celui-ci doit être en mesure de compléter sa dernière division méiotique en expulsant le deuxième globule polaire et débiter le développement une fois qu'il aura reçu le signal d'activation provenant du spermatozoïde. [82]

Suite à la fécondation, l'ovocyte doit ensuite avoir la capacité d'empêcher l'entrée des spermatozoïdes surnuméraire par l'exocytose des granules corticaux et la modification de sa zone pellucide. [82]

➤ **Compétence à supporter le développement jusqu'au stade de blastocyste :**

L'acquisition du potentiel de l'ovocyte à produire un embryon repose sur une suite de processus finement orchestrés, se déroulant au cours de la croissance finale du follicule. Parmi ces processus, on retrouve l'accumulation importante d'ARN messagers au cours d'une période transcriptionnelle très active, suivi par une diminution graduelle de la transcription. Ce sont ces transcrits qui vont permettre de soutenir le développement du jeune embryon jusqu'à l'activation du génome embryonnaire. [82][18]

La capacité de l'ovocyte à supporter le développement jusqu'au stade de blastocyste constitue un des points de référence les plus utilisés pour caractériser la compétence de l'ovocyte, autant dans un système de culture *in vitro* que pour définir l'efficacité des protocoles de stimulation *in vivo*. [82] [89]

La compétence au développement de l'ovocyte dépend non seulement de son aptitude à progresser jusqu'en Métaphase II, mais aussi à effectuer une maturation cytoplasmique complète. [84]

#### **II.1.4. Maturation ovocytaire :**

La maturation finale des ovocytes concerne à la fois le cytoplasme qui prépare l'ovocyte à son activation et à sa fertilisation par notamment la libération de calcium et de glutathion, et le noyau avec la reprise de la méiose et progression vers le stade de métaphase II. [16][36]

La maturation de l'ovocyte en un ovocyte fonctionnel dépend du microenvironnement qui l'entoure, à savoir l'antra du follicule. [87]

Alors que l'ovocyte acquiert une certaine forme de maturité au sein du follicule pendant l'ovogénèse, une maturation terminale est indispensable afin que l'ovocyte soit fécondable et compétent à produire un embryon viable. *In vivo*, cette maturation a lieu à l'intérieur du follicule dominant et est initiée par l'hormone lutéinisante (LH) lors du cycle œstral. Cette maturation peut être divisée en trois différents volets : la maturation nucléaire, la maturation cytoplasmique ainsi que la maturation moléculaire. [18] [89] [36]

Il semble donc que la maturation ovocytaire représente une période de préparation à la fécondation caractérisée par une maturation nucléaire, cytoplasmique et moléculaire mais également une période d'entrée en quiescence et de ralentissement métabolique afin de survivre aux nombreuses heures d'attentes précédant la fécondation et avant l'activation du génome embryonnaire. [85] [89]

➤ **Maturation nucléaire :**

La maturation nucléaire est caractérisée par l'acquisition de la compétence à reprendre la division méiotique par l'ovocyte, étape durant laquelle la première méiose sera complétée avec l'expulsion du premier globule polaire. [23] [89]

Chez les mammifères, de hauts niveaux d'AMP cyclique et de GMP cyclique seraient nécessaires pour maintenir l'arrêt méiotique. Lors de la décharge de LH, une baisse de GMPc est observée, permettant l'activité d'hydrolyse d'AMPc et favorisant la reprise méiotique. [23][84][82]

La LH agit sur l'expansion des cellules de cumulus en potentialisant l'action de la FSH présente dans le fluide folliculaire ; elle pourrait donc agir sur la reprise de la méiose par ce biais (fermeture des jonctions perméables et arrêt de transmission du signal inhibiteur). [82]

Chez le bovin comme chez plusieurs autres espèces, la maturation ovocytaire se produit en réponse à l'activation du facteur de promotion de la maturation (MPF) suite à la diminution de l'activité PKA. Le MPF, est une kinase de la division cellulaire impliqué dans la transition G2/M lors du cycle cellulaire chez tous les eucaryotes. [82][84]

Cette maturation est initiée par un plissement de l'enveloppe nucléaire, les pores nucléaires disparaissent puis l'enveloppe se fragmente avant de disparaître elle-même rapidement. L'ovule passe ainsi du stade GV (germinal vésicule) au stade GVBD (germinal vésicule breakdown). [36][18][23][82] [15]

On assiste par la suite à une condensation des chromosomes et à leur alignement pour une première division méiotique, qui a pour effet l'expulsion du premier globule polaire lors de la méiose I. Subséquemment la deuxième division méiotique est initialisée et la méiose est à nouveau stoppée au stade de métaphase II dans l'attente de la fécondation par le spermatozoïde. [18][23][89][36][15]

Bien que le pic de LH retrouvé plusieurs heures avant l'ovulation constitue le signal universel permettant à l'ovocyte de reprendre sa méiose, les ovocytes de mammifères peuvent reprendre leur méiose de façon spontanée lorsqu'ils sont retirés du follicule. Cependant, leur fécondation est anormale et ils ne peuvent se développer. [36][82] [15]

➤ **Maturation cytoplasmique :**

La maturation cytoplasmique est principalement caractérisée par des modifications des organelles et du cytosquelette qui préparent l'ovocyte à être normalement fécondé. [84] [18]

De manière simplifiée, on assiste à la migration des granules corticaux vers la membrane plasmique de l'ovocyte, à une rupture des jonctions GAP entre l'ovocyte et les cellules de cumulus proximales et par la migration des organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique, et appareil de Golgi) vers la région périnucléaire de l'ovocyte. [18] [89] [36] [23] [87]

La quantité des organites cytoplasmiques augmente, particulièrement les mitochondries qui sont estimées à un nombre approximatif de 500000 dans un ovocyte humain mature. [87]

Ces modifications se marquent également d'une réduction du corps de Golgi, d'une condensation du noyau et d'une redistribution des ribosomes. [89] [30]



La couche sous-corticale constituée de filaments d'actine tend à s'amplifier et à garder l'ovocyte au stade métaphase II jusqu'à la pénétration du spermatozoïde. Ces filaments d'actine participent également à l'élaboration du pont cytoplasmique qui mène à l'expulsion des deux globules polaires. [23][15]

La migration des granules corticaux est le trait le plus marquant de la maturation cytoplasmique. [36][15]

➤ **Maturation moléculaires :**

La plupart des ovocytes produits in vitro subissent une maturation nucléaire et cytoplasmique normales alors que seulement un sous-ensemble d'entre eux se développe en blastocystes. Ceci semble être dû à des différences invisibles dans l'ovocyte qui reflètent une maturation moléculaire incomplète. [89]

Le dernier type de maturation, la maturation moléculaire, est beaucoup moins défini et plus difficile à observer. Dans les 2 types précédents, de flagrants changements physiologiques sont observables par microscopie alors que la maturation moléculaire, quoique non moins importante, ne produit que des changements subtils au niveau moléculaire, ce qui nécessite des méthodes d'observation plus sensibles et plus complexes. C'est pourquoi ce type de maturation est présentement encore mal caractérisé. [18]

Un premier chambardement bien connu au niveau moléculaire est la traduction de nombreux transcrits stockés à l'état quiescent dans l'ovocyte. Ceci entraîne des changements notables des profils de néosynthèses protéiques, évoluant tout au long de la maturation. La maturation ne provoque non seulement l'apparition de nouvelles protéines mais aussi la modification post-traductionnelle de certaines protéines existantes. [18][15]

La cycline B1, qui fait partie intégrante du MPF (M-phase promoting factor), responsable de la reprise de la méiose, est un bel exemple de protéine traduite lors de la maturation. [15][18]

Un autre exemple des changements métaboliques au cours de la maturation et qui a des conséquences importantes sur la fécondation, il s'agit de la synthèse de glutathion (GSH). Le niveau de GSH est très faible dans l'ovocyte immature, augmente pendant la maturation pour atteindre un maximum à la métaphase II puis chute à nouveau dans l'embryon précoce. Le GSH intervient dans la réduction des ponts disulfures lors de la décondensation de la chromatine du spermatozoïde et le remplacement des protamines de l'ADN du spermatozoïde par des histones. Le GSH accumulé pendant la maturation serait à la fois originaire de l'ovocyte et du cumulus, ce qui constitue une explication possible de l'importance de la présence de cellules de cumulus pour la qualité de la maturation cytoplasmique. [15]

L'expansion du cumulus pendant la maturation de l'ovocyte, résulte de l'accroissement des espaces intercellulaires suite à la production par les cellules d'une matrice viscoélastique abondante, composée d'acide hyaluronique. [36][23]

Cette matrice permet à l'ensemble cumulus-ovocyte de conserver son intégrité même après la rupture des complexes de jonction ovulatoire et permet donc aux cellules de cumulus de continuer à envoyer des facteurs diffusibles vers l'ovocyte en cours de maturation. De plus, ce cumulus expansé faciliterait la capture de l'ovocyte par le pavillon et favoriserait la fécondation [15] [36]. Certains facteurs de croissance (EGF, IGF-I) agissent aussi sur l'expansion du cumulus. [36]

Durant la croissance, les ovocytes emmagasinent des quantités importantes d'ARNm maternel (augmentant d'environ 300 fois son contenu en ARN total) dans leur cytoplasme. [36][85]

Plusieurs estimations ont été réalisées chez différentes espèces. Ainsi, on estime à 350 pg la quantité d'ARNm présents dans l'ovocyte bovin, 330 pg chez l'humain et 650 pg chez le porc. Chez certaines espèces, les quantités peuvent être remarquables. Par exemple, on retrouve jusqu'à 15 ng d'ARNm dans l'ovocyte de lapin et plus de 1 µg dans certains œufs d'oiseaux. [85]

Ces ARNm seront traduits en protéines afin de soutenir la maturation ovocytaire et le développement précoce et ce, jusqu'à l'activation du génome de l'embryon qui est une étape cruciale du développement. On considère qu'environ 60% des transcrits maternels présents dans l'ovocyte I sont détruits lors de la maturation. [15][18][85]

Trois catégories d'ARNm peuvent être distinguées durant cette période : les ARNm emmagasinés, les ARNm en voie de traduction (ARNm polyribosomiaux) et les ARNm voués à la dégradation. [85]

L'activité transcriptionnelle augmente conjointement avec la croissance ovocytaire pour atteindre son apogée lorsque l'ovocyte dans le follicule antral. Par la suite, une diminution de la synthèse d'ARN est détectée parallèlement à la croissance finale de l'ovocyte où par la suite, pratiquement plus aucune transcription n'est perceptible. Cette diminution de transcription se produit graduellement au fur et à mesure que l'ovocyte croît vers son diamètre final et est corrélée avec une certaine condensation de la chromatine dans la vésicule germinale. [18][85]

L'ovocyte possède un mécanisme de protection (masquage et l'entreposage) qui empêche la dégradation de ces ARNm jusqu'à leur utilisation au moment opportun. [18][85]

La régulation de la traduction de l'ARNm maternel est en fait basée sur des changements de la longueur de la queue poly(A). Ainsi, les ARNm à courtes queues poly(A) (<50 bases) sont non traduits (silencieux) et ne s'activent que suite à l'extension par polyadénylation de la queue à des moments spécifiques du développement embryonnaire. [89] [18] [85]

Une augmentation de la polyadénylation globale des ARNm est observée au cours de la maturation ovocytaire, ce qui corrèle bien avec l'augmentation de la traduction durant cette même période. [18]

Les transcriptions, d'abord très intenses, diminuent lorsque l'ovocyte a atteint environ 80% de sa taille définitive. Elles deviennent indétectables dès la reprise de méiose ; les 2/3 environ sont des ARN ribosomiaux, reflet de l'intense activité nucléaire observée pendant la période de croissance de l'ovocyte jusqu'à l'apparition de l'antrum. [36][85]

Malgré le contexte répressif de la transcription retrouvé à la fin de la croissance de l'ovocyte, certains ARNm continuent d'être accumulés. Parmi ces transcrits, plusieurs d'entre eux correspondent à des gènes d'histones. Ces ARNm d'histones seraient protégés d'une traduction précoce par leur association avec la protéine SLBP2, récemment identifiée chez le bovin. L'entreposage adéquat des ARNm d'histones permettra ainsi de soutenir la grande demande en histones nécessaire lors des premiers cycles cellulaires. [82]

### II.1.5. La qualité ovocytaire :

Compte tenu de la dynamique d'accumulation des ARNm au cours de la croissance de l'ovocyte, de l'arrêt graduel de la transcription en plus de l'importance cruciale du développement final de l'ovocyte dans le follicule, il apparaît évident que la qualité de l'ovocyte réside dans l'accumulation de molécules importantes pour le développement embryonnaire [82]. Avec le développement constant des outils moléculaires, l'analyse génomique/transcriptomique est devenue une approche de plus en plus intéressante afin de mieux comprendre la qualité ovocytaire en fonction de la composition en ARN [82]. Malgré les multiples efforts réalisés au cours des 15 dernières années afin de mieux définir le transcriptome de l'ovocyte compétent, la qualité ne semble pas se résumer à une simple liste de transcrits qui doivent être accumulés, mais est plutôt la somme d'une multitude de petits changements. [82]

Bien que certains marqueurs de la qualité ovocytaire aient pu être identifiés au cours des années, l'identification précise des mécanismes cellulaires impliqués dans l'acquisition de ce meilleur potentiel de développement demeure complexe. [82]

Un des principaux défis dans l'étude du transcriptome de l'ovocyte est sans contredit la relation indirecte entre l'abondance d'un ARNm et la synthèse protéique. Néanmoins, différents efforts ont été réalisés récemment afin d'obtenir une image plus claire des changements moléculaires qui surviennent dans l'ovocyte. [82]

Une approche visant à isoler les ARNm présents sur les polyribosomes a permis d'identifier les transcrits en cours de traduction dans l'ovocyte bovin. Finalement, l'importance d'intégrer les différentes bases de données disponibles a été démontrée comme étant le prochain grand défi à réaliser afin de réussir à comprendre ce phénotype complexe qu'est la qualité ovocytaire. [82]

La notion de qualité ovocytaire prend tout son sens chez l'humain, où environ 20% des ovules fécondés *in vivo* vont permettre la production d'un embryon viable. Chez le bovin, environ 30% des ovocytes récupérés sur des ovaires d'abattoir vont pouvoir atteindre le stade de blastocyste une fois maturés et fécondés *in vitro* et une proportion encore plus faible va permettre d'induire une gestation suite au transfert de l'embryon. [82]

La maturation *in vitro* a longtemps été pointée du doigt comme étant un facteur impliqué dans le faible potentiel de développement *in vitro* comparativement à la maturation *in vivo*. [82]

Toutefois, il a été démontré que la qualité intrinsèque de l'ovocyte était le principal élément responsable du potentiel de développement futur de l'embryon, alors que les milieux de culture *in vitro* avaient plutôt un rôle dans la qualité de l'embryon produit. [82]

Actuellement, les équipes clinico-biologiques sont confrontées quotidiennement à l'évaluation de la qualité de l'ovocyte dont l'aspect morphologique est l'un des critères. La littérature à ce jour atteste de la corrélation entre l'aspect morphologique de l'ovocyte et le développement embryonnaire et/ou les chances de grossesse. Aucun critère morphologique n'a pu à ce jour être clairement associé à la qualité fonctionnelle de l'ovocyte. [16]

A ce jour, il n'y a pas de quantification précise de l'importance relative de chaque anomalie morphologique par rapport aux autres. Il n'y a toujours pas de consensus sur une description morphologique précise permettant l'optimisation du choix des ovocytes normaux pour réaliser les fécondations en FIV ou pour la cryo-préservation ovocytaire. [87]

Plusieurs caractéristiques morphologiques et cytologiques des ovocytes ainsi que de leurs cellules du cumulus peuvent être utilisées pour sélectionner les ovocytes dans un contexte de reproduction assistée. Toutefois, même après une sélection minutieuse, les chances de succès suite à la fécondation *in vitro* et le développement de l'embryon demeurent incertaines. [82]

Les critères généralement utilisés pour déterminer le grade de qualité morphologique de l'ovocyte dans un contexte de reproduction assistée, incluent l'évaluation de la structure de l'ovocyte : le cumulus, le cytoplasme de l'ovocyte, le globule polaire, l'espace périvitellin, la zone pellucide et le fuseau mitotique. [87][82]

Toutefois, même après une sélection minutieuse, les chances de succès suite à la fécondation *in vitro* et le développement de l'embryon demeurent incertaines. [82]

#### II.1.5.a. Caractéristiques morphologique de la qualité ovocytaire :

##### ➤ Aspect morphologique du complexe cumulus ovocytes :

Une fois retiré du follicule, les ovocytes sont généralement entourés de cellules du cumulus et une grande variabilité dans l'aspect morphologique du complexe cumulus ovocyte peut être observée. [82]

Ainsi, un système de classification basé sur la morphologie des cellules du cumulus (nombre de couches de cellules et organisation) de même que l'aspect du cytoplasme de l'ovocyte a été mis en place. [82]

Les complexes cumulus ovocytes (COCs) bovins obtenus à partir d'ovaires d'abattoir, les COCs étaient classés selon un système à six différentes classes. Les classes 1 et 2 représentent les COCs avec un cytoplasme homogène avec plusieurs couches de cellules du cumulus compactes. Les classes 3 à 6 caractérisent les ovocytes ayant un cytoplasme granuleux et un cumulus incomplet ou une expansion progressive. [82]

Les ovules les plus beaux en apparence (ovules avec cumulus compact) sont non seulement moins compétents que ceux avec une expansion partielle, mais il semblerait aussi que les ovules qui possèdent quelques cellules du cumulus en atresie seraient davantage compétents. [23][87]

##### ➤ Le cytoplasme :

Selon une étude, l'aspect granuleux du cytoplasme de l'ensemble des ovocytes serait observé dans 8% des cycles. Dans ces conditions, le taux d'implantation est significativement réduit (4.3%) ainsi que le taux de grossesse évolutif (12.8%). Ceci serait corrélé également à un taux d'aneuploïdie particulièrement élevé (52.3%). [16]

L'agrégation du réticulum endoplasmique lisse est observée dans 6.2 à 9.4% des cycles et elle est surtout corrélée à un taux de grossesse biochimiques élevé, à un mauvais pronostic obstétrical et à un faible poids à la naissance. [16]

Cette anomalie morphologique récemment rapportée par Ebner (2008) ne paraît pas liée au protocole de stimulation utilisé, à l'âge ou une endométriose mais une corrélation avec le taux d'œstradiol plasmatique, la dose de gonadotrophine et la durée du traitement de stimulation a été rapportée. [16]

La viscosité du cytoplasme peut être appréciée lors de la micro-injection par sa résistance et sa tendance à coller à la pipette lors de la micro-injection. Une étude d'Ebner et al (2000), suggère que l'augmentation de sa viscosité est associée à une qualité embryonnaire diminuée avec une faible capacité à l'implantation et à mener une grossesse à terme. Cette hyperviscosité est un marqueur pronostic négatif, quoi que subjectif, du développement embryonnaire préimplantatoire. [16]

Les vacuoles cytoplasmiques sont la conséquence d'inclusions à partir de la membrane cytoplasmique et contiennent un fluide dont la composition est identique à celle du fluide périvitellin. Leur apparition serait concomitante à l'expulsion du 1<sup>er</sup> globule polaire. [16]

Les conséquences de leur présence sont souvent débattues. Selon Ebner et al (2000), 3.9% des ovocytes en métaphase II auraient au moins une vacuole. [16]



**Figure 04** : vacuoles ovocytaires. [16]

Le taux de fécondation en ICSI de ces ovocytes est significativement diminué (48.9 versus 65.3%) lors de la présence de ces vacuoles. Un seuil de 14  $\mu\text{m}$  de diamètre de la vacuole a été retrouvé au-delà duquel aucune fécondation n'est observée. De plus, le taux de développement de l'embryon vers le stade blastocyste, corrélé à la présence de vacuoles, est significativement réduit. [16]

#### ➤ **Globule polaire :**

La morphologie du premier globule polaire expulsé après l'ovulation peut également être étudiée pour déterminer la qualité ovocytaire. Des critères ont été établis tels que la forme, la taille, la surface et l'intégrité du cytoplasme de ce globule polaire même si l'utilité de cette étude morphologique est controversée. [87][16]

Les ovocytes qui avaient expulsé leur premier globule polaire entre 16 et 20 heures après le début de la maturation ont démontré un meilleur potentiel à atteindre le stade de blastocyste comparativement à ceux qui n'avaient pas expulsé leur globule polaire. En effet, les ovocytes incapables de reprendre leur méiose n'ont certainement pas tout ce qu'il faut pour supporter le développement du jeune embryon. [82]

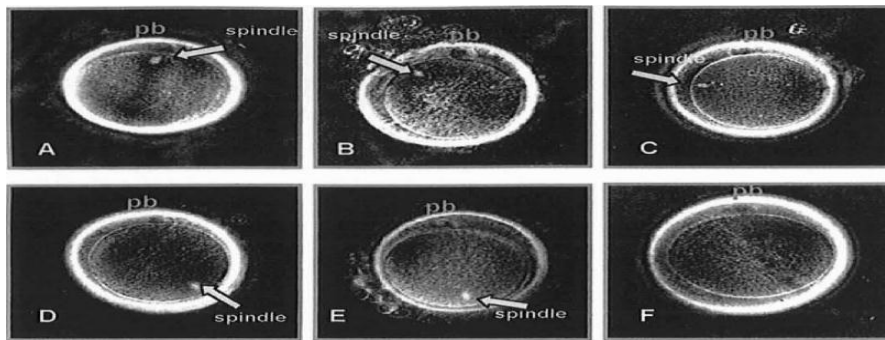
Ebner et al. en 2000, retrouvent, lors de leur étude rétrospective, de meilleurs taux de fécondation et une meilleure qualité embryonnaire en ICSI, lors de l'utilisation d'ovocytes ayant montrés un 1er globule polaire intact et bien formé. [16]

➤ **Fuseau méiotique :**

Des ovocytes montrant un fuseau mitotique biréfringent en utilisant le microscope à lumière polarisée (Polscope) auraient un meilleur potentiel de développement après la fécondation que des ovocytes avec des fuseaux ne montrant pas cette biréfringence. [87][16]

La position du fuseau au sein de l'ovocyte ne semble pas influencer le potentiel de développement embryonnaire. [16]

L'étude récente de Madashi et al (2009), retrouve une corrélation positive entre la biréfringence de la zone pellucide et la visualisation du fuseau méiotique. De plus, une fois le fuseau méiotique observé, le taux de fécondation des ovocytes à faible ou à forte biréfringence de la zone pellucide est similaire. [16]



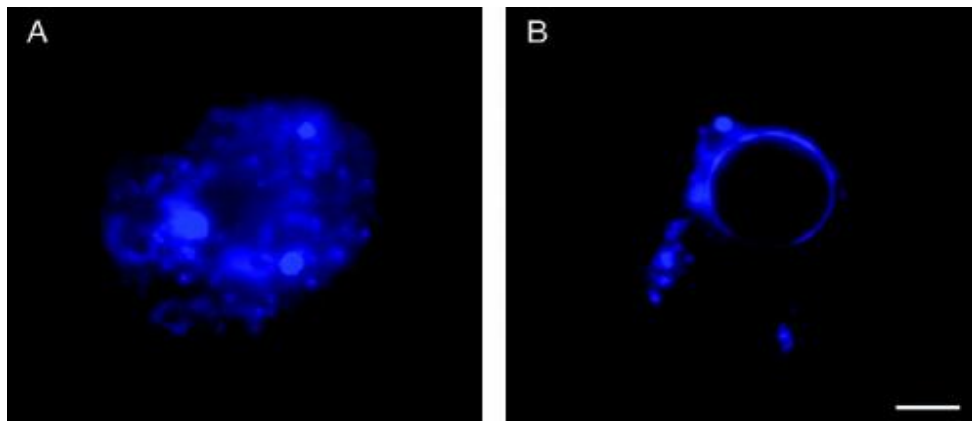
**Figure 05 :** Fuseau méiotique chez l'ovocyte humain vivant en métaphase II avec le Polscope piste avant l'ICSI. [16]

➤ **Configuration de la chromatine :**

La configuration de la chromatine a également été corrélée avec le potentiel de l'ovocyte à reprendre la méiose et à supporter le développement jusqu'au stade de blastocyste. [82]

Au cours de sa croissance, la vésicule germinale de l'ovocyte va subir un remodelage important de sa chromatine et différentes configurations ont été rapportées selon les espèces. [82]

Chez la souris, l'aspect de la chromatine sera tout d'abord diffus et caractérisé par l'absence d'un anneau autour du nucléole suivant un marquage de l'ADN. Cette configuration est appelée non-surrounded nucleolus (NSN) et elle est caractéristique des ovocytes qui n'ont pas complété leur croissance (Figure 6).[82]



**Figure 06 :** Configuration de la chromatine chez la souris [82]

A: non-surrounded nucleolus (NSN)      B: surrounded nucleolus (SN).

L'aspect de la chromatine va ensuite évoluer vers un état plus compacté une fois la croissance de l'ovocyte complétée. La configuration généralement retrouvée à ce moment est caractérisée par un anneau entourant le nucléole, ou surrounded nucleolus (SN). Ce type de configuration a été observé chez plusieurs espèces, incluant l'homme, le porc et le singe. [82]

Toutefois, d'autres types de configurations ont également été rapportés chez le cheval et le bovin et où la chromatine va plutôt se condenser de façon graduelle pour éventuellement former un arrangement compact [82].

Chez la souris, une proportion réduite d'ovocytes NSN parvient à reprendre la méiose et aucun d'entre eux ne pourra supporter le développement au-delà du stade 2-cellules, alors que les ovocytes SN peuvent atteindre le stade de blastocyste. Des résultats similaires ont aussi été observés chez le bovin où les ovocytes qui présentent une chromatine diffuse (GV0 et GV1) ont très peu de chance d'atteindre le stade de blastocyste comparativement aux stades où la chromatine devient plus compactée (GV2 et GV3). [82]

La granulosité de l'espace périvitellin, l'épaisseur ou l'irrégularité de la zone pellucide, la présence de corps réfractaires, l'aspect ovoïde de l'ovocyte ont également été associés à un moins bon pronostic de fertilisation ou de développement embryonnaire. [16][87]

#### **II.5.b.Facteurs de variation de la qualité ovocytaire :**

##### **➤ Impact de la taille du follicule :**

La taille du follicule d'où provient l'ovocyte a été identifié relativement tôt comme étant un facteur qui influence le potentiel à produire un embryon. Il a été démontré que les ovocytes provenant de gros follicules avaient davantage de chances d'atteindre le stade de blastocyste comparativement à ceux provenant de petits follicules. [82] [23]

Ainsi, les ovocytes provenant de follicules de taille inférieure à 2 mm ont un potentiel réduit à reprendre la méiose et à être fécondé. Les ovocytes provenant de follicules de taille inférieure à 3 mm ne se développent pas au-delà du stade de 16 cellules, alors que les ovocytes provenant des follicules de taille supérieure à 3 mm ont pu se développer jusqu'au stade de morula. La corrélation positive entre la taille des follicules et la qualité ovocytaire a également été confirmée par plusieurs autres groupes de recherche. [82] [89] [62] [18]

Des études ont montré que des ovocytes collectés à partir de follicules dominants (>13mm) aboutissent à des taux de blastocystes significativement plus élevés comparés aux ovocytes obtenus de follicules de diamètres compris entre 3 et 8 mm. [89]

Cependant, d'autres études en sont arrivées à la conclusion que les ovules provenant de follicules de diamètre entre 2 et 6mm et 6mm et plus ont des chances équivalentes d'atteindre le stade blastocyste, suggérant que des variations inter-laboratoires existent. [23]

Ces variations peuvent être expliquées par l'origine des ovules (race des femelles, temps entre la récolte et la mise en maturation, etc.), les milieux de développement (présence et/ou constitution du sérum / BSA, additifs, etc.) et l'environnement de culture (température, conditions gazeuses, etc.). [23]

On pense que les ovocytes de petits follicules n'ont pas accumulé l'ensemble des ARNm et /ou des protéines nécessaires pour accéder à une maturation cytoplasmique complète. [84][89][23]

➤ **L'âge maternel :**

L'âge maternel a été reconnu comme un facteur qui affecte la fertilité, autant chez la femme que chez le bovin. D'ailleurs, cette réduction de la fertilité est vraisemblablement due à une diminution de la qualité des ovocytes plutôt qu'au potentiel réduit de l'endomètre à recevoir l'embryon. [82]

Chez le bovin, il a été démontré que l'âge maternel et le lien avec la fertilité avaient plusieurs similarités avec ce que l'on retrouve chez l'humain à l'approche de la ménopause. Ainsi, les vaches plus âgées présentaient une plus grande concentration de FSH en circulation et un plus petit nombre de follicules recrutés au cours d'une vague folliculaire. [82]

Une étude rétrospective avait démontré que chez la vache, l'âge maternel avancé avait un effet négatif sur la production d'embryons lors de traitement de superovulation, où une diminution des taux de fécondation et du nombre d'embryons transférables avait été observée. [82]

Des résultats similaires ont aussi été observés chez la souris, où les ovocytes récupérés peu de temps après l'ovulation à partir de souris âgées avaient des taux de fécondation *in vitro* plus faibles. Toutefois, comme les problèmes en lien avec la qualité ovocytaire et l'âge maternel semblent survenir dès la fécondation, cela suggère l'implication de mécanismes différents comparativement à la faible qualité observée avec les ovocytes provenant de petits follicules par exemple. [82]

Chez l'humain, la diminution de la qualité des ovocytes observée avec l'âge maternel avancé semble être liée avec une plus grande proportion d'aneuploïdie dans les ovocytes. [82]

D'ailleurs, l'incidence d'un nombre anormal de chromosomes dans les ovocytes est faible (moins de 5%) chez les femmes âgées de moins de 25 ans, cette proportion va augmenter à 10-25% dans la trentaine pour dépasser les 50% une fois passée 40 ans. [82]

Les problèmes d'aneuploïdie surviennent principalement lors d'erreurs de la séparation des chromosomes lors de la première division méiotique, mais les mécanismes exacts qui expliquent ce phénomène ne sont pas encore bien compris. [82]

La ségrégation d'un chromosome vers le même pôle que son homologue (non-disjonction) a longtemps été considérée comme le principal mécanisme menant l'aneuploïdie. Toutefois, il semblerait que la séparation prématurée des chromatides sœurs ait plutôt un rôle prédominant comme mécanisme menant à l'aneuploïdie observée dans les ovules humains. [82][16]

Il a également été suggéré que l'aneuploïdie pourrait être un mécanisme de défense de l'ovaire, qui serait mis en place dans le but de diminuer la qualité de l'ovocyte dans un contexte non favorable à la gestation. [82]



➤ **Impact du traitement hormonal :**

L'utilisation de multiples injections de FSH a été démontrée comme étant un moyen efficace pour obtenir une grande population de follicules en croissance, mais sans pour autant obtenir davantage d'embryons en raison du statut inapproprié de différenciation du follicule. [82]

La stimulation ovarienne avec la FSH combinée à une période sans FSH (coasting) de longueur appropriée avant la récupération des ovocytes apparaît maintenant comme une façon efficace d'obtenir des ovocytes ayant une grande compétence au développement chez le bovin. [82]

Une période de 48 heures entre la dernière injection de FSH et la récupération des ovocytes par ponction trans-vaginale (PTV) a permis d'obtenir jusqu'à 80% d'embryons suivant la maturation et la fécondation *in vitro*. [82]

Il a été démontré récemment, qu'une période de coasting d'environ 54 heures représentait la période idéale afin d'obtenir un niveau optimal de différenciation folliculaire. [82]

Des résultats récents ont démontré qu'un allongement de la période de croissance folliculaire de seulement 24 heures avait un effet néfaste sur la qualité des ovocytes et sur les taux d'embryons. [82]

Ces résultats indiquent que la qualité acquise au cours de la période optimale de coasting ne durera pas longtemps et suggère également la possibilité d'un mécanisme de contrôle de la qualité, qui pourrait agir par la dégradation de certains transcrits si l'ovocyte n'est pas ovulé au bon moment. [82]

Plusieurs liens ont été faits entre les gonadotrophines et l'aneuploïdie. Par exemple, une grande quantité de FSH utilisée lors de la maturation *in vitro* affecterait l'alignement des chromosomes en métaphase I chez la souris. [82] [16]

➤ **Composition du liquide folliculaire :**

Le fluide folliculaire (FF) contient une grande variété de molécules incluant des hormones stéroïdes et protéiques, des anticoagulants, des enzymes, des cytokines et des électrolytes. Sa composition est distincte de celle du sérum, suggérant qu'elle est programmée pour correspondre aux besoins de l'ovocyte. [87]

L'équilibre entre les molécules réactives à l'oxygène et les antioxydants dans les FF semble important pour un développement harmonieux de l'ovocyte. Les hormones se trouvant dans les FF incluent la FSH, la LH, l'hormone de croissance (GH), l'hCG, la progestérone et l'œstradiol. [87]

En réponse à la présence de ces hormones, les cellules formant le follicule sécrètent une grande quantité de facteurs qui influencent la maturation ovocytaire. Les FF contiennent des métabolites qui s'accumulent dans les ovocytes pour leur fournir le matériel intracellulaire nécessaire pour leur différenciation. Ces métabolites incluent les acides aminés, les lipides, les nucléotides et d'autres molécules de petites tailles. [87]

Différents biomarqueurs retrouvés dans les FF ont été proposés comme biomarqueurs de la capacité de l'ovocyte à être fécondé ou à donner des embryons de bonne qualité à J2 ou J3, tels que la lactoferrine, la leptine, l'hormone anti-Müllérienne, l'IGF-2, l'IGFBP-3, l'IGFBP-4. Un haut taux de ghrélin serait le reflet d'une mauvaise qualité ovocytaire. [87]

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes, agit par l'intermédiaire de récepteurs disséminés dans l'organisme. Outre son rôle dans la satiété, l'équilibre énergétique et la thermorégulation, elle tient une place centrale dans le développement et la régulation de la reproduction. [45][36]

Chez les femelles, elle contribue largement au contrôle de l'ovulation, informant l'axe hypothalamo-hypophysaire des réserves énergétiques qui sont une condition limitante pour mener à bien la fécondation, la gestation et la lactation. [45]

Il est désormais bien connu que la leptine agit à différents niveaux de l'axe HHG, engageant différents tissus et de nombreuses cascades biochimiques. [64]

Dans l'hypothalamus, elle règle la sécrétion pulsatile de la LHRH (*luteinizing hormone releasing hormone*), dans l'hypophyse elle module la sécrétion des gonadotrophines ; elle agirait aussi directement sur les gonades. [45][64]

Des taux de leptine compris dans une fourchette bien précise sont nécessaires pour soutenir une fonction reproductive normale, et que des concentrations inférieures ou supérieures peuvent interférer avec le fonctionnement correct de l'axe HHG. [64]

De plus, l'excès de leptine pourrait altérer la réponse ovarienne aux stimuli trophiques (pour exemple : IGF-1), produits par le follicule dominant. Si des niveaux élevés de leptine interfèrent avec le développement du follicule dominant, un stimulus adéquat pour la sécrétion de la LH devient impossible. [64]

Les IGF sont synthétisés par le foie sous stimulation de la GH, sauf lors de déficit énergétique. Si le rôle des faibles teneurs circulantes en insuline et IGF est à peu près admis, le site d'action de ces déficits hormonaux est moins clair. [36]

Cependant, ont été constatées, une diminution de sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, une baisse de la sécrétion de la LH par l'hypophyse, et surtout une diminution de la pulsatilité de cette sécrétion de LH et un ralentissement de la croissance folliculaire. [36]

#### ➤ **Impact de la nutrition :**

L'interaction entre la nutrition et la reproduction repose sur plusieurs liens complexes.

La nutrition a un effet sur la population folliculaire, le rendement en ovocytes ainsi que sur leur qualité. [36]

D'un point de vue nutritionnel, l'énergie, les protéines, les minéraux et les vitamines affectent tous la reproduction à leur façon. [36]

De toutes ces composantes nutritionnelles, l'énergie est probablement le facteur le plus intimement relié aux faibles performances reproductives et de variation de la production d'ovocytes. [36]

Chez les mammifères, la fonction reproductive est strictement dépendante des disponibilités énergétiques environnementales. Il a été souligné que des modifications aiguës de l'état métabolique sont capables d'altérer la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique(HHG). [64][36]

L'apport en énergie influe sur une grande variété de mécanismes endocriniens, neuraux et métaboliques. Parmi ces effets, il a été mentionné les changements dans la sécrétion de la FSH, LH et dans la production de la progestérone pendant le cycle œstral, les variations de la sensibilité de l'hypophyse et de l'hypothalamus aux stéroïdes et les changements dans l'activité ovarienne tels que mesurés par la sécrétion hormonale, le développement des follicules et l'ovulation. [36][64]

Boland *et al.*, (2001) rapportent que les vaches dont l'énergie apportée est réduite, présentent des follicules dominants de petite taille et davantage de cycles comportant trois vagues folliculaires. [36]

De même, O'Collaghan *et al.* (2000), rapportent qu'une suralimentation ou une sous-alimentation peuvent altérer les concentrations hormonales dans le fluide folliculaire. En effet, chez la truie, une restriction alimentaire en fin de phase lutéale et en début de phase folliculaire induit une diminution du taux d'ovulation et de la sécrétion d'œstradiol. [36][45]

La relation d'interdépendance entre l'énergie et les hormones de reproduction est due au fait que le métabolisme, le transport et même l'action de ces composés nécessitent de l'énergie. [36]

Dans le cadre de ces interactions délicates avec l'environnement, l'état métabolique et la fonction reproductive, le tissu adipeux joue un rôle de relais, informant directement les structures cérébrales supérieures des réserves énergétiques disponibles à travers ses produits de sécrétion. [64][45]

Monget *et al.*, (2001), ont reporté que dans des situations où la masse adipeuse est réduite (restriction alimentaire, période de sécheresse, déficit énergétique, dépense métabolique excessive), le niveau de leptine est abaissé et la puberté est retardée. [36]

Une hypo-leptinémie pourrait constituer le signal informant l'organisme d'un état de sous nutrition, un signal métabolique qui stimulerait l'appétit et diminuerait la dépense énergétique, tout en inhibant la reproduction. [36][64]

Dans l'anorexie mentale, la sous-nutrition sévère est associée à des niveaux très faibles de leptine plasmatique et intracérébrale, à des taux bas et non pulsatiles de gonadotrophines, à des altérations menstruelles et à une aménorrhée [64]

Le stockage excessif des réserves métaboliques, notamment dans le cas de l'obésité, interfère aussi avec une régulation correcte de l'axe reproductif. [64]

Dans la population féminine obèse en âge de procréer, les troubles hypothalamiques observés correspondent à ceux constatés chez l'animal, à savoir un profil évocateur d'hypogonadisme central : diminution des taux de FSH, LH et d'inhibine B. [16]

La mesure du score des conditions corporelles de la donneuse de gamètes est un bon outil pour le choix des femelles donneuses d'ovocytes. Le BCS de la vache a révélé un effet sur la folliculogénèse, le rendement en ovocytes et aussi leur qualité. [36]

Ryan et al, (1994), ont trouvé une relation entre les concentrations en IGF1 dans le sang et la note d'état corporel ; les animaux ayant une note d'état trop haute ou trop basse avaient de plus faibles concentrations en IGF1 que ceux avec une note intermédiaire. [36]

En tentant d'améliorer le bilan énergétique, la supplémentation en matières grasses augmente la teneur en énergie alimentaire. [62]

Lucy *et al.* (1991) ont démontré que la supplémentation en AG à longue chaîne peut provoquer l'augmentation du nombre et la taille des follicules pré-ovulatoires probablement par l'induction de la concentration de cholestérol dans le plasma et le liquide folliculaire. [62]

Plusieurs études ont permis d'observer que les lipides peuvent aussi avoir des effets directs sur la transcription des gènes qui codent des protéines essentielles pour la reproduction. [62]

### ➤ **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 exerçant une action défavorable sur la fonction ovarienne et la qualité des ovocytes ou des embryons. [36]

Ainsi, tout stress avant et pendant le traitement de super ovulation est néfaste puisqu'il conduit à la formation d'ACTH 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. [36]

Les maladies métaboliques (syndrome vitulaire, affections hépatiques.....) retentissent sur la fonction ovarienne. De même, la présence de kystes ovariens conduit à une activité ovarienne pratiquement nulle. [36]

L'endométriose pourrait entraîner des altérations des fonctions endocrine et ovulatoire de l'ovaire : dysfonction de la phase lutéale, anomalies de la croissance folliculaire, pics de LH prématurés ou multiples. Plusieurs auteurs ont rapportés un défaut de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et ovarien, mis en évidence par des taux de progestérone plus faibles et altération du corps jaune. [16]

## **II.2.EMBRYON :**

### **II.2.a .La fécondation :**

Le processus de fécondation, amorceur du développement embryonnaire, est le résultat d'une succession d'événements complexes chez les mammifères. En fait, les spermatozoïdes capables doivent initialement reconnaître la zone pellucide (ZP) puis se lier et fusionner avec la membrane plasmique de l'ovule juste après l'achèvement de la réaction acrosomiale qui leur permet de pénétrer à travers la ZP. [89] [87] [18] [84].

Ces différentes étapes impliquent des interactions ligands-récepteurs, des modulations de canaux ioniques, des fusions de membranes et des réactions de protéolyse. [89]

Le spermatozoïde déclenche dans l'ovule une augmentation du flux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire essentiel pour l'activation de l'œuf. Chez les mammifères cette réponse prend la forme d'une série d'augmentations périodiques de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique. Ces oscillations se produisent à intervalles réguliers, continuent pendant plusieurs heures et permettent le relâchement des granules corticaux qui servent à prévenir la polyspermie. [89][84]

Probablement, le rôle le plus important de l'augmentation du flux de  $Ca^{2+}$  dans l'ovule est d'induire la levée de l'arrêt méiotique et donc la reprise du cycle cellulaire en activant le «Maturation promoting factor (MPF) ». [89][84]

Ainsi, la méiose reprend avec expulsion du deuxième globule polaire contenant la moitié du bagage génétique de l'ovule qui est par la suite remplacée par celui du spermatozoïde. [18] [89] [84]

L'ADN du spermatozoïde à une structure différente des autres types cellulaires, il est extrêmement compact grâce au remplacement des histones par les protamines lors de la spermatogenèse. Suite à sa pénétration à l'intérieur du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau du spermatozoïde doit passer par un processus inverse à ce qui est observé lors de la spermatogenèse; c'est-à-dire que les protamines doivent être remplacées par les histones maternelles présentes dans l'ovule afin que l'ADN vienne s'enrouler autour des octamères d'histones pour former les nucléosomes. Suite à ce remaniement structurel, on dénote l'apparition du pronoyau mâle. [18][89][84]

Chez les mammifères, les pronuclei mâle et femelle peuvent être observés au centre de l'œuf, 3 à 8 heures après la pénétration du spermatozoïde. [84]

### II.2.b. Développement préimplantatoire :

Chez les mammifères, le développement embryonnaire pré-implantatoire (précoce) englobe la première semaine de développement, elle se déclenche suite à la fécondation et se poursuit jusqu'à la formation d'un embryon, sous forme de blastocyste éclos, prêt à s'attacher à la paroi utérine ou, *in vitro*, prêt à être transféré dans l'utérus d'une mère porteuse. [89][85]

Bien que les caractéristiques structurales des blastocystes semblent, en général, être similaires chez tous les mammifères, plusieurs différences lors des tous premiers stades du développement sont observées entre les espèces. Ces variations sont liées à la taille des ovocytes, au taux de clivage cellulaire, à la durée de la période préimplantatoire, et au mécanisme d'activation du génome embryonnaire ainsi que le nombre de cellules par blastocyste. [89]

Les transitions morphologiques et physiologiques majeures (clivage précoce, l'activation du génome embryonnaire, la compaction et la cavitation) sont accompagnées et régulées par l'expression différentielle d'un réseau complexe de gènes. [89]

#### ➤ Clivages précoces :

La fusion des cellules germinales génère le zygote, qui est le premier stade embryonnaire d'une nouvelle entité totipotente. L'ADN qui constitue le pronuclei mâle devra subir une étape duplicative avant d'être mélangé à celui du pro-noyau femelle lors de la première division mitotique de l'embryon afin de former l'embryon 2-cellules. [18] [84] [87]

Le zygote entre dans un processus de divisions cellulaires, la segmentation, qui scindera le zygote en plusieurs parties flexibles et totipotentes appelées blastomères, et ce, de façon synchrone ou asynchrone. [23] [87]

Les divisions cellulaires des premiers stades chez l'embryon sont désignées par le terme clivage. Durant ces premiers stades de développement, il y a une série de clivages symétriques des cellules embryonnaires qui provoquent une diminution de 50% du volume de chaque cellule lors de chaque division sans toutefois augmenter le volume total de l'embryon, toujours prisonnier de la zone pellucide rigide jusqu'à l'atteinte du stade de blastocyste où le diamètre total de l'embryon augmente pour une première fois. [18][85] [87]

Les premières divisions mitotiques sont liées à une simple duplication de l'ADN zygotique sans synthèse des protéines et organites cytoplasmiques hérités de l'ovocyte. Les premières cytogénèses sont donc une simple répartition des mitochondries, du réticulum endoplasmique, des appareils de Golgi et du cytoplasme provenant de l'ovocyte. [87]

Chez le bovin, les premières divisions mitotiques sont plutôt caractérisées par des clivages rapides composés de phases S et M du cycle cellulaire sans passer par de réelles phases G1 et G2, deux étapes dans lesquelles se produit la majorité de la synthèse d'ARNm. [18][85][62]

Conséquemment l'embryon ne passe que quelques heures aux stades 2- et 4-cellules, puis ralentissement du cycle cellulaire se produit au stade 8-cellules pour englober toutes les phases normales du cycle cellulaire observées dans les cellules somatiques. [18][85][62]

#### ➤ **La compaction :**

La compaction est un trait commun au développement préimplantatoire chez tous les embryons mammifères placentaires, bien qu'elle se produise considérablement plus tard dans le cas des embryons d'espèces domestiques agricoles. [89]

Chez les embryons bovins produits in vitro et in vivo, la compaction se déroule assez tardivement vers le stade de 32-cellules comparativement à 8-cellules chez la souris. [89]

La compaction est perçue comme le premier événement morphogénétique crucial permettant à l'embryon de passer d'une forme relâchée là où les blastomères sont susceptibles de se disperser aisément en absence de zone pellucide à une autre forme notamment plus ferme et plus compacte. [89][18]

Lors de la compaction, les embryons subissent une série d'événements dont l'aplatissement cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, la polarisation du cytoplasme et celle de la surface cellulaire et un renforcement des contacts interblastomériques qui abolit les différentes frontières entre les cellules et continue jusqu'à ce que l'embryon apparaisse comme une masse cellulaire (32 à 64 cellules) uniforme appelée **morula**. [89][85][62]

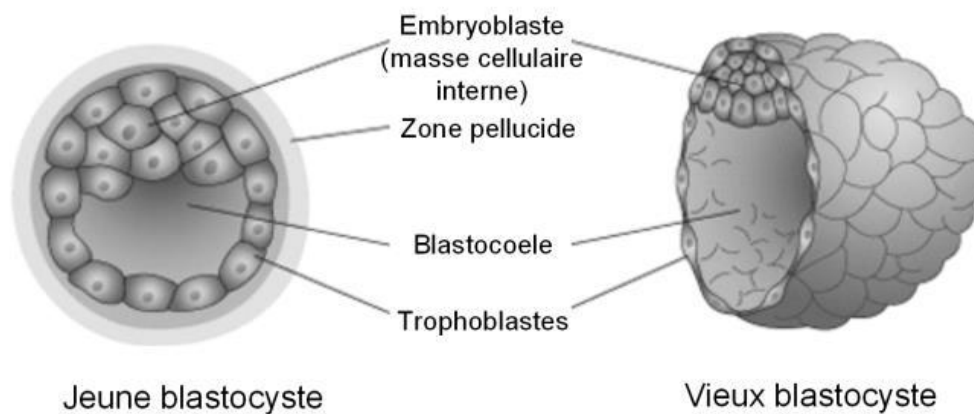
A ce stade, on assiste à l'acquisition de la polarité et à une première différenciation, les cellules embryonnaires retrouvées au centre de l'embryon seront plus grosses que celles retrouvées en périphérie. On parle alors de macro-blastomères et de micro-blastomères. [85][89] [23]

Subséquent à cette compaction, on remarque la formation d'une petite cavité appelée blastocœle à l'intérieur de l'embryon. Cette structure est typique d'un embryon qui fait son entrée au stade de jeune blastocyste. [18]

➤ **La cavitation :**

La formation d'un jeune blastocyste est caractérisée par l'apparition d'une cavité remplie de liquide appelée blastocœle, d'une première augmentation du volume embryonnaire et une différenciation interne visible de ses cellules. [62][23][85]

Deux types cellulaires sont clairement identifiables : les cellules de la masse cellulaire interne (ICM) et les cellules trophoblastiques. Les cellules de l'ICM sont des cellules sphériques pluripotentes formant le bouton embryonnaire (embryoblaste) responsable de la formation du fœtus ainsi que de quelques annexes embryonnaires (sacs amniotique et vitellin), alors que les cellules trophoblastiques plutôt plates et entassées sont situées en périphérie de l'embryon et sont impliquées dans l'attachement de l'embryon à la paroi utérine ainsi que dans la formation du placenta.[18][85] [23] [87](Figure 07).



**Figure 07 :** le blastocyste est composé d'une masse cellulaire interne et d'une couche de Cellules trophoblastiques extérieure [87]

Le trophoblaste émet lors de ses premiers jours de développement une hormone importante : l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). Celle-ci a de multiples fonctions qui conditionnent la survie de l'embryon dont la plus connue est le maintien de la sécrétion de la progestérone par le corps jaune. [87]

Les cellules du trophoctoderme vont également pomper du sodium à l'intérieur de la cavité blastocelique, déclenchant du même coup l'entrée d'H<sub>2</sub>O par réaction osmotique. Maintenant en expansion, le blastocyste va également voir ses cellules du trophoctoderme sécréter la trypsine, une enzyme qui va s'activer à digérer la zone pellucide. [23][89]

La pression à l'intérieur de la zone pellucide deviendra trop élevée et celle-ci éclatera. Il s'agit de l'éclosion du blastocyste. [23]

L'éclosion est particulièrement importante pour l'implantation. Son échec est souvent associé à des problèmes d'infertilité et à l'avènement des technologies d'éclosion assistée. [89]

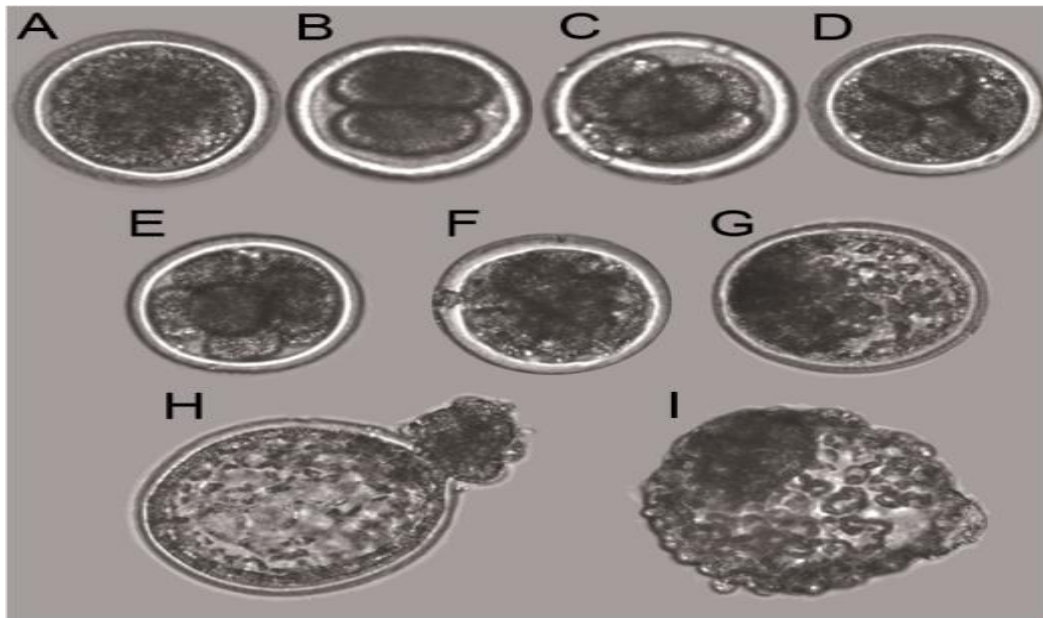
Chez l'humain, l'éclosion du blastocyste est rapidement suivie de l'attachement de l'embryon à la paroi utérine puis à son implantation directement à l'intérieur de la muqueuse utérine, une caractéristique propre aux humains, aux primates, aux rongeurs et aux lagomorphes (lapin, lièvre, pica) .[85]

L'atteinte du stade blastocyste se fait, chez le bovin, une semaine post-fécondation. En augmentant sa dimension, le blastocyste finit par éclore (J9-J10) et se libère de son enveloppe protectrice qu'est la zone pellucide afin de continuer son développement et sa préparation pour s'attacher à la paroi par des projections des membranes fœtales jusqu'aux caroncules maternels. Le moment exact de l'attachement de l'embryon bovin demeure incertain. [18][62][85]

Il est à noter que les embryons récoltés pour faire l'objet de transferts embryonnaires sont au stade morula ou jeune blastocyste, en raison du fait que la zone pellucide est encore en bon état (embryon moins fragile). [23]

Selon les milieux de culture in vitro utilisés, le stade blastocyste sera atteint normalement vers le 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> jour du développement embryonnaire. [23] [87]

L'embryon pré-implantatoire est capable de réaliser une forme de développement autonome approvisionné par les éléments fournis par l'ovocyte et ensuite par les produits provenant de l'activation de son génome. [87]



**Figure 08 :** Progression des premiers stades embryonnaires précoces. [85]

- A) Ovocyte au stade de GV B) Embryon 2 cellules C) Embryon 4 cellules D) Embryon 6 cellules  
E) Embryon 8 cellules F) Morula G) Blastocyste H) Éclosion du blastocyste I) Blastocyste éclos

(Figure produite par l'auteure Sara Scantland et Dr.Claude Robert.)



➤ **Activation du génome embryonnaire :**

Au début de sa vie, juste après la fécondation, le programme de développement de l'embryon est initialement dirigé par les protéines et transcrits maternels. [87][23]

Chez une multitude de métazoaires étudiés, une période de quiescence transcriptionnelle est observée chez le jeune embryon suite à la fécondation de l'ovocyte. La durée de cette période est spécifique à chaque espèce et chez le bovin, l'embryon n'active son propre génome qu'aux stades 8- à 16-cellules.[18][23][89] [62]

Précédemment à cette activation de la transcription, l'embryon subsiste grâce à l'utilisation des ARNm et des protéines fournies par l'ovocyte. C'est également à partir de ces réserves que l'embryon doit puiser les différents facteurs impliqués dans l'activation de son génome au moment requis. [18] [87] [23] [89]

Chez la souris, le génome embryonnaire est activé dès la fin du stade zygotique. Il y a donc une différence importante entre la souris et les grands mammifères tels que l'humain, le porc, le bovin et les ovins où l'activation du génome embryonnaire se produit beaucoup plus tard, vers la fin du troisième ou du quatrième cycle cellulaire. [85]

Chez d'autres organismes, les ARNm emmagasinés peuvent supporter jusqu'à 16 cycles cellulaires, ce qui correspond à plus de 30 000 cellules. Il y a donc une différence importante entre les mammifères et les non-mammifères tels que les poissons, les amphibiens, les insectes et les oiseaux. [85]

Cette activation du génome embryonnaire permet le maintien du métabolisme de l'embryon, sa différenciation ainsi que sa préparation pour son attachement à l'utérus. [18]

Ce passage désignant le remplacement des réserves d'ARNm maternelles par de nouveaux ARNm provenant de l'embryon est appelé la transition maternelle embryonnaire (MET). [18] [87]

Certains utilisent pour désigner cette période importante du développement embryonnaire le terme MBT (Mid-Blastula Transition), MZT (Maternal to Zygotic Transition), EGA (Embryonic Génome Activation) ou encore ZGA (Zygotic Génome Activation) [18]

Le terme MET est applicable à toutes les espèces, contrairement à MZT ou ZGA qui sont plus appropriés pour la souris ou à MBT qui fait plutôt référence à la drosophile et à la grenouille *Xenopus*. [18]

Bien que cette étape est extrêmement importante étant donné que son inhibition provoque un arrêt du développement embryonnaire, très peu d'information est disponible à ce jour quant à la nature des transcrits nouvellement exprimés à la MET chez le bovin. [18]

Un aspect particulier de la MET a été observé chez tous les métazoaires étudiés. Il s'agit de la détection d'une certaine transcription avant la MET, mais à des niveaux très inférieurs.

Cette transcription mineure détectée avant le stade 8-cellules chez le bovin ne fait donc pas exception à la règle. Chez la souris, cette transcription hâtive se produit principalement dans le pro-noyau mâle du zygote avant même le premier clivage de l'embryon alors que l'activation majeure du développement se produit au stade de deux cellules. [18][85][89]

Même si plusieurs transcrits s'expriment aussi tôt chez le bovin que le stade de 4-8 cellules et continuent à s'accumuler au fur et à mesure que le développement progresse, certains d'entre eux importants pour la prolifération, la compaction et la formation du blastocyste ne sont exprimés que tardivement. [89]

Le développement des embryons produits *in vitro* est plus accéléré, l'activation du génome embryonnaire à lieu au stade de 8 cellules chez les embryons bovins produits *in vivo*, mais à des stades un peu plus précoces. L'accélération de cette transition peut avoir des effets négatifs sur la qualité finale des blastocystes. [89]

### II.2.c. La qualité embryonnaire :

Tout comme le concept de «compétence de l'ovule», le concept de «qualité de l'embryon» est plutôt mal défini. Dans la littérature scientifique, la qualité de l'embryon est généralement associée à l'habilité d'un blastocyste à s'attacher à la paroi utérine et d'engendrer non seulement une gestation normale, mais aussi et surtout un descendant viable, sain et dépourvu d'anomalies. [23] [87]

Il a été montré que la compétence de l'embryon dépend à la fois du matériel génétique et protéique fourni par un ovocyte fonctionnel mais également d'un spermatozoïde apte à féconder l'ovocyte et à fournir un matériel génétique de qualité suffisant. [87]

Un embryon compétent émet une série de molécules pour participer activement à son implantation dont la plus spécifique est l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) qui module la tolérance immunitaire, l'angiogenèse et le processus invasif trophoblastique. [87]

Certains chercheurs vont également parler de qualité de l'embryon pour la capacité d'un embryon à résister à la congélation (cryo-tolérance). [77]

Certains embryons présentent un meilleur potentiel de survie à la congélation que d'autres. La cause de ce phénotype n'est pas encore claire et pourrait être due à des dommages cellulaires pendant la cryoconservation, comme résultat d'une accumulation excessive des lipides. [62]

La teneur plus élevée en lipides des blastomères d'embryons bovins produits *in vitro* semble être la conséquence d'une altération de la fonction mitochondriale, ce qui se traduit par une couleur foncée du cytoplasme. [62][89]

Même si les milieux de culture utilisés *in vitro* cherchent à reproduire le plus fidèlement possible les conditions *in vivo*, plusieurs différences sont observées chez les blastocystes produits *in vitro* versus ceux produits *in vivo*. D'un point de vue général, l'hétérogénéité de morphologie des embryons produits *in vitro* versus l'homogénéité de ceux produits *in vivo* est à souligner. [23]

Les embryons produits *in vivo* sont caractérisés par un cytoplasme clair et dense, de larges espaces périvitellin, des blastomères uniformes au stade 8 cellules, une compaction normale des morulas et des blastocystes avec une masse cellulaire interne bien définie. [89][23]

En contrepartie, les embryons produits *in vitro* sont marqués non seulement par des espaces périvitellins réduits, des blastomères irréguliers et une compaction imparfaite de la morula mais aussi, par des blastocystes sombres, plus enflés, non uniformes, un nombre total de cellules relativement inférieur, des zones pellucides plus fragiles, une augmentation visible de la vacuolation du cytoplasme ainsi qu'une diminution des complexes de jonction cellulaire entre les blastomères. [89][23]

Il est généralement accepté que les jonctions intercellulaires jouent un rôle important dans les premiers stades de développement embryonnaire. Elles connectent les cytoplasmes de deux cellules voisines, permettant le passage d'ions et de petites molécules. [23]

La polarité cellulaire observée lors du passage du stade morula au stade blastocyste semble être provoquée grâce à ce mode de communication, amenant une différenciation des cellules du trophoctoderme et de l'embryoblaste. [23]

Les embryons produits in vitro présentent une activité métabolique significativement plus élevée que celle des embryons produits in vivo, suggérant du même coup la présence accrue de stress environnementaux dans le processus de culture in vitro et résultant en un embryon de moindre qualité. [23]

Selon le «Quiet Embryo Hypothesis», les embryons de bonne qualité présentent une activité métabolique plus basse que ceux qui arrêtent leur développement. Ainsi, un embryon qui n'a pas subi trop de stress lors de son développement présentera, un génome, un transcriptome et une expression protéique normaux qui devraient lui permettre de poursuivre son développement sans avoir à consommer de façon massive des nutriments et de l'oxygène. [23]

L'utilisation massive de l'oxygène pourrait provoquer un stress oxydatif plus important au sein de la cellule, conséquence directe de la présence accrue de radicaux libres, perturbateur du développement embryonnaire. [23]

Les embryons produits in vivo versus ceux produits in vitro présentent également des différences dans la cinétique du développement. La première division cellulaire des embryons produits in vivo survient environ entre 24 et 28h après l'ovulation alors que pour les embryons produits in vitro a plutôt lieu entre 33 et 44h après la mise en contact du COC avec des spermatozoïdes capotés. [23]

Il a été remarqué que les embryons qui démontraient une division cellulaire tôt après la fécondation avaient davantage d'aptitude pour atteindre le stade blastocyste. [23]

La quantité plus limitée d'ARN chez les embryons produits in vitro versus ceux produits in vivo peut également être évoquée. Un plus faible volume de transcrits entraînerait logiquement une synthèse moins élevée de protéines et un développement embryonnaire plus lent. [23]

Il a été démontré également dans plusieurs études que les embryons mâles se développent plus rapidement que les embryons femelles, et ce, durant les 7 à 8 premiers jours suivant la fécondation. [23]

Le nombre de cellules qui constituent le trophoblaste est plus élevé chez les embryons produits in vivo. Le rapport entre le nombre de cellules formant la masse cellulaire interne (embryoblaste) et le trophoctoderme, (ICM/TE) est plus élevé chez les blastocystes produits in vitro. Un ratio ICM/TE trop élevé pourrait entraîner des problèmes de développement fœtal, pouvant même engendrer des avortements précoces. [23]

De façon générale, il est admis que la production in vitro ne donne pas des taux de blastocystes équivalents à ceux de la production in vivo. Plusieurs études ont publié des résultats au cours des années, et ceux-ci sont de l'ordre d'environ de 30 à 40% versus 40 à 80%, respectivement pour le taux de blastocyste de la production in vitro et de la production in vivo. [23]

Cependant, l'implantation d'embryons issus de production in vitro et in vivo présentent un taux de gestation équivalent selon plusieurs études, malgré que le taux de blastocyste pour la production in vitro soit plus faible. Ce taux de gestation varie passablement selon les études, passant d'environ 40% à plus de 60% dans d'autres. [23]

Certaines études démontrent des taux de gestation plus faibles pour les embryons produits in vitro. [23]

Parmi les facteurs qui peuvent entrainer un stress et avoir un impact sur le taux et la qualité des embryons produits *in vitro*, la composition des milieux de culture, la température, la luminosité, les conditions gazeuses et de pH variables entrainés par les changements de milieu de culture et les manipulations fréquentes (dénudation, changement de gouttes, etc.). [23] [89]

#### II.2.d.Evaluation de la qualité embryonnaire :

##### ➤ Critères morphologique :

En fécondation *in vitro*, les embryologistes observent les embryons durant leur développement ainsi que juste avant le transfert *in utero* pour déterminer quels embryons ont le plus de chance de s'implanter et de mener à la naissance d'un enfant. [87]

La sélection se fait généralement sur la base d'une observation morphologique de la cohorte des embryons à J 2 ou J3. [87]

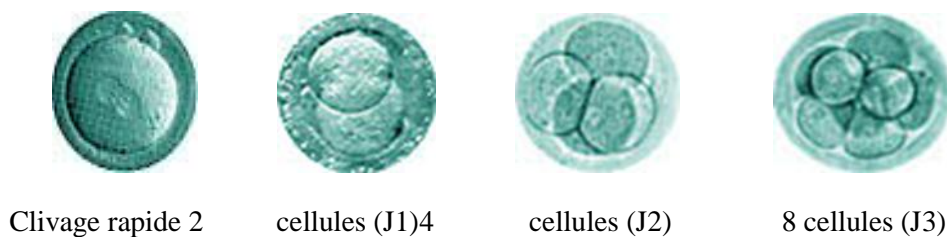
Actuellement, dans certains cas, les embryons restent *in vitro* pour leur développement jusqu'au stade blastocyste (J 5) afin d'améliorer la sélection des embryons à transférer. [87]

Une revue de 2012 apporte des preuves indiquant qu'il existe une petite différence significative en termes de taux de naissances vivantes en faveur du transfert de blastocystes (du 5ème au 6ème jour) comparé au transfert au stade du clivage (du 2ème au 3ème jour), mais la culture d'embryons jusqu'au stade blastocyste expose au risque de ne pas obtenir de blastocyste à transférer. [87]

Les critères retenus par l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) pour classer les embryons selon leur qualité morphologique sont :

❖ **Le nombre de blastomères** : De nombreuses études ont montré un lien direct entre le nombre de cellules (jusqu'à 8 cellules) au jour 3 et le taux d'implantation. [87]

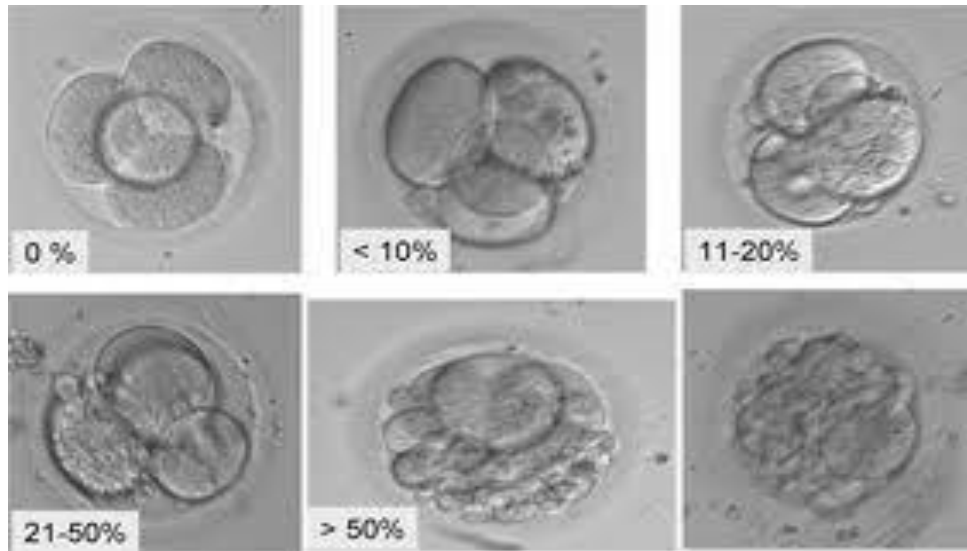
Le nombre de cellules est généralement considéré comme l'indicateur le plus important pour la viabilité de l'embryon. Ce nombre a également été mis en lien avec le potentiel de développement des embryons en blastocystes. [87]



**Figure 09** : Développement précoce jusqu'au stade 8 cellules d'un embryon top qualité [28]

❖ **La fragmentation des membranes cellulaires :**

Un fragment est défini comme une structure cytoplasmique extracellulaire anucléée lié à la membrane (Figure 10). [87]



**Figure 10** : fragmentation des membranes cellulaires des embryons. [87]

La présence de fragments a été trouvée comme liée à des anomalies de métabolisme cellulaire ou de division, signes d'apoptose, ou à des anomalies de ségrégation des chromosomes. [87]

Des données récentes suggèrent que cette fragmentation résulterait d'anomalies dans la membrane des ovocytes. Il y a différents systèmes utilisés pour grader la fragmentation des embryons. [87]

La méthode la plus facile et la plus utilisée décrit le pourcentage du volume de l'embryon occupé par des fragments (généralement score 0 = 0%, score 1 = <10%, score 2 = 10-25%, score 3 > 25%), plus le score est élevé, moins l'embryon aurait de chance de s'implanter. [87]

❖ **La régularité de la taille des différentes cellules (Symétrie) :**

Les cellules peuvent être asynchrones lorsqu'il y a des anomalies lors des divisions cellulaires ou si les organites sont mal distribués entre deux cellules sœurs.

En comparaison avec le nombre de cellules ou à la fragmentation, peu d'études ont été réalisées sur la corrélation entre le taux d'implantation et la symétrie des blastomères. Malgré tout, les embryons avec une asymétrie importante ont un taux d'implantation moins important. [87]

**❖ L'apparence du cytoplasme :**

La granulation du cytoplasme, la présence ou non de vacuoles. [87]

**❖ La multi-nucléation des blastomères :**

La présence de plus d'un noyau par blastomère est considérée comme anormale. Des études ont montré une association entre la multi-nucléation et une diminution du taux d'implantation/taux de grossesse. Cette association a été liée à une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques.[87]

Les embryons considérés comme les meilleurs sont ceux qui, au troisième jour de développement, ont plus de 6 cellules, une fragmentation inférieure à 10% de leur taille totale, un cytoplasme homogène et clair, des tailles de blastomères similaires et un seul noyau par cellule. [87]

La classification des embryons bovins est également basée sur des paramètres morphologiques comme le couleur, la forme, la taille de l'espace périvitellin, le nombre de cellules extrudées et dégénérées et le nombre et la taille des vésicules. [62]

La morphologie des embryons ne discrimine pas d'une manière suffisante la potentialité des embryons à mener une grossesse à terme. [87][62]

**➤ Cinétique du développement :**

L'utilisation de l'observation du premier clivage cellulaire 25 heures après la fécondation pour déterminer la qualité embryonnaire est un sujet de controverse actuellement. [87]

Actuellement, l'utilisation d'une technique d'observation des embryons en temps réel, appelée time-lapse, est de plus en plus utilisée par des centres réalisant de la FIV. [87][82]

Le système permet de déterminer précisément à quels moments les clivages des cellules ont lieu, tout en observant la morphologie des embryons. [87]

Cette technique suggère donc que les embryons les plus rapides, donc les plus compétents, proviennent d'ovocytes qui ont été en mesure de reprendre leur méiose rapidement, de décondenser l'ADN du spermatozoïde de façon plus efficace et dont l'accumulation préalable d'ARNm maternels s'est produits de façon optimale. [82]

Il est estimé qu'in vitro environ 90% des ovules immatures ont la compétence de passer du stade prophase I jusqu'au stade métaphase II (stade où la fécondation peut être possible), alors que 80% des ovules atteignent l'étape de la première division cellulaire. Par conséquent, le taux de clivage n'est pas un indicateur très puissant de la compétence future au développement d'un embryon. [23]

➤ **Approche fonctionnelle :**

L'identification des marqueurs de qualité embryonnaire est devenue une préoccupation majeure du fait que les critères morphologiques et cinétiques ne sont pas fiables pour se prononcer sur la compétence de l'embryon au développement. [89]

De nombreux travaux se basent sur une approche plus fonctionnelle pour déterminer la viabilité de l'embryon et ses chances de donner un enfant vivant en bonne santé. Ces études sont non invasives puisqu'elles étudient le surnageant de culture des embryons. [87]

❖ **La protéomique :**

Part du principe qu'un embryon sécrète des protéines selon un profil d'expression de certains gènes et ce profil serait le reflet de l'embryon en devenir. Ces protéines sont susceptibles d'influencer le développement de l'embryon et de lui permettre d'évoluer en un blastocyste fonctionnel. [87]

Des profils de sécrétions ont pu être associés à la capacité de l'embryon d'atteindre le stade blastocyste. Une protéine en particulier, l'ubiquitine, s'est révélée être un marqueur corrélé au développement embryonnaire. [87]

❖ **La métabolomique :**

S'intéresse au métabolisme global de l'embryon en lien avec son développement et sa viabilité. Certaines approches sont plus précises et observent plus particulièrement le métabolisme énergétique, la consommation en acides aminés, en glucose ou la consommation en oxygène de l'embryon. [87]

❖ **La transcriptomique :**

L'identification et l'étude de ces gènes est primordiale pour mieux comprendre la base moléculaire de ce développement pré-implantatoire, afin d'améliorer les conditions de culture in vitro, concevoir de meilleures stratégies pour les études transgéniques et de clonage et de développer des marqueurs de qualité embryonnaire. [87]

### III.FACTEURS DE RISQUES :

#### III.1.Le stress :

Des critères d'ordre physico-chimique, climatique et sociologique ont conduits à une version plus scientifique et légale du bien-être animal. [76]

Le bien être est un état d'équilibre dynamique entre l'animal et son environnement. On parle souvent aujourd'hui des « five freedoms » accordées aux animaux d'élevage et codifiées par le Conseil Britannique pour le Bien-être des animaux de ferme : absence de lésions ou de maladies, absence de stress climatique et physique, absence de faim et de soif, absence de peur et possibilité d'exprimer des comportements normaux. [13][76]. Le bien-être d'un animal de rente lui permet une reproduction et une production satisfaisantes ; voire maximales. [76]

A l'heure actuelle, on évalue le bien être chez l'animal par l'absence de mal-être et donc de stress. [7]. Le stress étant en étroite relation avec le bien être est une notion très importante dans le monde de l'élevage puisqu'il a influencé les normes de bâtiments et les techniques d'élevage. [7][13]

#### III.1.1.Définition :

Le glossaire d'ergonomie de l'Union Européenne définit le stress comme «des variations -irréversibles ou non dans l'organisme, mesurables par des méthodes physiologiques ou biochimiques et provenant de facteurs extérieurs ou d'origine psychologique ou sociale, capables d'induire une baisse de performance ». [73]

Le dictionnaire Larousse (1998), définit le stress comme « l'ensemble des perturbations biologiques et psychiques provoquées par une agression extérieure quelconque sur un organisme ». [37][7]

Walter Cannon en 1927 a défini le stress comme étant la tension mentale ou corporelle qui est due à des facteurs qui perturbent l'homéostasie interne. [29]

Le premier à mettre une définition biologique derrière le terme de stress est Hans Selye qui, en 1973 définit le stress comme « la réaction non-spécifique d'un organisme soumis à un environnement agressif » [7].

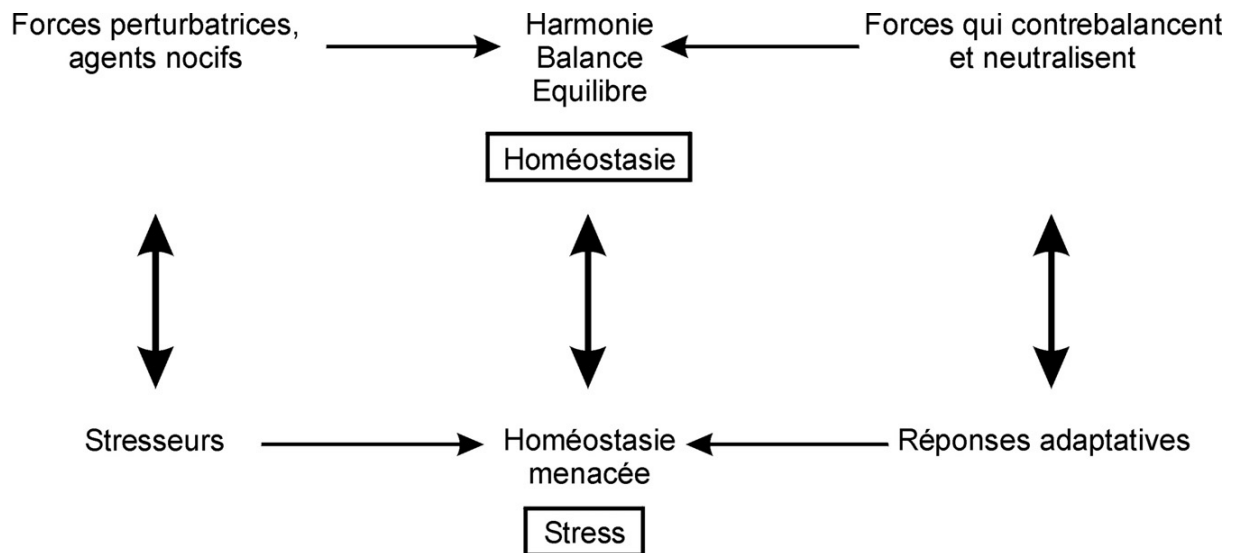
Cette agression peut être causée par un agent physique, psychique, émotionnel entraînant un déséquilibre qui doit être compensé par un travail d'adaptation et qui aboutit à un bon stress (accroît les performances) ou à un mauvais stress (provoque des effets néfastes). [37]

Il s'agit, comme le souligne Mormède (1995), d'une situation de sollicitation exagérée des capacités d'ajustement physiologiques et comportementales des animaux par laquelle l'organisme se protège afin de maintenir son intégrité. [7][37]

Ainsi, biologiquement parlant le stress correspond aux contraintes et agressions subies par un organisme qui vont l'empêcher de vivre dans des conditions optimales et vont engendrer une réponse de cet organisme pour pouvoir vivre dans de meilleures conditions. [13][76].

Un animal, est un système ouvert qui a besoin d'être en échange sans cesse avec l'extérieur pour se maintenir, ainsi se dessine la notion d'homéostasie .Un niveau de stimulation nulle signifierait sa mort [73] [7].





**Figure 11 : De l'équilibre (homéostasie) au stress [30]**

### III.1.2. Origine et types du stress :

Le stress peut être thermique, nutritionnel, social, ou provenir de désordres physiologiques, pathogènes ou toxiques. [76]

Les facteurs pouvant induire une situation de stress chez l'animal ont diverses origines et peuvent être classés comme suit :

- Internes à l'organisme : [7] [37]
  - ❖ les stimuli biochimiques tels l'hypoglycémie, l'hypo volémie ou l'hypoxie.
  - ❖ les stimuli psychologiques tels la peur ou la douleur.
- Externes à l'organisme : [7] [37]
  - ❖ les stimuli physiques comme la température (trop élevée ou trop basse), l'humidité, la manipulation ou une plaie.
  - ❖ les stimuli sociaux comme le type d'élevage (intensif ou extensif), la surpopulation, le confinement, l'isolement ou sevrage.

Selon que la situation de stress persiste ou pas dans le temps on distingue :

#### ➤ Stress aigu :

Le stress aigu correspond aux réactions de l'organisme quand il fait face à une situation menaçante, ponctuelle ou imprévisible.

Quand cette situation prend fin, les symptômes de stress s'arrêtent généralement peu de temps après. [43]

Une intervention humaine ponctuelle (une prise de sang par exemple) provoque un stress aigu chez l'animal. Celui-ci est de courte durée et ne porte en général pas préjudice à l'animal. [7]

➤ Stress chronique : [43]

L'état de stress chronique s'installe lorsque la situation de stress se prolonge et/ou se répète.

L'organisme n'est pas fait pour maintenir un état de surexcitation continu et doit avoir des périodes de récupération.

Le stress chronique maintient les mécanismes physiologiques mis en jeu pour faire face à une situation de stress, ce qui épuise le système et peut entraîner des effets néfastes et irréversibles pour la santé, et donc favorise le passage à un état dit : « pathologique ».

### **III.1.3. Marqueurs de stress :**

La physiologie du stress peut être définie comme l'étude des réponses biochimiques, physiologiques et comportementales d'un animal par rapport aux facteurs nouveaux de son environnement. [13]

#### **III.1.3.1. Les marqueurs comportementaux du stress : [7]**

Le comportement normal d'un animal est appelé éthogramme. Tout comportement qui diffère de l'éthogramme peut être considéré comme anormal mais pas systématiquement indicateur de stress.

Selon Ewbank (1985), un indicateur comportemental de stress doit être identifié, quantifié et corrélé avec l'intensité du stress, flagrant et une atteinte au bien-être physique ou mental de l'animal doit avoir été démontrée.

De ce fait, un comportement anormal seul ne peut pas être un marqueur de stress, il faudra le confirmer par la mise en évidence d'une réponse biochimique.

Les réactions comportementales associées avec un stress aigu ou chronique sont tout à fait différentes.

➤ **Stress aigu :**

Les réactions comportementales au stress aigu sont certes intéressantes comme indices d'un stress, mais elles sont beaucoup trop variables et peu spécifiques pour nous permettre de les utiliser comme véritables marqueurs d'un stress.

Ces réactions peuvent se traduire par la fuite (flight), l'affrontement (fight), des changements d'orientation afin de mieux orienter leurs organes des sens, des changements posturaux, des arrêts de l'activité en cours, une immobilisation et le plus souvent des vocalisations accompagnent ces comportements.

Un autre comportement souvent associé à un stress aigu est la défécation, mais il s'agit d'une fonction physiologique normale donc il est difficile de l'associer systématiquement avec un stress

### ➤ **Stress chronique :**

La principale manifestation comportementale du stress chronique est l'apparition de stéréotypes « tics » que Dantzer (1994) associe à la non-réalisation des besoins comportementaux spontanés.

Cependant, même si ces stéréotypes sont aisées à repérer, elles le sont beaucoup moins à quantifier et encore moins à associer à un stresser particulier puisque ce sont le plus souvent l'ensemble des conditions d'élevage qui participe à leur mise en place.

Les marqueurs comportementaux du stress chronique semblent plus réguliers tout au moins au sein d'une même espèce. Cependant, ils ne constituent pas non plus un bon marqueur de stress même s'ils représentent un signe d'alerte pour l'éleveur ou l'éthologue s'inquiétant de la présence de stress dans l'élevage.

### **III.1.3.2. Marqueurs biologiques : [7]**

On considère comme marqueur biologique toute fonction de l'organisme modifiée par le stress et évaluée de la façon la moins invasive possible. Nous distinguerons une fois de plus les marqueurs de stress aigu et les marqueurs de stress chronique. [37]

### ➤ **Stress aigu :**

Le système cardiovasculaire : les modifications du rythme cardiaque et de la pression artérielle nous serviront de marqueurs de l'activation du système nerveux autonome.

Le premier et le plus simple de ces marqueurs est le rythme cardiaque. Lors d'un stress aigu, le rythme cardiaque peut ralentir si les animaux ont peur, mais le plus souvent les animaux de rente présentent une tachycardie.

La tachycardie est associée à l'activation du système nerveux sympathique. Elle peut être mesurée par auscultation directe.

L'appareil respiratoire : le rythme respiratoire est augmenté du fait d'une activité physique accrue ou d'une émotion intense.

L'intérêt de ce marqueur est sa simplicité d'observation. La fréquence respiratoire d'un bovin peut être obtenue en observant les mouvements des flancs de l'animal, préférentiellement le flanc droit afin de ne pas être perturbé par les contractions du rumen.

Il est en outre nécessaire que ce soit le même observateur qui fasse les relevés avant, pendant et après le stress dans un souci de reproductibilité.

La température corporelle : Différentes études ont été menées et ont pour la plupart mis en évidence une élévation de la température corporelle lors de stress aigu chez des rats, des singes ou des veaux, notamment lors de la montée dans un véhicule, d'un transport ou avant l'abattage.

On peut également observer une baisse locale de la température lors d'un stress, lorsque l'activation du système sympathique ne se traduit pas par une vaso-constriction périphérique.

Afin de bien relever la température interne de l'organisme, il suffit de prendre la température par voie rectale.

L'intérêt de ce marqueur est sa simplicité de mise en œuvre notamment chez des bovins puisque c'est un geste non invasif et non douloureux qui en général ne déclenche pas de réaction de la part de l'animal.

➤ **Stress chronique :**

Le stress chronique, peut avoir de larges influences sur l'organisme. Elles sont moins flagrantes que pour un stress aigu, mais leurs conséquences sont plus néfastes.

Le système cardiovasculaire : Le rythme cardiaque n'est d'aucun intérêt lors d'un stress chronique.

La pression sanguine est un paramètre difficile à évaluer parce que cela nécessite souvent une intervention invasive, à savoir la pose d'un cathéter artériel, qui peut engendrer un stress aigu et interférer avec les mesures. Aujourd'hui chez le chat et le chien, elle est évaluée à l'aide d'un brassard comparable à celui utilisé en médecine humaine et d'un doppler, mais ce système n'a pas été adapté à l'espèce bovine.

La croissance : Un des premiers signes d'appel lorsqu'un animal ou un lot est malade ou mal à l'aise dans son environnement et donc stressé est l'arrêt ou le ralentissement de la croissance chez les jeunes et la perte de poids chez les adultes.

Cependant, le même type d'études menées chez les bovins (Lensink et al, 2000, Veissier et al, 2001) ne montre pas de différences significatives entre les lots en situation de stress et les témoins.

La reproduction : Les performances de reproduction sont des marqueurs intéressants parce qu'elles sont assez simples à appréhender.

Les performances de reproduction sont appréciées à partir de durées : durée entre le vêlage et la première insémination, durée entre le vêlage et l'insémination fécondante, ou à partir du nombre d'inséminations nécessaires pour obtenir une gestation chez une vache par exemple.

Les performances de reproduction sont un excellent marqueur de stress chronique d'origine sociale, psychologique ou physique. Cependant, les critères de reproduction peuvent être influencés par de très nombreux autres facteurs dont le facteur humain (repérage des chaleurs par exemple). Il est alors important d'utiliser avec discernement les critères de reproduction comme marqueurs de stress notamment dans des élevages dont on connaît la bonne technicité de l'éleveur.

La longévité et santé : Le stress peut limiter de plusieurs manières l'espérance de vie économique d'un animal de rente.

Ce marqueur de stress chronique peut être utilisé à l'échelle du troupeau plutôt qu'à l'échelle de l'individu. En effet, il semble plus pertinent d'envisager un problème de stress chronique dans un élevage qui a un fort taux de renouvellement et un troupeau plutôt jeune. Là encore, ce marqueur est à corrélérer avec le niveau sanitaire du troupeau et la technicité de l'éleveur.

### III.1.3.3. Les marqueurs biochimiques :

#### ➤ Stress aigu :

L'adrénaline et la noradrénaline sont sécrétées lors de l'activation du système sympathique par un stresser. L'étude de leurs variations plasmatiques est délicate en raison de : [7] [73]

- ✓ la libération des catécholamines dans la circulation sanguine est rapide et fugace du fait de leur demi-vie courte ;
- ✓ leur sécrétion est également sujette à des variations spontanées importantes ;
- ✓ le système sympathique est sensible au moindre stimulus ;

Ainsi, on comprend que les variations des taux plasmatiques de catécholamines sont des marqueurs très sensibles et corrélés à l'intensité du stresser, mais ils sont délicats d'utilisation et d'un intérêt limité chez les bovins.

Cortisol et ACTH : Les concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH sont des marqueurs du stress aigu assez simples d'utilisation. Les dosages se font facilement en routine.

Les variations de l'ACTH imposent des prises de sang à intervalles très rapprochés pour être interprétables, puisqu'elles sont limitées dans le temps.

Le cortisol peut également être dosé dans la salive (Mormède, 1988). Son taux est alors au moins deux fois plus faible que dans le sang, mais il présente une excellente corrélation avec ce dernier puisque seul le cortisol libre diffuse jusqu'aux glandes salivaires.

Les  $\beta$ -endorphines : Sont des opioïdes endogènes synthétisés dans le système nerveux central et l'hypothalamus.

Le dosage des  $\beta$ -endorphines est simple et il n'a pas été montré de variations circadiennes dans leur sécrétion. Cependant, les  $\beta$ -endorphines ne sont pas validées comme marqueur de stress chez les bovins et sont sujettes au même biais que le cortisol, à savoir leur augmentation suite au stress de la contention nécessaire au prélèvement sanguin. [73][7]

La progestérone : Elle apparaît comme un marqueur intéressant du stress. Cooper et al. (1995) rapportent une élévation du taux de progestérone plasmatique chez la vache stressée possédant un corps jaune actif et chez la brebis ovariectomisée ou non.

#### ➤ Stress chronique :

##### ✓ Les catécholamines :

Les caractéristiques de sécrétion des catécholamines (réactivité, labilité et pulsativité) en font de très mauvais marqueurs d'un stress chronique. La principale voie d'élimination des catécholamines et de leurs métabolites étant la voie urinaire, il apparaît donc intéressant d'utiliser les concentrations urinaires de catécholamines. La collecte d'urine est un geste facile, pas ou peu invasif et utilisable sur un grand nombre d'individus. [7]

##### ✓ Activité des enzymes :

Une augmentation progressive et durable de l'activité des enzymes (tyrosine hydroxylase, phényl-éthanolamine N-méthyl-transférase) de synthèse des catécholamines dans les glandes médullaires et les ganglions sympathiques est un marqueur d'un stress chronique. Cependant, les différentes méthodes employées nécessitent le sacrifice des animaux afin de prélever les glandes surrénales et les ganglions sympathiques. [7]

✓ Cortisol et ACTH :

Les concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH subissent peu de variations lors d'activation chronique de l'axe corticotrope.

Les caractéristiques de leur sécrétion (pulsatilité et rythme circadien) et le biais créé par la contention et le prélèvement sanguin rendent ces variations indétectables sur une mesure ponctuelle.

L'ACTH exerce un rôle trophique sur la glande surrénale et lors d'une activation chronique de l'axe corticotrope on peut observer une augmentation du poids de celle-ci. Cependant, cette mesure nécessite le sacrifice de l'animal. L'activation chronique de l'axe corticotrope peut être mise en évidence par la mesure des glucocorticoïdes urinaires et de leurs métabolites. Le prélèvement urinaire est un geste simple et peu stressant pour l'animal.

✓ T3 et T4 :

L'activation de l'axe corticotrope inhibe la fonction thyroïdienne chez les vertébrés adultes.

Chez les bovins des modifications des taux plasmatiques de T3 et T4 semblent être assez facilement les témoins d'une situation de stress chronique. Leur dosage est facile puisqu'il se fait par une méthode immuno-enzymatique en routine [37] [7]. Des études ont montré des variations des taux plasmatiques d'hormones thyroïdiennes lors de stress aigu d'origine hyperthermique ou hypothermique puisque l'axe thyroïdien est un régulateur de la production de chaleur dans l'organisme.

✓ Cholestérol :

L'augmentation de cholestérol est un des premiers signes du stress [73]. L'action des glucocorticoïdes conduit à l'augmentation des acides gras libres provenant de la mobilisation des réserves lipidiques qui induit une accumulation des corps cétoniques et donc une augmentation du taux de cholestérol. [37]

✓ Calcium :

Le stress perturbe le métabolisme du calcium et induit une baisse de son taux plasmatique. [37][73]

✓ Haptoglobine :

Excellent marqueur d'inflammation aiguë, mais aussi de stress. Il a été montré que le taux d'haptoglobine augmente chez des vaches transportées le long de 1400 Km. [37]

✓ Radicaux libres :

Ils renseignent sur un déséquilibre qui peut être dû à un déficit nutritionnel en antioxydants, à une surproduction endogène d'origine inflammatoire ou à une exposition environnementale à des facteurs pro oxydants. [26]

✓ ADN circulant libre :

L'augmentation de son taux plasmatique renseigne sur un état de stress pathologique (cancers) ou psychologique. (Utilisé chez l'homme)[75][83]

### III.1.4. Effet du stress sur la reproduction :

L'activation de l'axe hypophyso-cortico-surrénalien a des effets négatifs sur la sécrétion des hormones hypophysaires contrôlant le fonctionnement des organes sexuels, les gonadotropine [37]. Différentes études suggèrent que le stress réduit la fertilité parce qu'il interfère avec la synchronisation des événements précédant l'ovulation, à savoir la sécrétion pulsatile de GnRH et le pic de LH. [37][58]

Mormède (2001) a démontré que l'administration d'ACTH au cours de la phase de maturation folliculaire interfère l'ovulation et conduit à l'apparition de follicules ovariens kystiques en raison d'une suppression de la décharge LH responsable de la rupture folliculaire. [37]

Le stress thermique par exemple implique chez la vache laitière de nombreuses perturbations de son profil hormonal et de son activité ovarienne, en raison essentiellement du dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En conséquence, la stéroïdogénèse est altérée, la dominance folliculaire modifiée, la compétence ovocytaire fortement dépréciée et les manifestations d'œstrus sont réduites en durée et en intensité. [76]

Les effets directs de fortes chaleurs se traduisent également par une augmentation de la mortalité embryonnaire précoce ou tardive, la réduction du poids des veaux à la naissance et l'incidence croissante des pathologies post-partum. [76]

Le stress thermique engendre une diminution de l'ingestion (en raison de l'hyperthermie et d'un fourrage pauvre, en faible quantité), une digestibilité moindre lors de sous-alimentation et donc une augmentation du déficit énergétique de l'animal. [76]

L'animal mal alimenté par rapport à ses besoins cherche à économiser de l'énergie en mettant en veilleuse son amplitude à la reproduction. [36]

Une ingestion insuffisante d'énergie, de protéine, de vitamines et de micro et macro- minéraux ont tous été associés à une faible performance reproductive. De toutes ces composantes nutritionnelles, l'énergie est probablement le facteur le plus intimement relié aux faibles performances reproductives des vaches. [36]

D'après la littérature, le déficit énergétique est celui dont les conséquences sont les plus graves : retard d'ovulation, chaleurs silencieuses, baisse du taux de réussite de l'insémination artificielle. [36]

Butler et Smith (1989) ont montré que la durée des intervalles vêlage-1<sup>ère</sup> ovulation et vêlage-conception apparaît directement liée au bilan énergétique et à la vitesse de mobilisation des réserves corporelles. [36]

La sécrétion du GnRH et de LH, semble très sensible aux variations du métabolisme énergétique. Une diminution de la ration alimentaire ou une augmentation de la production laitière chez la vache est donc susceptible d'altérer rapidement la croissance folliculaire terminale chez la femelle. Les principaux acteurs servant d'interface entre métabolisme et reproduction sont l'insuline et l'IGF-I, la leptine mais également le glucose et les acides gras. Ces facteurs jouent un rôle intégrateur des fonctions vitales de l'organisme au niveau hypothalamique, mais certains peuvent également agir directement au niveau ovarien. [74]

## **III.2. Maladies métaboliques :**

### **III.2.1.Introduction :**

Les maladies métaboliques sont les maladies qui affectent les mécanismes de transformation des nutriments et des réserves. Les risques d'apparition des maladies métaboliques sont sensiblement accrus en début de lactation. [57]

Elles sont des manifestations de l'incapacité de la vache à faire face aux demandes métaboliques associées à la production lactée .Elles résultent d'un déséquilibre entre apports alimentaires et les besoins en métabolites qui sont nécessaires à la production de lait. Ce sont essentiellement des déviations de l'utilisation des métabolites menant à des états pathologiques. [48]

Les maladies métaboliques sont parfois liées entre elles. Des maladies elles-mêmes peuvent favoriser l'apparition d'autres maladies. De plus, les moyens de prévention de certaines maladies peuvent devenir des facteurs d'apparition d'autres maladies. [48][57]

### **III.2.2Maladies liées au métabolisme des minéraux :**

#### **III.2.2.a. Hypocalcémie :**

La fièvre vitulaire appelée couramment la fièvre de lait ou l'hypocalcémie vitulaire est une maladie ayant une origine multifactorielle. Une des origines de cette maladie est une hypocalcémie et une hypophosphatémie due à une augmentation importante du taux de calcitonine qui après le vêlage n'est plus régulé par le taux de calcium sanguin. [57] [48]

Le calcium reste donc stocké dans le squelette alors que les exportations de calcium via la production laitière sont alors très importantes. Un régime riche en calcium (légumineuses, pulpes de betteraves et choux) en ante-partum provoque une hypersécrétion de calcitonine pouvant être responsable de l'hypocalcémie postpartum. [57]

L'homéostasie du calcium est assurée par de nombreuses hormones : la parathormone, la calcitonine, et la 1,25 vitamine D3. L'ensemble du système permet de faire face au déficit en calcium au moment de la mise bas grâce à la mobilisation du calcium osseux, l'augmentation de l'absorption intestinale et la diminution de l'excrétion urinaire de cet élément. [48][57]

Cependant, ce système se met en place progressivement, ce qui peut conduire à une hypocalcémie quelques jours avant ou après la mise bas selon la rapidité de la mobilisation osseuse. [48][57]

En 2001, Larsen a montré que les signes cliniques tels que l'apathie, la baisse d'appétit, la baisse de tonus musculaire, la baisse de la motilité ruminale et l'hypothermie sont bien corrélées à l'hypocalcémie. [48][57]

Une hypophosphatémie est souvent observée, la magnésémie est variable, mais souvent diminuée en cas d'hypocalcémie sévère et l'on peut observer une hyperglycémie modérée. [48]

La diminution de la quantité de MSI peut s'expliquer de 2 manières : la diminution de l'appétence des rations avec des sels anioniques et/ou l'apparition d'une acidose métabolique qui conduit à une diminution de l'ingestion. [48][38]



Cette diminution d'ingestion peut poser problème autour de la mise bas en entraînant un déficit énergétique qui est un facteur de risque de cétose. [48]

L'établissement d'une ration adéquate en antépartum est une mesure importante de prophylaxie dans les élevages touchés. [57]

### III.2.2.b. Hypomagnésémie :

La tétanie d'herbage ou hypomagnésémie est surtout rencontrée chez les vaches laitières en début de lactation lors de la mise à l'herbe au printemps. Elle est due à la chute brutale de la concentration du magnésium dans le sang puis dans le liquide céphalo-rachidien. [57]

En début de lactation, les exportations en magnésium via la production laitière sont importantes pour le ruminant alors que les apports via l'alimentation restent stables (voire diminuent). [57]

Ce déséquilibre est accentué par deux phénomènes. Le tout premier est la lipolyse (générée par le déficit énergétique de début de lactation) qui va provoquer une hypomagnésémie brutale due à la captation du magnésium circulant par les mécanismes de mobilisation des réserves lipidiques. [57]

Le second est la diminution de l'absorption du magnésium par l'organisme. Celle-ci est le plus souvent observée lorsque les vaches sont mises à l'herbe alors qu'elles sont en début de lactation. [57]

L'herbe jeune est riche en eau (matière sèche < 20%), en matière azotée totale, en potassium, mais pauvre en sodium, en glucides solubles et en magnésium. [57]

L'excès azoté par rapport au peu d'énergie fourni, est dégradé en ammoniac dans le rumen provoquant une alcalose du rumen ce qui diminue l'absorption du magnésium et l'appétit de la vache laitière. [57]

Encore une fois, c'est le manque de transition alimentaire et le déséquilibre du régime de la vache laitière qui sont des facteurs déterminants dans la pathogénie de ces affections. [57]

La régulation de la magnésémie n'est pas aussi efficace que celle du calcium : il existe peu de mécanismes actifs pouvant s'opposer à sa baisse brutale. [57]

### III.2.2.c. L'hypokaliémie :

Le potassium est l'ion ayant le rôle le plus important dans l'organisme puisque c'est l'équilibre entre les réserves extracellulaires et intracellulaires de potassium qui vont être à l'origine du potentiel de membranes cellulaires (lui-même responsable des échanges osmotiques de la cellule et donc de la transmission des messages électriques entre les cellules). [57]

Toute anomalie de distribution dans l'organisme de cet ion est responsable de problème de transmission des potentiels d'action et donc des messages neuro-musculaires. [57]

Lorsqu'il existe une variation de la concentration extracellulaire en potassium, elle est due à une modification de la distribution des réserves corporelles. Lors d'hypokaliémie on observera une augmentation de l'importance des réserves intracellulaires en potassium au détriment des réserves extracellulaires. [57]

Les maladies à l'origine de l'hypokaliémie sont fréquemment les iléus secondaires à une alcalose métabolique (lors de torsion de la caillette). Cette alcalose métabolique provoque une fuite du potassium extracellulaire vers le secteur intracellulaire. [57]

De même l'iléus peut être à l'origine d'une anorexie donc d'une carence alimentaire responsable d'une hypokaliémie secondaire. Le traitement des troubles du métabolisme énergétique, comme la cétose et la stéatose hépatique peut être à l'origine d'une hypokaliémie. [57]

L'administration de glucose, d'insuline et de corticoïdes dans le cadre du traitement de ces maladies provoque une redistribution du potassium extracellulaire vers le secteur intracellulaire. Enfin, les déplacements de caillette, l'hyperglycémie et l'hyper-insulinémie peuvent aussi être à l'origine d'une hypokaliémie. [57]

### **III.2.3.Principales maladies liées au métabolisme des protéines :**

#### **III.2.3.a. Alcalose :**

L'alcalose correspond à la production excessive d'ammoniac dans le rumen qui provoque une élévation anormale du pH puis une alcalémie [57]. A l'origine, c'est un excès ou une mauvaise répartition des apports d'azote rapidement dégradable, associé à un manque d'énergie fermentescible. Cette situation est rencontrée lors de consommation en quantité importante d'urée, d'ensilage d'herbes de mauvaise qualité et d'herbes jeunes. [57]

### **III.2.4.Principales maladies liées au métabolisme énergétique :**

#### **III.2.4.a. Acidose :**

L'acidose lactique correspond à l'accumulation d'acide lactique dans le rumen : cette accumulation est responsable de la chute du pH ruminal et donc d'une acidémie. Cette maladie a pour origine la consommation excessive d'une ration riche en glucides solubles et amidon (céréales, betteraves, mélasse) et pauvre en cellulose brute et en fibres. Ces éléments sont rapidement dégradables en acide lactique dans le rumen. [57] [48] [38]

L'apport d'une grande quantité de composés organiques rapidement fermentescibles dans le rumen entraîne la production d'acides gras volatils (AGV). Les populations bactériennes (dont la croissance était au départ limitée par l'apport en énergie) ont une croissance accélérée car la compétition vis-à-vis des substrats qui leur sont nécessaires est moindre. [48][38]

Les AGV formés (acétate, et surtout butyrate et propionate) ont une concentration intra-ruminale plus élevée. Ils sont absorbés par la muqueuse ruminale (sous forme de BHB pour le butyrate). L'acide acétique va directement dans le sang. Le propionate est métabolisé dans le foie où il est transformé en glucose. [48][57]

L'augmentation du pH du liquide ruminal n'est pas forcément due à une augmentation des AGV, il s'agit surtout d'un défaut d'absorption des AGV par la muqueuse ruminale. La diminution du pH semble cependant nécessaire pour initier le processus d'adaptation de la muqueuse ruminale. [48]

Les difficultés pour diagnostiquer l'acidose ruminale subaiguë (ARSA) sont liées en partie à la discrétion des signes cliniques, associée à une absence de test de laboratoire spécifique.

Néanmoins, plusieurs symptômes retrouvés à différentes reprises au sein d'un même élevage sont fortement suggestifs de l'existence de cette pathologie. Cependant, ces symptômes ne sont en aucun cas pathognomoniques. [48]

L'appétit variable en fonction des repas est une indication de l'existence d'une acidose sublatente. La diminution de la MSI serait plutôt due à l'augmentation de production de propionate dans le rumen, plutôt qu'à la nature et à la longueur des fibres de la ration. [48][38]

Tympanisme ruminal, boiteries et fourbure, abcès hépatiques et pulmonaires sont aussi des signes qui renseignent sur la présence de l'ARSA. [48][38]

Une acidose métabolique latente pourrait être à l'origine d'une diminution de la réponse à la sécrétion d'insuline (l'insuline est sans cesse sécrétée du fait d'un apport élevé de propionate) par rapport à la quantité de glucose. Il y a alors une augmentation de la sécrétion de cortisol qui possède un effet immunosuppresseur via une activité phagocytaire moindre, et une diminution de la vitesse de migration des neutrophiles. [48]

#### **III.2.4.b. Cétose :**

Le mécanisme d'apparition des deux grands types de cétooses est a priori différent mais repose sur une même origine : le manque de disponibilité du glucose. [46] [3]

La cétose de type I se développe suite à un défaut d'apport en précurseurs de glucose dans l'alimentation, la néoglucogenèse hépatique quant à elle fonctionne normalement (déficit énergétique « vrai »). L'hypoglycémie qui apparaît dans ce cas est liée à un défaut d'apport. [46] [3]

La cétose de type II se développe suite à un défaut de néoglucogenèse, conséquence d'une atteinte hépatique (stéatose hépatique). La glycémie est généralement maintenue dans ce cas. [46][3]

La cétose de type 1 est la plus fréquemment rencontrée chez la vache laitière. Elle peut être primaire ou secondaire mais l'expression clinique de la cétose reste la même quel que soit le type de cétose. [3]

##### **III.2.4.b.1. Cétose de type I :**

La cétose ou acétonémie des vaches laitières est une maladie métabolique qui découle d'un dysfonctionnement du métabolisme des glucides et des lipides surtout dans les hépatocytes. Il s'agit d'un désordre du métabolisme énergétique d'origine multifactorielle. [46] [3] [48]

La cétose qui se traduit par une augmentation de la concentration en corps cétoniques ; nutriments énergétiques habituels des ruminants ; dans le sang, dans l'urine et dans le lait, fait suite à un déficit énergétique. Ce déficit peut apparaître dans diverses situations. [46][57]

Une alimentation riche en composés cétoènes (betteraves et ensilage mal récoltés) est susceptible de provoquer une cétose. Mais le plus souvent cette cétose apparaît lorsque la vache laitière est soumise à une ration déficitaire en énergie (comme en début de lactation). [57]

Au cours des 24 à 48 heures qui précèdent le vêlage, un fort déficit énergétique apparaît dû à la fois au stress de la mise bas et à une diminution du volume ruminal, alors qu'il existe un accroissement brutal du besoin en énergie (libération de glucocorticoïdes avant la mise bas). Ce besoin est encore accru après le vêlage par la production de lait. [48]

En début de lactation, le déficit énergétique physiologique atteint un seuil entraînant un manque de glucose et provoquant en réponse à cela une augmentation des corps cétoniques. Le déficit énergétique peut être causé par un manque d'énergie ingérée par rapport aux besoins de l'animal (ration trop pauvre par exemple) : on parle de cétose de type I primaire (clinique). [46][3][48]

Dans la cétose primaire, on distingue deux types de cétose : la cétose dite « de dépérissement » et la cétose nerveuse. Il s'agit de deux formes extrêmes qui sont souvent associées. [3]

Il peut également faire suite à une pathologie provoquant une diminution de l'appétit, dans ce cas, on parlera de cétose de type I secondaire (suite à un vêlage difficile, une fièvre de lait, une métrite puerpérale, un déplacement de la caillette, une boiterie...). [46][3]

Cette pathologie apparaît généralement dans les 6 premières semaines postpartum et plus rarement, elle peut apparaître dès la première semaine *postpartum*. Son incidence augmente avec le numéro de lactation pour atteindre son maximum lors de la troisième lactation. [46]

Lors d'un déficit énergétique on observe une mobilisation des réserves des tissus adipeux (réserves en AGNE). Les triglycérides sont lysés en glycérol (à 20%) et en acétyl CoA (à 80%). [57][46][3][48][38]

Le glycérol est un composé glucoformateur qui, une fois transformé en oxaloacétate permet de faire tourner le cycle de Krebs et donc de fournir de l'énergie aux cellules de la vache laitière. Mais la plus grande partie des triglycérides est transformée en acétyl CoA. [57]

L'acétyl CoA ne pouvant pas entrer dans le cycle de Krebs, car il existe un déficit en oxaloacétate, ces composés sont transformés en corps cétoniques. [57][3]

La cétose s'accompagne d'une diminution de la production laitière, une augmentation marquée de l'amaigrissement, une diminution de la quantité de matière sèche ingérée, une alternance diarrhée/constipation, l'isolement du reste du troupeau et exceptionnellement des signes nerveux. [48][46]

La confirmation d'une suspicion de cétose passe inévitablement par une recherche du taux de corps cétoniques dans le sang, dans l'urine ou dans le lait. Dans ce cas, la glycémie et l'insulinémie sont basses, et plus précisément, le rapport insuline/glucagon est très faible mais la concentration en AGNE est élevée. La recherche de la concentration plasmatique en BHB constitue le Gold Standard. [46][3][48][57]

Par ailleurs, il est possible de doser la glycémie et les acides gras libres plasmatiques pour évaluer l'importance de la cétose. [57]

En l'absence de traitement, des troubles nerveux peuvent apparaître : on peut parler de "cétose nerveuse". Cette dernière est moins fréquente (évolution dans 10% des cas de cétose). Des signes nerveux centraux peuvent être présents, tels qu'une hyperesthésie, du mâchonnement, du léchage, ou encore une hypermétrie ou une ataxie. [46][3]

Les principales lésions de cétose se situent au niveau du foie : apparaît pâle, légèrement hypertrophié et friable. [46] [3]

La cétose subclinique évolue rarement vers la cétose clinique. En général, dans 80 % des cas, la cétose subclinique évolue vers la guérison spontanée du fait de la mobilisation des réserves en graisse de l'animal. Toutefois, il s'en suit une répercussion sur les autres fonctions d'une vache telles que la reproduction et la production laitière. [46][3]

La cétose subclinique ne peut donc être diagnostiquée que par dosage des corps cétoniques dans le sang. Cette élévation des corps cétoniques est à bien mettre en lien avec un déséquilibre du métabolisme énergétique. [46][3][48]

Cependant, l'acétonémie subclinique évolue dans 20% des cas vers l'acétonémie clinique. L'apparition d'un ou de plusieurs cas d'acétonémie clinique dans un troupeau doit donc orienter le vétérinaire vers la recherche de l'acétonémie subclinique dans l'élevage. [3]

### III.2.4.b2. Cétose de type II (Stéatose) : Syndrome de la vache grasse

La stéatose est une maladie atteignant le foie des vaches laitières en début de lactation. Elle tient son origine d'un déficit énergétique mal géré en début de lactation allié à un apport énergétique excessif en antepartum (vache grasse ayant de grandes réserves corporelles) et ayant comme conséquence une importante mobilisation des réserves corporelles. [57]

La lipolyse libère des acides gras non estérifiés qui vont être transformés en triglycérides dans le foie. Les triglycérides sont en temps normal libérés dans le sang après avoir été pris en charge par un transporteur. Cette mobilisation des AGNE est d'autant plus massive que l'état d'engraissement de la vache est important. [57][46] [3] [48]

En début de lactation, la transcription du gène codant pour l'apolipoprotéine B, la principale molécule de transport des triglycérides dans le sang diminue, provoquant ainsi une diminution de la synthèse de cette protéine de transport. [48]

L'utilisation des AGNE par les mitochondries des hépatocytes est moins importante que lors de cétose de type I. Lorsqu'ils sont en trop grande quantité, ils sont stockés dans le foie sous forme de TG. Les capacités du foie à mobiliser les TG, lorsque le taux d'AGNE sanguin est élevé, sont faibles : c'est cette infiltration graisseuse du foie que l'on appelle la stéatose. [57] [46] [3]

L'apparition des signes cliniques est rapide à très rapide après vêlage (5 à 35 jours après vêlage). Les vaches qui développeront cette forme clinique sont en général des multipares hautes productrices laitières présentant un état d'embonpoint trop élevé en sortie de période de tarissement (par exemple, Holstein pesant de 680 à 820 kg). Cependant, cette maladie a déjà été décrite chez des génisses ayant reçu un aliment trop énergétique pendant les 6 à 12 mois précédant le part. Deux formes existent, aigue et subaiguë. [3]

Dans la forme aigue, la vache est apathique, anorexique. L'atonie ruminale est observée dès l'apparition des premiers signes. Les muqueuses sont cyanosées et parfois ictériques. L'évolution de la maladie conduit vers l'hypothermie. Le pronostic est alors très sombre : généralement, malgré la mise en place d'un traitement, l'évolution se fait vers la mort de l'animal en environ une semaine. [46][3][48][38]

Dans la forme subaigüe, les signes cliniques sont plus atténués et le pronostic est généralement plus favorable que dans la forme aigüe et une guérison est envisageable. Toutefois, la vache conservera des séquelles durant toute sa lactation : elle présentera des troubles de la fertilité. Une perte de poids importante accompagne souvent la guérison. [46][3][48][38]

Diverses affections (infectieuses ou non) telles que des mammites, des métrites, des affections podales, des déplacements de caillette sont en général considérés comme des complications de cette forme de cétose. [46][48][38]

### III.2.4.c. Impact sur la reproduction :

L'apparition d'un épisode de cétose subclinique postpartum est directement associée à une diminution des performances de reproduction. [3][46]

L'augmentation de la concentration sanguine en BHB relative à un épisode de cétose est associée à un risque relatif de développement de métrite compris entre 2 et 3,5 selon les auteurs. [46]

On ignore si les corps cétoniques dans le sang ont une influence directe sur la reprise de l'activité ovarienne, ou si cette dernière est seulement liée au déficit énergétique global. [48]

La fonction de reproduction requiert un certain apport énergétique. La cétose est associée à un retard dans la reprise de l'activité ovarienne et la formation d'ovaires kystiques après la mise bas. [48]

DOHOO et MARTIN (1984) ont montré que les vaches en acétonémie subclinique sont plus sujettes au développement de kyste ovarien qui altère la fonction de reproduction. [3] [48]

L'état de déficit énergétique accompagnant la cétose conduit à une diminution de la fréquence des pulses de GnRH, car le rétrocontrôle exercé par l'œstradiol sur l'hypothalamus est perturbé. Ceci entraîne une diminution de la sécrétion de LH provoquant une diminution de la vitesse de croissance folliculaire pouvant conduire à une anovulation et donc une période d'anoestrus. [46]

Un pic de déficit énergétique est plus néfaste que la présence d'un déficit énergétique constant et durable sur la première ovulation ; il existe une corrélation très significative entre l'intervalle vêlage-première ovulation et l'intervalle vêlage-pic de déficit énergétique. La première ovulation chez une vache laitière apparaît en moyenne 10 à 14 jours après le pic de déficit énergétique. [46]

La concentration élevée en BHB dans le sang ainsi que la durée de cette élévation sont corrélées négativement avec les chances de gestation après la première insémination. [48][3]

Pour des vaches ayant une concentration en BHB au-dessus de la normale pendant la première ou la deuxième semaine de la lactation, la probabilité d'une gestation après la première insémination est réduite de 20%. [48][46][3]

Pour les vaches ayant une concentration en BHB au-dessus de la normale pendant la première et la deuxième semaine, la probabilité d'une gestation après la première insémination est réduite de 50%. [48][46][3]

De plus, ces mêmes vaches ne présenteront leurs premières chaleurs qu'après 50 jours postpartum. [46][3]

Une partie du “centre de la reproduction”, celui qui gouverne le comportement sexuel et la sécrétion de la GnRH, se situe au niveau de différentes aires de l’hypothalamus (ventro-médian, para-ventriculaire, noyau arqué). Or ces zones sont également au carrefour de nombreux systèmes de contrôle de l’homéostasie.

Le stress est l’une des causes de baisse de fertilité dans les troupeaux. Il perturbe l’homéostasie de l’organisme et interfère au bon fonctionnement de l’axe hypothalamo-hypophysaire.

Toutes les maladies intercurrentes (mammite aiguë, boiterie, parasitisme...etc.), toutes les hyperthermies d’origine diverses, le déséquilibre nutritionnel mais aussi les manipulations de l’animal sont des formes de stress exerçant une action défavorable sur la fonction ovarienne et sur la qualité des ovocytes et des embryons.

Les traitements de super ovulation peuvent être une source de stress et un des facteurs responsables des échecs enregistrés dans les programmes de transfert embryonnaire.

Dans ce cadre-là, notre étude s’intéresse à l’effet du stress et des maladies métaboliques sur les résultats de la superovulation et sur la qualité embryonnaire lors d’une opération de production des embryons in vivo , menée au niveau d’un centre de recherche à Baba Ali .

Pour répondre aux objectifs recherchés, un suivi de la note d’état corporel ; en étroite relation avec le bilan énergétique ; avant et pendant le traitement de superovulation est effectué couplé au dosage de quelques paramètres biochimiques (AGNE, BHB ; cholestérol ; glycémie) et hormonaux (progestérone et cortisol) ; indicateurs de présence d’une des formes de stress.

## I.A.CADRE D’ETUDE :

### I.A.1.Organisme :

Notre étude a été réalisée au niveau d’un centre de recherche située à Baba Ali, dans la Wilaya d’Alger. Elle a concerné un effectif de 21 vaches laitières (mères à taureaux) hautes productrices de lait, destinées au programme de transfert embryonnaire.

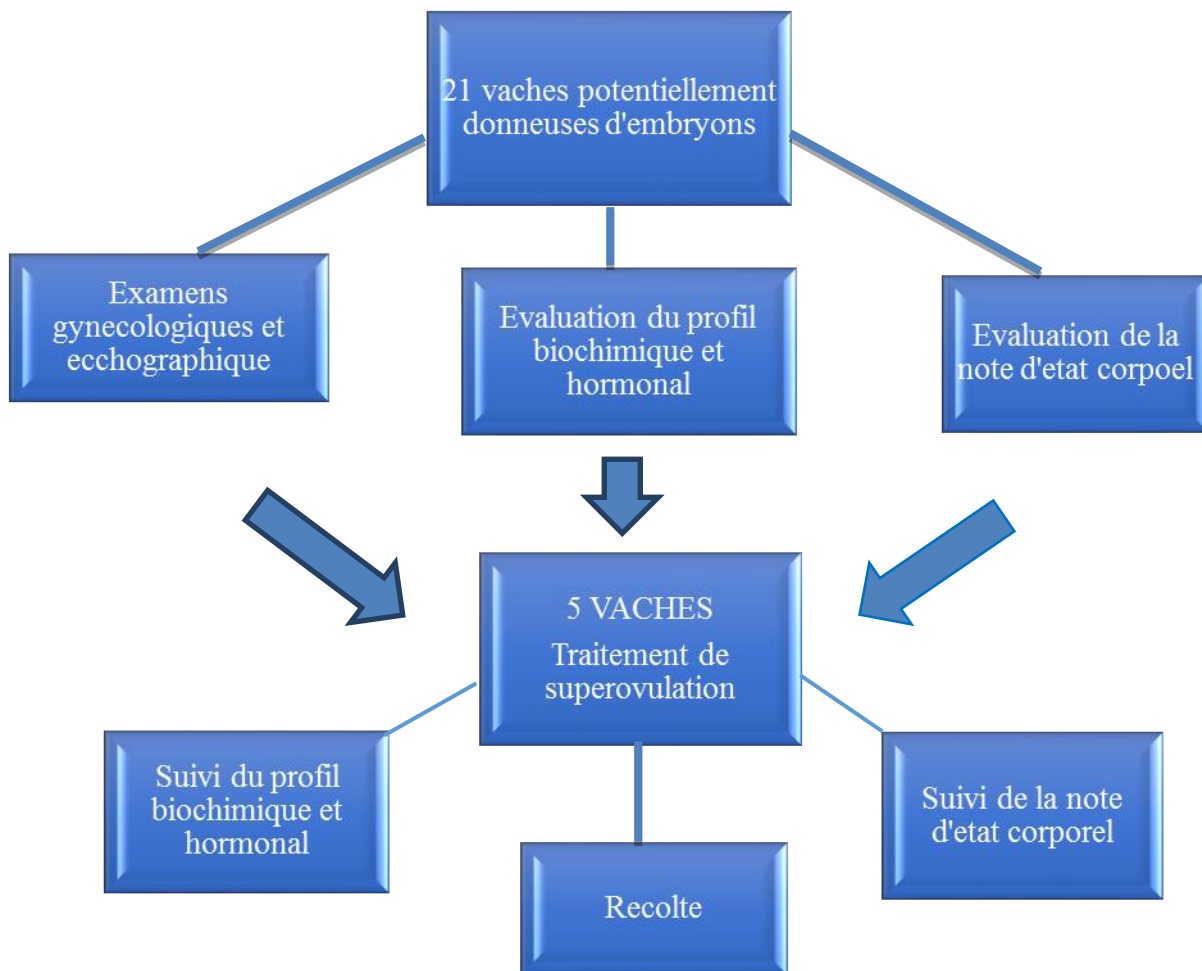
### I.A.2.Situation géographique :



**Figure 12 :** situation géographique du centre de recherche, Baba Ali. Alger

Baba Ali se situe dans la plaine de la Mitidja algéroise, à environ 20 km au sud du centre-ville d'Alger.

**I.B.METHODOLOGIE D'APPROCHE :**



**Figure 13 :** Méthodologie d'approche



## II. MATERIEL ET METHODES :

### II.1.MATERIEL :

#### II.1.a. Matériel biologique :

Vingt et une (21) vaches primipares laitières de haut potentiel génétique de race Montbéliard, Holstein, Normande et Fleckvieh, appartenant à un centre de recherche à Baba Ali Alger, font l'objet de l'étude.

Semence de taureau sélectionnée.

#### II.1.b. Matériel non biologique :

##### Pour les prélèvements :

Désinfectant (Alcool), compresses stériles, gants stériles, tubes secs sous vide avec vacutainer, aiguilles porte-aiguilles et seringues.

Centrifugeuse, appareil Freestyle Optium pour le dosage des BHB, Glucomètre Freestyle papillon-Vision pour le dosage de la glycémie.

##### Hormones :

- **FSH :**

Pour la stimulation ovarienne on a utilisé pour les deux protocoles la pFSH STIMUFOL 20%, REPROBIOL (SPRL) [Lyophilisat injectable de follitropine porcine et de Lutropine porcine] contenant un flacon de Lyophilisat et un autre flacon de 10 ml de solvant.

##### Lyophilisat :

Follitropine (pFSH) **500µg**  
Lutropine (pLH) **100µg**  
Excipient QSP un flacon de 10ml

##### Solvant :

Parahydroxybenzoate de méthyle (E218) **10000µg**  
Parahydroxybenzoate de propyle (E 216) **2500µg**

- **Prostaglandine (PGF<sub>2α</sub>) :**

Prostaglandine Enzaprost T, CEVA Santé Animal Solution Injectable Dinoprost (5mg). Flacon de 30ml.

- **PRID :**

PRID Delta, dispositif intra-vaginal imprégné de progestérone ; une fois appliqué procure une libération contrôlée de 1.55g de progestérone naturelle en garantissant le confort et l'absence d'efforts pour plus de résultats.

##### Pour IA :

Containers d'azote : Conservation des paillettes de la semence congelée.  
Thermos : Décongélation des paillettes. Il contient de l'eau à 37°C  
Mini Cutter : Pour ouvrir la paillette en vue de l'IA.  
Pistolet d'insémination : Introduction de la semence dans la cavité utérine.  
Gant et gel lubrifiant : Pour la fouille rectale.

**Pour la récolte et observation des embryons :**

**Laboratoire ambulante :** C'est un camion équipé d'une paille, d'une loupe binoculaire, d'un microscope inversé, d'une plaque chauffante, un bain-marie, d'un réfrigérateur et d'autres commodités nécessaires pour la manipulation des embryons et le transfert embryonnaire.

**Un échographe** : Permet la vérification de la réponse ovarienne au traitement.

**Sonde de récolte à 2 voies Woerlein CH18** pour la récolte des embryons.

**Dilatateur cervical** : Permet la préparation du col à la pénétration de la sonde de récolte.

**Anesthésique** : Xylocaïne 2%. Permet la contention de la vache.

**Flacons de collecte** : Pour y mettre le liquide de la récolte contenant les embryons.

**Seringue 20cc** : Sert pour l'injection de l'air dans le ballonnet.

**Seringue 50cc** : Pour l'injection et collecte du liquide de récolte.

**PBS (Phosphate Buffered Saline)** : Milieu de récolte des embryons.

**Pour le conditionnement des embryons :**

Paillettes 0,25 ml pour transfert directe.

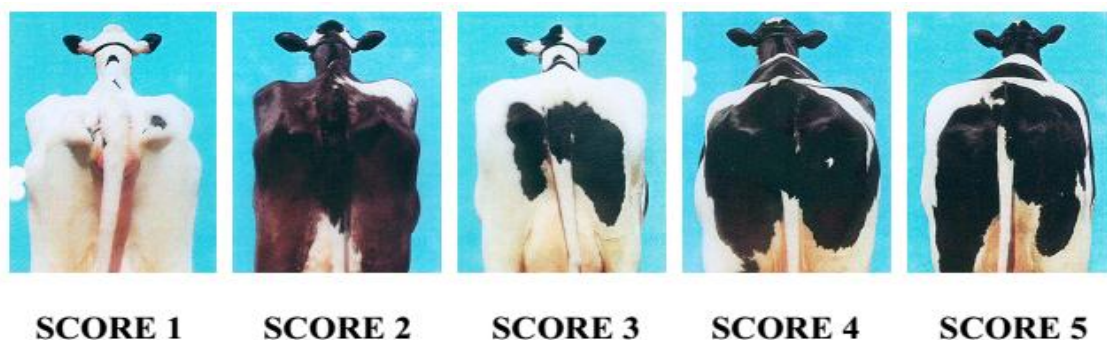
Cryo-conservateur.

Des paillettes pour conservation des embryons.

**II.2.METHODES :****II.2.1.Choix des animaux :**

L'évaluation de l'état général par des examens gynécologiques (absence de lésions génitales); échographiques (absence de kystes), suivi de la cyclicité (cycles réguliers 2 voire 3 œstrus); estimation de la durée du post partum ( voir annexe VI) et de la note d'état corporel (2.5-3), cette dernière est basée sur l'inspection visuelle des régions caudales et lombaires sur une grille de notation de 1 à 5 décrite par **Edmonson et al (1989)**.

Absence (< 30 j) de traitements antiparasitaires ou de vaccinations.



**Figure 14** : Scores corporels décrits par Edmonson 1989. [91]

## II.2.2. Evaluation des profils biochimiques et hormonaux :

### Prélèvements :

Les prélèvements sont effectués pour tous les animaux retenus pour le programme de transfert embryonnaire et 4 prises de sang sont réalisées : quelques jours avant l'entame du protocole de superovulation, le premier jour du traitement, le jour de la réalisation de l'insémination artificielle et la dernière prise le jour de la récolte.

Les prélèvements ont été réalisés à partir de la veine caudale et conservés dans des tubes secs de 5 ml étiquetés (référence de la vache ; numéro et jour de prélèvement)

Les tubes sont transportés dans une glacière (4°C) et acheminés vers le laboratoire d'analyses ou leur centrifugation de 3000 g pendant 10 minutes a été réalisée.

Le plasma est transféré dans des cônes Eppendorf pour une congélation à (-18°C) jusqu'à la réalisation des dosages.

### Dosages :

Le dosage du BHB et de la glycémie est assuré par le lecteur portable (OPYIUM EXCEED) ; les échantillons font l'objet d'une réaction d'oxydoréduction. Le dosage est effectué comme suit :

Insertion de la bandelette dans le lecteur.

Une goutte de sérum est déposée dans l'emplacement réservé à cet effet sur la bandelette quand le lecteur l'indique. Le résultat sera affiché au bout de 10 seconds après le dépôt de la goutte.

Les AGNE sont dosés au niveau du laboratoire de biotechnologie lié à la reproduction grâce à un appareil portable le DVM-NEFA (Principe de la spectrophotométrie).

Le dosage des autres paramètres biochimiques (Cholestérol ; urée, albumine ; protéines totales) et hormonaux (cortisol et progestérone) sont effectués au niveau du laboratoire privé de biologie clinique de M<sup>r</sup> BOUDJEBLA sis à Tizi-Ouzou sur automates Cobas c 6000 et certains sur automates de ROCHE ELYSYS 1010. (Voir annexe IV)

## II.2.3. Traitement de super ovulation :

Au cours de cette étude on a utilisé deux protocoles différents en se basant sur des chaleurs naturelles et induites.

**Tableau 1 :** Protocole de super ovulation N°1

Protocole N°1	Chaleurs naturelles	Chaleurs induites	
<b>J0</b>		<b>J0</b>	Mise en place du PRID
<b>J1</b>	FSH (2ml) matin et soir	<b>J7</b>	FSH (2ml) matin et soir
<b>J2</b>	FSH (1.5ml) matin et soir	<b>J8</b>	FSH (1.5ml) matin et soir
<b>J3</b>	FSH (1ml) matin et soir+ Prostaglandine (3ml) le matin	<b>J9</b>	FSH (1ml) +Prostaglandine (3ml) + Retrait du PRID matin + 1ml le soir
<b>J4</b>	FSH (0.5ml) matin et soir	<b>J10</b>	FSH (0.5ml) matin et soir
<b>J5</b>	IA matin et soir	<b>J11</b>	IA matin et soir
<b>J12</b>	Récolte	<b>J18</b>	Récolte

Le protocole N°1 est basé sur des injections biquotidiennes espacées de 12 heures, réparties sur 4 jours successifs et à doses décroissantes. Les vaches sont traitées par une solution 500µg de pFSH diluée dans 10 ml de solvant.

L'insémination artificielle se fait le lendemain de la dernière injection ; donc à J5 ou à J11 selon que les chaleurs sont naturelles ou induites.

La récolte embryonnaire se fait 7jours post insémination.

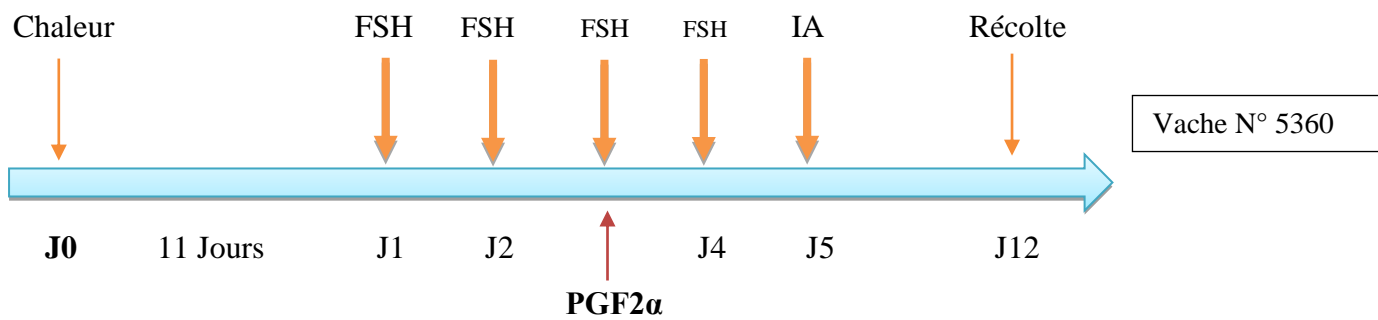


Figure 15 : Digramme de superovulation du Protocole N° 1 sur chaleur naturelles

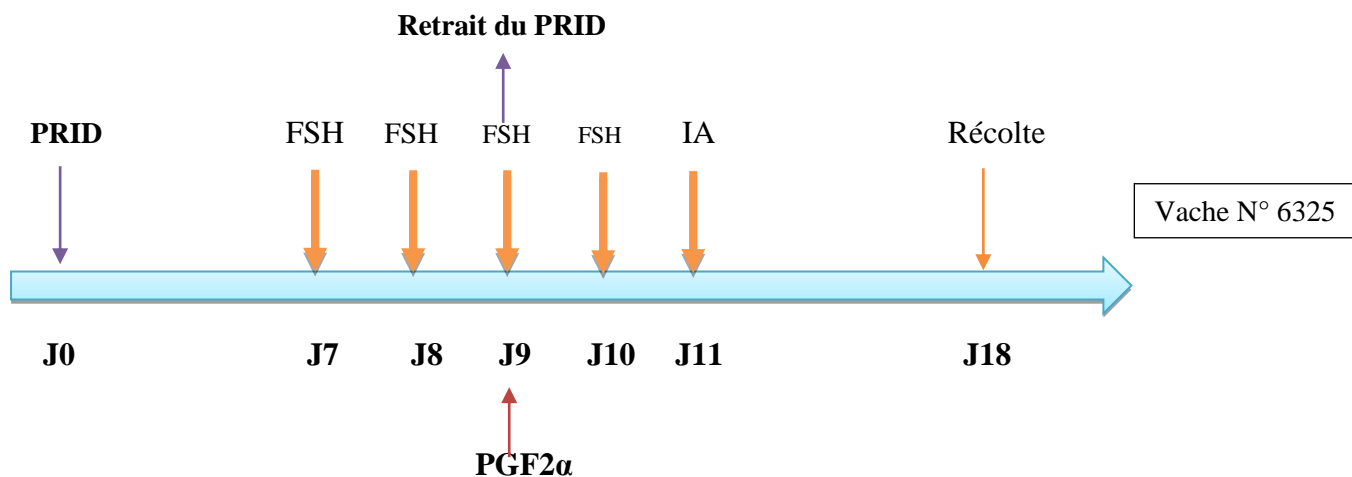


Figure 16 : Diagramme de superovulation du protocole 1 sur chaleurs induites.

Tableau 2 : Protocole de superovulation N°2.

Protocole N°2	Chaleurs naturelles	Chaleurs induites	
<b>J0</b>		<b>J0</b>	Mise en place du PRID
<b>J1</b>	FSH (3 ml) matin	<b>J7</b>	FSH (3 ml) matin
<b>J2</b>	FSH (3 ml) matin	<b>J8</b>	FSH (3ml) matin
<b>J3</b>	FSH (3ml) + Prostaglandine (3ml) le matin	<b>J9</b>	FSH (3ml) +Prostaglandine (3ml) + Retrait du PRID le matin
<b>J5</b>	IA matin et soir	<b>J11</b>	IA matin et soir
<b>J12</b>	Récolte	<b>J18</b>	Récolte

Le protocole N°2 est basé sur des injections quotidiennes uniques espacées de 24 heures et à dose constante, réparties sur 03 jours successifs. Les vaches sont traitées par une solution de 500µg de p FSH diluée dans 9 ml de solvant.

L'insémination artificielle se fait le lendemain de la dernière injection ; donc à J5 ou à J11 selon que les chaleurs sont naturelles ou induites.

La récolte embryonnaire se fait 7jours post insémination donc à J12 ou à J18.

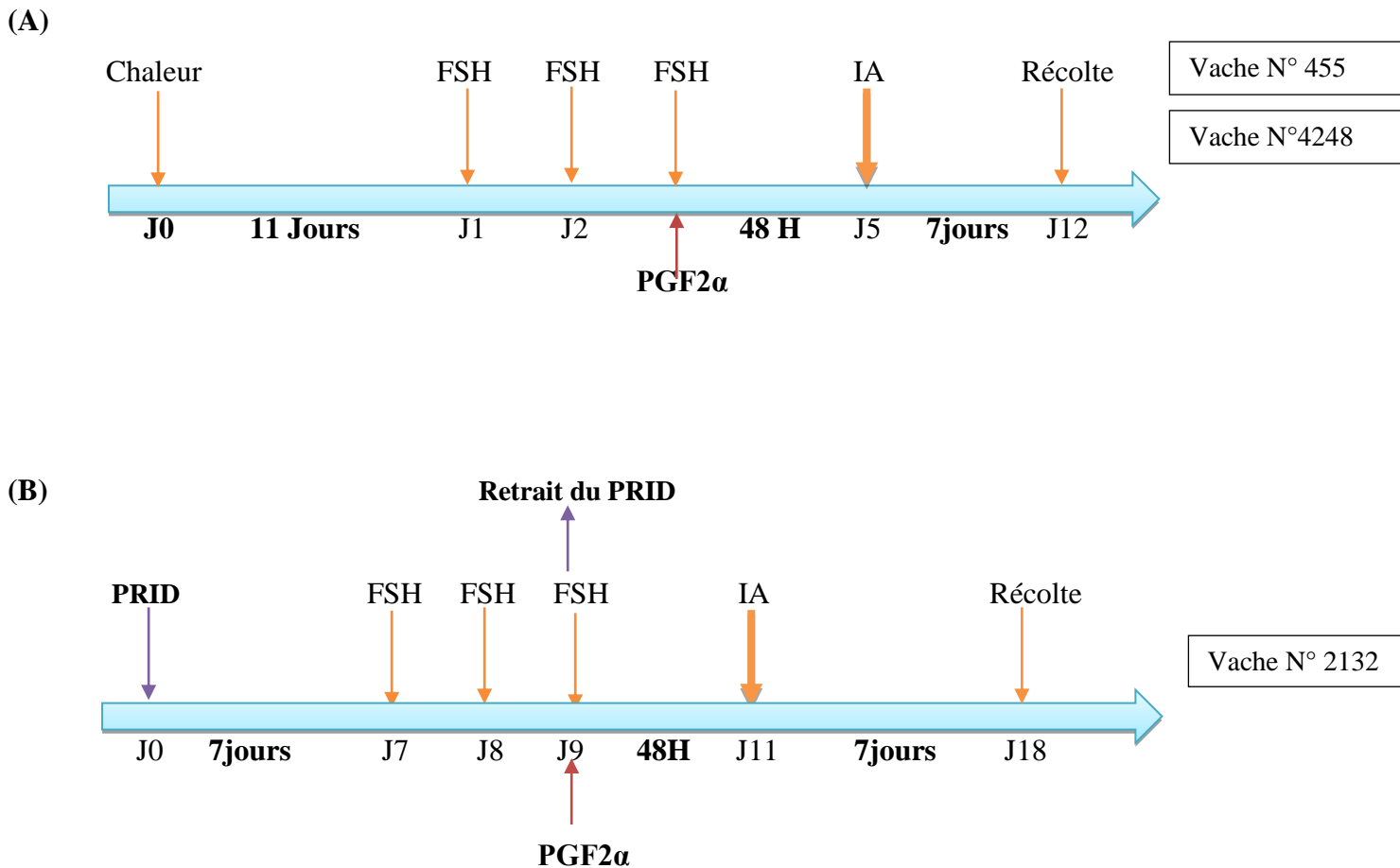


Figure 17 : Diagramme du protocole N° 2. (A) : Chaleurs naturelles (B) : Chaleurs induites

### II.2.4. La récolte et la recherche embryonnaire :

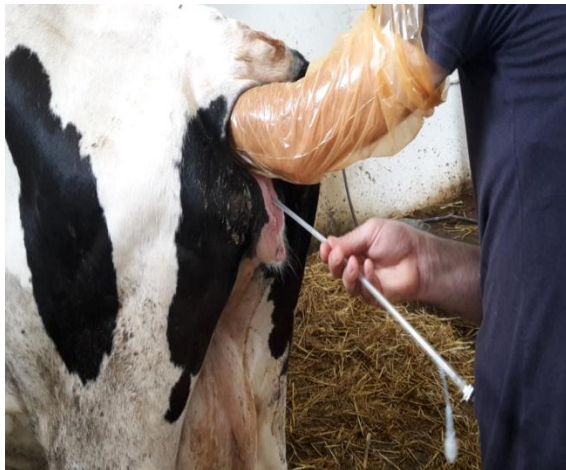
Appréciation de la réponse ovarienne par palpation transrectale et confirmation par échographe avant d'entamer la récolte embryonnaire.



(1) : Fixation de la vache



(2) : Injection de l'anesthésie épidurale



(3) : Introduction de la sonde



(4) : Gonflement du Ballonnet



(5) : Collecte du liquide



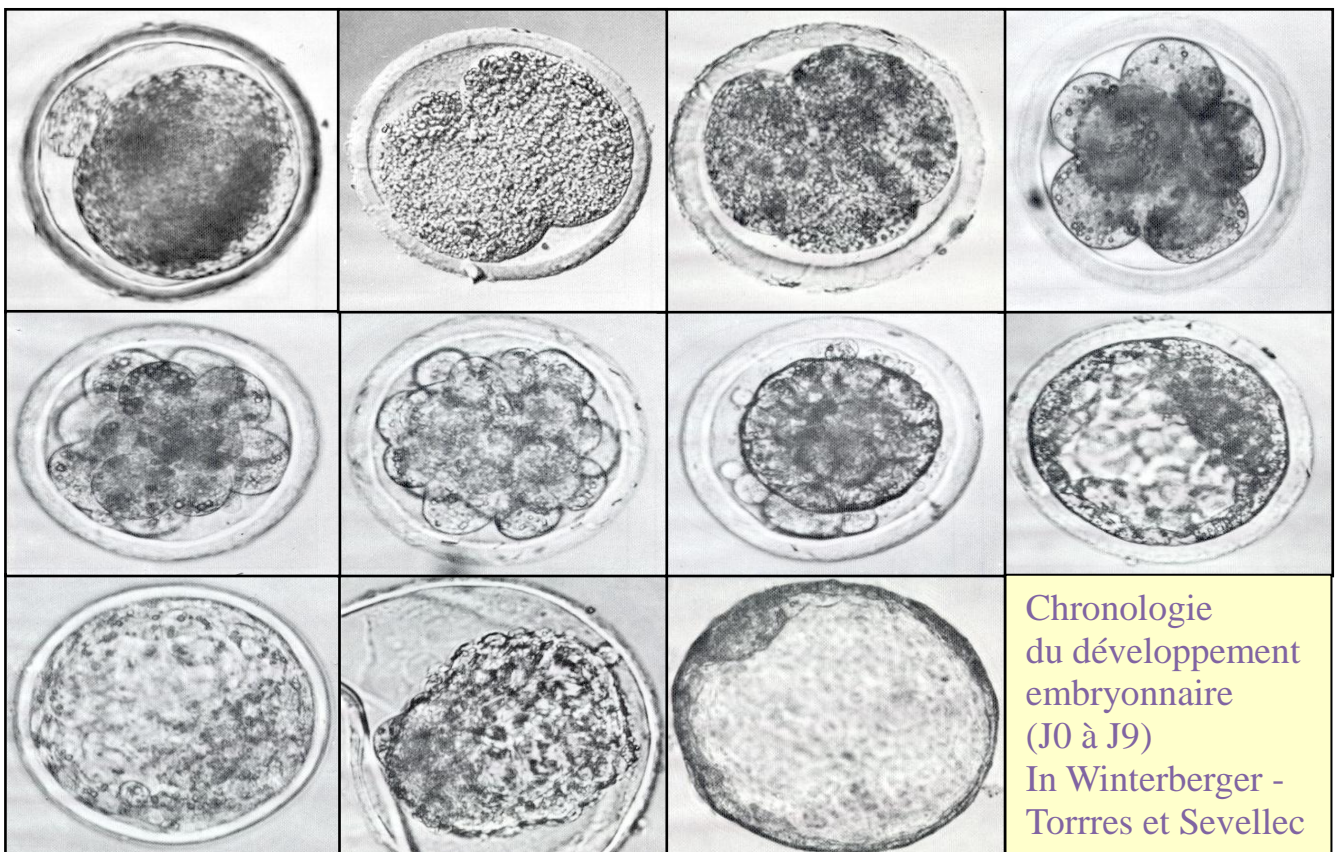
(6) : Recherche des embryons.

**Figure 18** : Etapes de la récolte embryonnaire.

Le liquide de récolte contenant les embryons et /ou les ovocytes doit être conservé à une température de 37°C sur une plaque chauffante.

Après décantation environ 20 à 30 minutes de la récolte ; la recherche des embryons dans le précipité commence à l'aide de boîtes de Pétrie quadrillées et d'un microscope inversé.

Estimation de la qualité, du stade de développement des embryons et classification de ces derniers pour déterminer leur devenir (transfert frais ; congélation ou élimination).



**Figure 19** : Différents stades du développement embryonnaire. [80]

## III. RESULTATS ET DISCUSSION :

## III.I. RESULTATS :

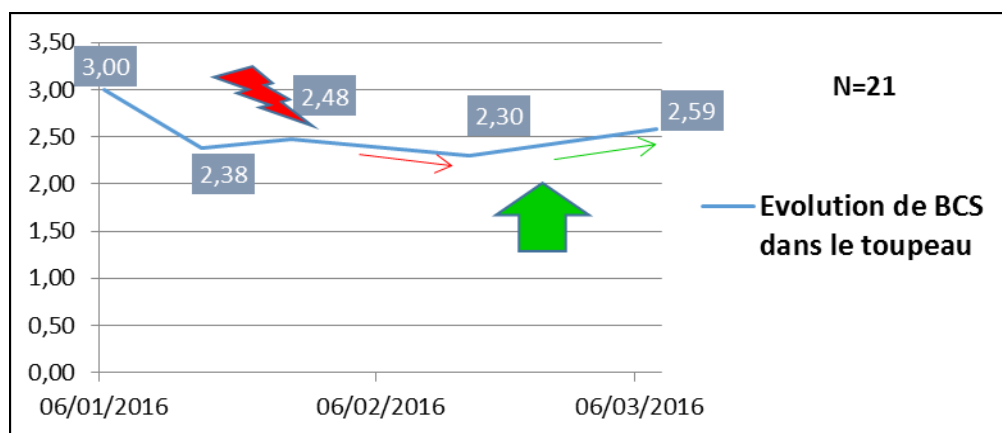
Note de l'Etat Corporel : NEC

Figure 20 : Evolution de BCS dans le troupeau

La figure n°20 illustre la variation de la NEC (BCS) de l'ensemble des vaches pour la période allant de Janvier à Mars 2016.

La moyenne de la Note d'Etat Corporel a connu une baisse importante au cours du premier mois et la première moitié du deuxième mois ; elle est passée de **3** à **2.30 (-0.7)**.

Une augmentation progressive a été enregistrée à partir de la deuxième moitié du mois de Février pour atteindre une valeur de **2.59** à la fin du mois de Mars.

Tableau 03 : Evaluation des NEC des 5 vaches super-ovulées.

Date d'observation	Nec 6325	Nec 2132	Nec 5360	Nec 0455	Nec 4248	Valeur moyenne de la NEC
<b>Contrôle de routine</b>						
06/01/2016	3.5	2.5	2.75	2.5	/	2.81
17/01/2016	/	2.5	3	2.75	3	2.81
27/01/2016	/	/	3	2.5	3	2.83
16/02/2016	3	2.5	/	/	3	2.83
Moyenne	<b>3.25</b>	<b>2.5</b>	<b>2.91</b>	<b>2.58</b>	<b>3</b>	
<b>Traitement de super ovulation</b>						
Avant traitement	3	2.75	2.75	2.75	2.75	B
Début du traitement	3.25	2.75	2.75	2.75	2.5	2.8
Jour IAC	3.25	2.75	2.75	2.75	2.5	2.8
Jour de la récolte	3.25	2.75	2.75	2.75	2.5	2.8
Moyenne	<b>3.18</b>	<b>2.75</b>	<b>2.75</b>	<b>2.75</b>	<b>2.56</b>	



Le tableau n°03 présente les notes d'état corporel des vaches super-ovulées quelques mois avant le programme de transfert embryonnaire, pendant le traitement de superovulation et le jour de la récolte embryonnaire.

La NEC moyenne des cinq vaches reste constante pour les deux périodes d'étude, elle est de **2.81-2.83** pour les observations du mois de Janvier et de Février et de **2.80** pour la période qui couvre l'opération du transfert embryonnaire.

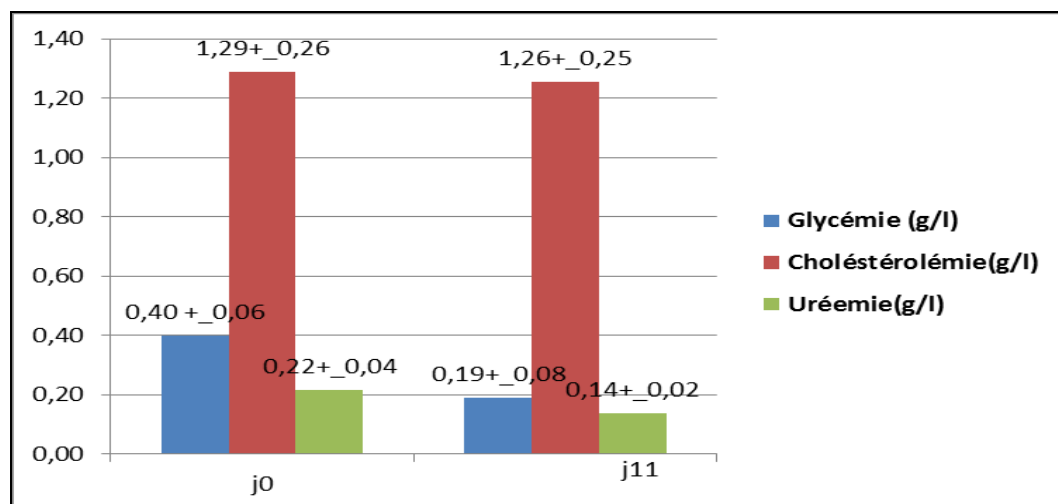
Sur le plan individuel, on a enregistré des variations dans la valeur moyenne de la NEC pour chacune des vaches super-ovulées entre les deux périodes d'étude.

Trois vaches ont présenté une diminution de la NEC moyenne ; pour la vache N° **6325** elle a basculé de 3.25 à 3.18 (**-0.07**), la N° **5360** a basculé de 2.91 à 2.75 (**-0.16**) et la N°**4248** était à 3 dans la première période et à 2.56 (**-0.44**) dans la deuxième période.

La vache N°**2132** a connu une augmentation de sa NEC moyenne entre les deux périodes, elle est passée de 2.5 à 2.75 (**+ 0.25**). Idem pour la N° **455** qui est passée de 2.58 à 2.75 (**+0.17**).

La NEC des vaches N°**2132**, **5360** et **455** était de 2.75 tout au long du protocole. La NEC de la vache N°**4248** a diminué de **0.25** alors que la vache N°**6325** a augmenté de **0.25** entre l'évaluation avant l'entame du traitement et le jour du début des injections pour rester stable pour le reste des observations .

### Paramètres biochimiques :



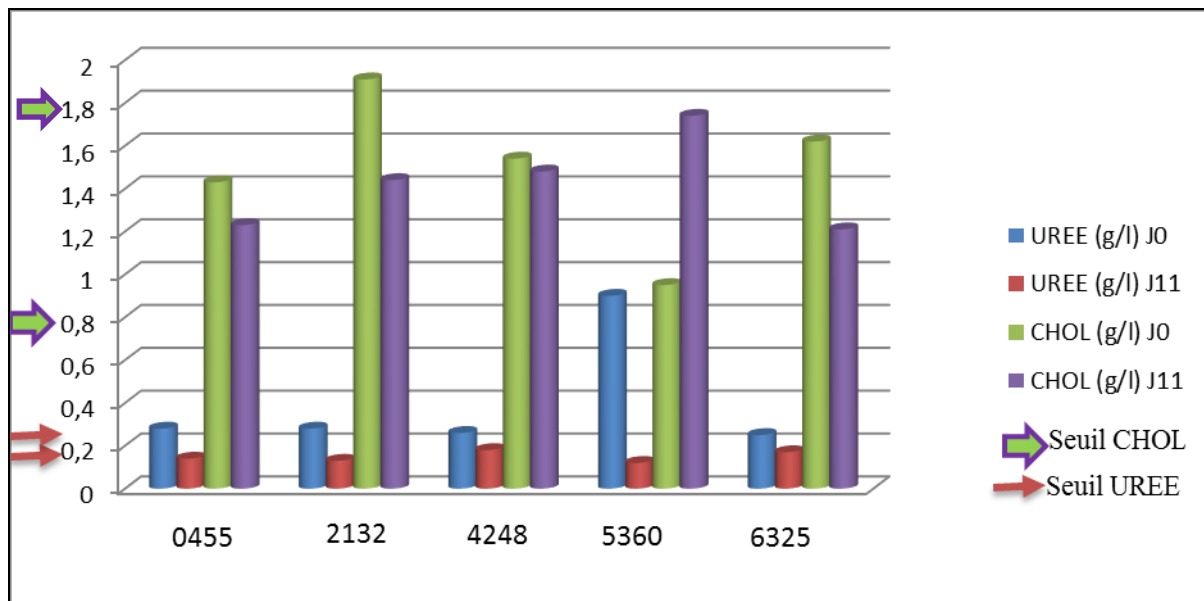
**Figure 21 :** Variation des moyennes de la glycémie, cholestérolémie et Urémie entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.

La figure n°21 illustre la variation des moyennes des taux de glucose, du cholestérol et de l'urée dans le sang dans un intervalle de temps de 11 jours pour l'ensemble des vaches étudiées.

Les résultats enregistrés révèlent un taux moyen de glucose au-dessous de la valeur physiologique normale pour les deux dosages effectués. Pour J0 le taux est de **0.4 [±0.06] g/l**, il diminue à **0.19 [±0.08] g/l** à J11.

L'urémie moyenne de l'ensemble des vaches notée à J0 est de **0.22 [±0.04] g/l** et elle régresse à **0.14 [±0.02] g/l** à J11 ; une valeur inférieure à la valeur sanguine normale.

Pour le taux moyen du cholestérol, on a enregistré une légère variation entre J0 et J11. Il est passé de **1.29 [±0.26] g/l** à **1.26 [±0.25] g/l**. Cependant, les deux valeurs sont des valeurs physiologiques normales.



**Figure 22 :** Variation des taux (en g/l) de l'urée et du cholestérol pour les vaches super-ovulées entre J0 et J11

Le taux de l'urée pour les cinq vaches super-ovulées a suivi une même cinétique. On a noté une diminution de l'urémie entre J0 et J11. Les valeurs des vaches N°455 et 2132 sont passées respectivement de **0.28 g/l** à **0.14 g/l (-0.14)** et à **0.13 g/l (-0.15)**.

Les valeurs des vaches N°4248 et 6325 sont aussi passées respectivement de **0.26 g/l** et **0.25 g/l** à **0.18 g/l** et **0.17 g/l (-0.08)**.

Les vaches précédemment citées ont présenté des urémies normales à J0 et des hypo-urémie à J11, alors que pour la vache N° 5360 on a enregistré une hyper-urémie de **0.9 g/l** à J0 qui a chuté à **0.12 g/l (-0.78)** à J11.

Pour le cholestérol, on a enregistré des taux physiologiques normaux à J0 et à J11 pour l'ensemble des vaches sauf pour la vache N°2132 qui a présenté à J0 une valeur de **1.91 g/l**, un taux au-dessus de la normale.

Cependant, on a observé une diminution dans les taux entre J0 et J11 pour les vaches N° 455, 2132, 4248 et 6325. Seule la vache N° 5360 a présenté une augmentation de son taux de cholestérol qui est passé de **0.95 g/l** à **1.74 g/l** à J11.

**Tableau 04:** Taux de glucose en (g/l) durant la période de l'opération du transfert embryonnaire.

N° de vache	5360	455	4248	6325	2132	Moyenne
Avant traitement	0,45	0,51	0,54	/	/	0,5
Début du traitement	0,79	0,79	0,6	0,54	0,44	0,63
Jour IA	0,74	1,01	0,6	/	/	0,78
Jour de la récolte	/	/	0,36	/	/	0,36
Moyenne	0,66	0,77	0,52	0,54	0,44	

Le tableau n°04 présente les taux de glucose (en g/l) des vaches super-ovulées dosés avant le traitement de superovulation, le jour de l'entame des injections, le jour de l'IA et le jour de la récolte embryonnaire. Malheureusement certains prélèvements étaient hémolysés.

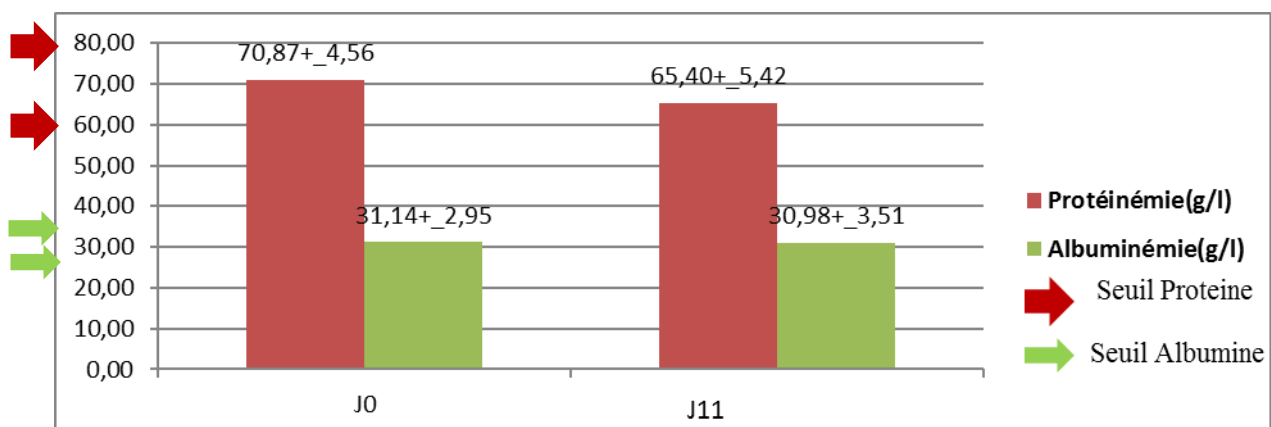
On a enregistré des valeurs légèrement au-dessous de la normale pour les vaches N°455 (0.51g/l) et N°4248 (0.54g/l) avant le début du traitement et un taux de 0.45 g/l pour la vache N°5360.

Une hyperglycémie de 0.79 g/l a été observée pour les vaches N°5360 et N°455 le jour de l'entame du traitement de superovulation, une glycémie normale de 0.6 g/l pour la vache N°4248 et une hypoglycémie de 0.54 g/l et 0.44 g/l respectivement pour les vaches N° 6325 et 2132.

Le jour de l'IA, la vache N°5360 a présenté une diminution de sa glycémie comparée au dosage précédent mais reste toujours en hyperglycémie avec un taux de 0.74g/l.

Pour la vache N°455, le jour de l'IA sa glycémie a continué d'augmenter pour atteindre la valeur de 1.01g/l, alors que pour la vache N°4248 on a observé une valeur normale de 0.6 g/l, égale à celle enregistrée pour le prélèvement précédent.

Le jour de la récolte embryonnaire, un seul résultat a pu être récupéré, il s'agit du résultat de la vache N°4248 qui a présenté une hypoglycémie de 0.36g/l. Les autres prélèvements étaient hémolysés.

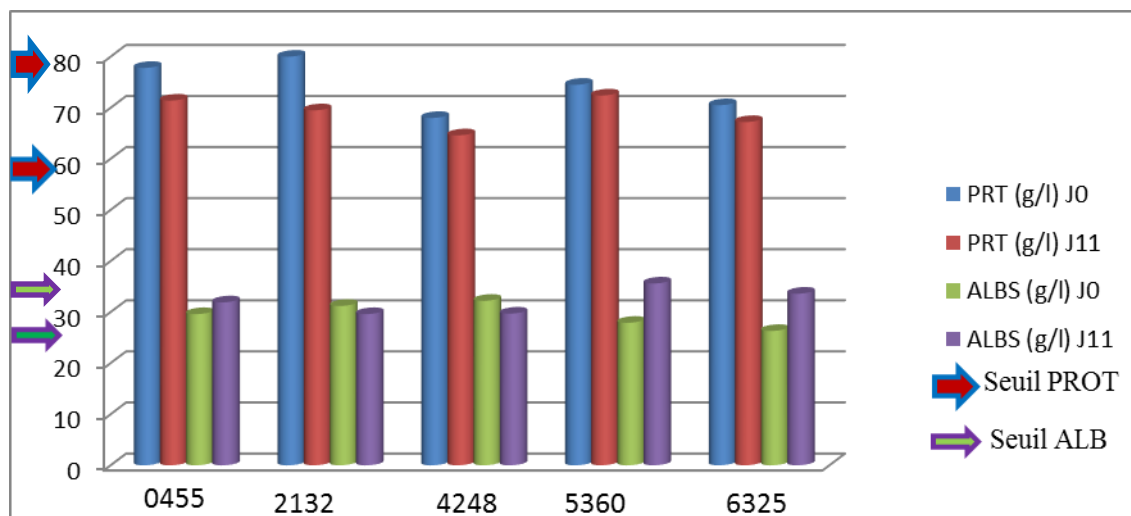


**Figure 23 :** Variation des moyennes de la protéïnémie et de l'albumine (en g/l) entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.

La figure n°23 illustre l'évolution des moyennes des taux de protéines et de l'albumine (en g/l) dans le sang des 21 vaches étudiées entre J0 et J11.

D'après les résultats recueillis, on a constaté une légère variation dans la moyenne des taux de l'albumine entre J0 et J11, elle est passée de **31.14 [±2.96] g/l** à **30.98 [±3.51] g/l** à J11. Les deux valeurs sont physiologiquement normales.

Idem pour la protéinémie, on a enregistré des taux physiologiques normaux à J0 et à J 11 avec une diminution dans la valeur moyenne qui est passée de **70.87[±4.75]g/l** à **65.40 [±5.42] g/l** à J 11.



**Figure 24 :** Variation des taux de protéinémie et de l'albumine entre J0 et J11 pour les vaches super-ovulées.

La figure n°24 présente la variation des taux (en g/l) des protéines et de l'albumine entre J0 et J11 pour chacune des vaches super-ovulées.

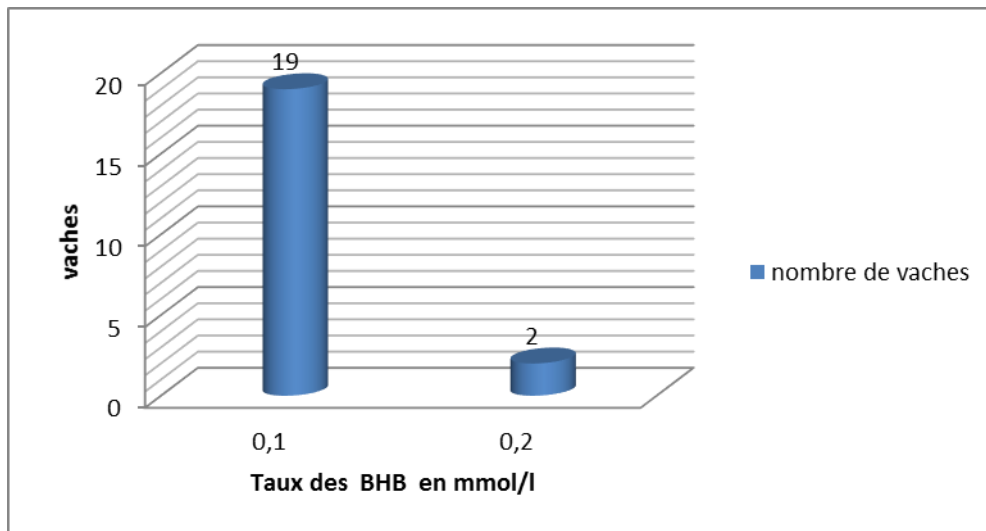
Une diminution de la protéinémie à J11 a été observée pour l'ensemble des vaches dont la plus importante a été enregistrée pour la vache N° **2132** qui a basculé de **80g/l** (limite supérieure des valeurs normales) à **69.5 g/l**. Les cinq vaches ont présenté des protéinémies normales à J0 et à J11.

Les vaches N° **4248** et **2132** ont présenté une légère diminution dans le taux de l'albumine à J11, elles sont passées respectivement de **32.2g/l** et **31.2 g/l** à **29.7g/l** et **29.6g/l**.

La vache N°**455** est passée d'une albuminémie de **29.5g /l** à **31.9g/l** à J 11. Idem pour les vaches N° **5360** et **6325** pour lesquelles on a noté les valeurs les plus basses à J0 au voisinage de la limite inférieure des valeurs physiologiques normales ,elles sont passées respectivement de **27.9 g/l** et **26.3 g/l** à **35.6 g/l** et **33.6 g/l** ;des valeurs seuils des valeurs de référence.

Les albuminémies enregistrées à J0 et à J11 sont normales sauf pour la valeur de **26.3g/l** au-dessous de la normale, observée à J0 pour la vache N° **6325** et la valeur de **35.6 g/l** au-dessus des valeurs de référence, enregistrée à J 11 pour la vache N°**5360**.

Les valeurs de l'albumine enregistrées pour toutes les vaches, sont toutes inférieures au rapport : Taux PT/2 correspondant.



**Figure 25 :** Taux du BHB pour l'ensemble des vaches étudiées.

La figure n°25 montre des taux normaux de BHB dans le lait pour l'ensemble des vaches étudiées avec des valeurs de **0.1 m mol/l** pour la majorité et de **0.2 m mol/l** pour seulement deux vaches. **Ce résultat est récupéré d'une autre étude faite en parallèle avec la nôtre.**

**Tableau 05 :** Taux de BHB (*mmol/l*) durant la période de l'opération du transfert embryonnaire.

N° de vache	5360	455	4248	6325	2132	Moyenne
Avant traitement	0.7	2.2	0.8	/	/	1.23
Début du traitement	0.4	0.8	0.2	0.3	0.5	0.44
Jour IA	0.2	0.4	0.4	/	/	0.33
Jour de la récolte	/	/	0.3	0.3	0.3	0.3
Moyenne	0.43	1.13	0.42	0.3	0.4	

Le tableau n°05 présente les taux sanguins de BHB (en mmol/l) des vaches super-ovulées dosés avant le traitement de superovulation, le jour de l'entame des injections, le jour de l'IA et le jour de la récolte embryonnaire. Malheureusement certains prélèvements étaient hémolysés.

Les trois résultats qui ont pu être récupérés des cinq prélèvements effectués avant l'entame du traitement de superovulation, révèlent un taux moyen de **1.23 mmol/l** au-dessus de la valeur limite du groupe, et sur le plan individuel des taux physiologiques normaux pour les vaches N° **5360** et N° **4248** avec des taux respectivement de **0.7mmol/l** et de **0.8 mmol/l** et une valeur de **2.2 mmol/l** au-dessus de la valeur de référence( à l'échelle individuelle) pour la vache N° **455**.

Le jour du début du traitement, on a observé une diminution dans les taux du BHB pour les vaches N°5360 avec un taux de **0.4mmol/l**, la vache N° 455 avec un taux de **0.8mmol/l** et la N° 4248 avec un taux de **0.2mmol/l** par rapport aux taux enregistrés avant le traitement.

Les cinq vaches ont présenté des taux physiologiques normaux et un taux moyen normal de **0.44mmol/l** en début du traitement de superovulation.

Pour le jour de l'IA, les résultats récupérés montrent une diminution du taux de BHB pour les vaches N°5360 (**0.2mmol/l**) et N°455 (**0.4mmol/l**) et une augmentation pour la vache N° 4248 (**0.4mmol/l**). Les résultats des deux autres vaches n'ont pas pu être récupérés.

Un taux de **0.3mmol/l** est obtenu pour les vaches N°4248, 6325 et 2132 le jour de la récolte embryonnaire. Les autres prélèvements n'ont pas pu être dosés (sang hémolysé).

Le taux moyen des trois dosages récupérés pour la vache N° 455 est de **1.13mmol/l**. Il est le plus grand taux moyen enregistré à l'échelle individuelle.

**Tableau 06 :** Taux des AGNE en (*mmol/l*) durant la période de l'opération du transfert embryonnaire.

N° de vache	5360	455	4248	6325	2132	Moyenne
Avant traitement	0,86	0,64	0,61	/	/	0.7
Début du traitement	1,40	0,75	0,33	0,53	1,31	0.86
Jour IA	2,92	0,10	1,06	/	/	1.36
Jour de la récolte	/	/	1,03	1,55	1,28	1.28
Moyenne	1.72	0.49	0.75	1.04	1.29	

Le tableau n°06 présente les taux sanguins des AGNE (en mmol/l) des vaches super-ovulées dosés avant le traitement de superovulation, le jour de l'entame des injections, le jour de l'IA et le jour de la récolte embryonnaire. Malheureusement certains prélèvements étaient hémolysés.

Des cinq prélèvements effectués avant le début du traitement de superovulation, on n'a récupéré que trois résultats du dosage des AGNE. Les vaches N°455 et 4248 ont présenté des concentrations sanguines normales avec des valeurs respectivement de **0.64 mmol/l** et de **0.61mmol/l**. Alors qu'une concentration de **0.86 mmol/l** au-dessus de la valeur physiologique normale a été enregistrée pour la vache N°5360.

Un taux élevé de **1.31 mmol/l** a été enregistré pour la vache N°2132 le jour de l'entame des injections, idem pour les vaches N° 5360 et 455 qui ont enregistré une augmentation dans le taux des AGNE en passant respectivement de **0.86 mmol/l** à **1.40 mmol/l** et de **0.64mmol/l** à **0.75mmol/l**.

On a noté une diminution dans la concentration des AGNE pour la vache N°4248, elle est passée de **0.61mmol/l** à **0.33mmol/l**. La vache N° 6325 a présenté une concentration normale de **0.53mmol/l** pour son premier résultat récupéré.

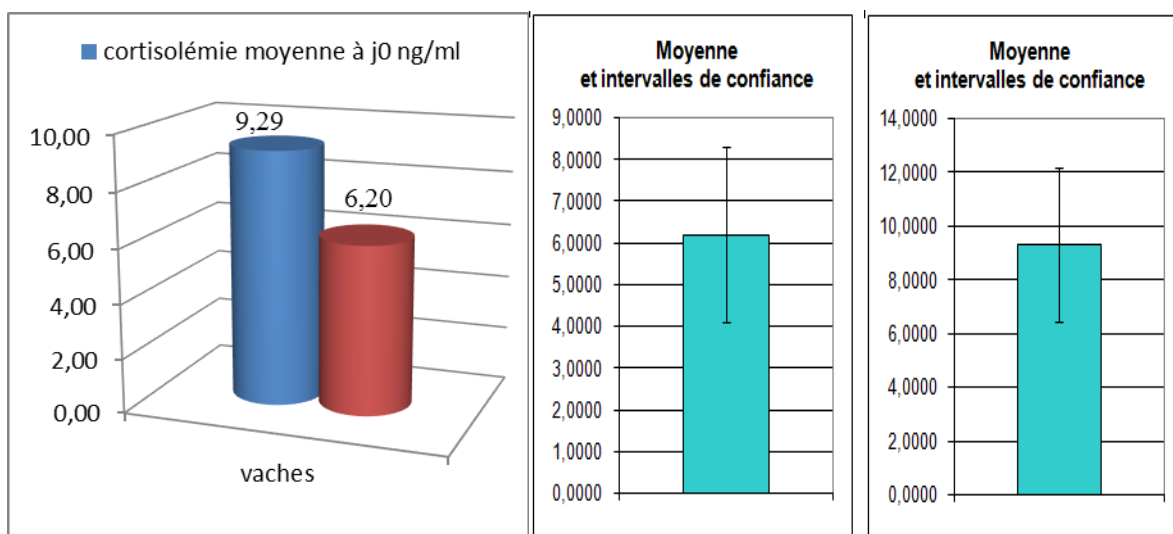
Les dosages effectués le jour l'IA révèlent une augmentation dans les taux des AGNE pour les vaches N°5360 (2.92mmol/l) et 4248 (1.06 mmol/l) et une diminution pour la vache N°455 qui a présenté un taux de 0.10mmol/l.

Des concentrations élevées ont été observées le jours de la récolte embryonnaire ;pour la vaches N° 4248 on a noté une concentration de 1.03mmol/l , 1.55mmol/l pour la vache N°6325 et pour la vache N°2132 une concentration de 1.28mmol/l.

Seule la vache N°455 a présenté un taux moyen normal avec une valeur de 0.49mmol/l , les taux moyens des quatre autres vaches sont au-dessus de la valeurs de référence ;1.72 mmol/l pour la vache N°5360 ,1.29mmo/l pour la vache N°2132 , 1.04mmol/l et 0.75mmol/l respectivement pour les vaches N° 6325 et 4248 .

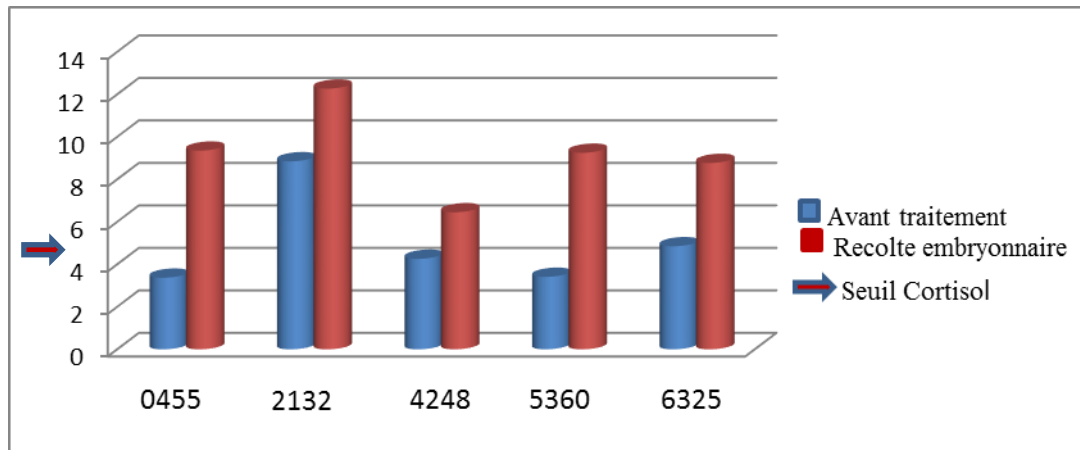
Une augmentaion progressive a été observée pour le taux moyen du groupe ,il était à 0.7mmol/l (valeur de reference limite) avant le traitement ;0.86mmol/l le jour de l'entame des injections et 1.36mmol/l le jour de l'IA, pour diminuer à 1.29mmol/l le jour de la récolte embryonnaire .

### Paramètres hormonaux :



**Figure 26 :** Variation du taux du Cortisol entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.

La figure n°26 illustre la variation de la concentration moyenne du Cortisol entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées ,elle a basculé de 9.29 ng/ml à 6.20 ng/ml à J11 .Les deux valeurs enregistrées sont au-dessus du seuil physiologique normal.



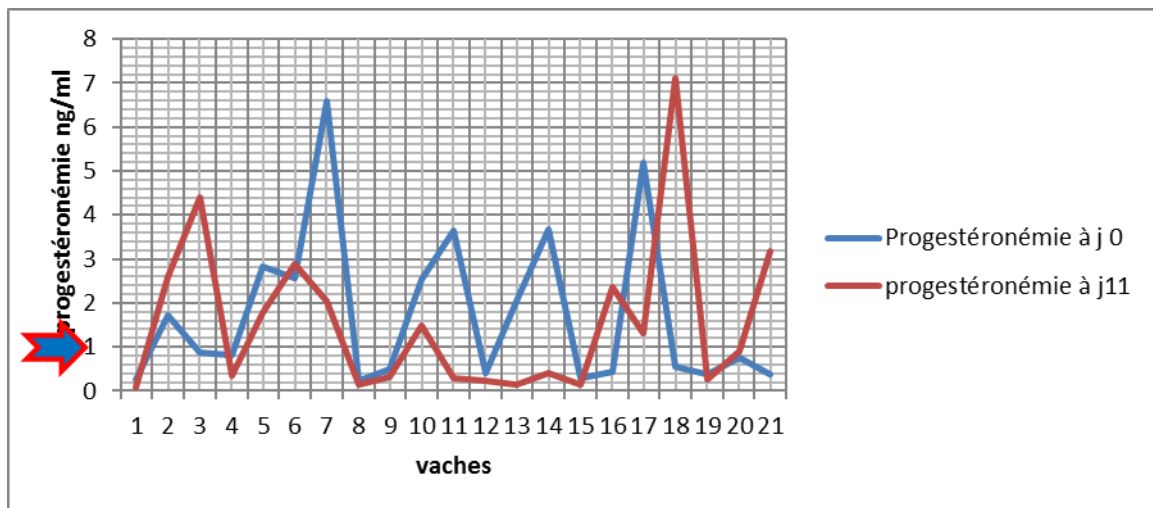
**Figure 27 :** Taux de cortisol (ng/ml) avant le traitement et le jour de la récolte.

La figure n°27 présente les concentrations du cortisol (en ng/ml) des cinq vaches super-ovulées enregistrées avant le début du traitement de superovulation et le jour de la récolte embryonnaire.

Avant le traitement, on a noté des concentrations physiologiques normales de **3.35ng/ml** pour la vache N°455, de **4.25ng/ml** pour la vache N° 4248, de **3.41ng/ml** pour la N° 5360 et de **4.85ng/ml** pour la vache N°6325. Une hyper-cortisolémie de **8.85 ng/ml** a été enregistrée pour la vache N°2132.

Les cinq vaches étaient en hyper-cortisolémie le jour de la récolte embryonnaire ; les vaches N° 455 et 5360 ont présenté respectivement des concentrations de **9.35ng/ml** et **9.25ng/ml** .La concentration de la vache N°6325 est passée de **4.85ng/ml** à **8.77ng/ml**.

La concentration la plus élevée est enregistrée pour la vache N°2132 avec une valeur de **12.27ng.l** et la plus basse pour la vache N° 4248 avec une valeur de **6.45ng/ml**.



**Figure 28 :** Variation du taux de progestérone entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées.

La figure n°28 illustre la variation des taux de progestérone entre J0 et J11 pour l'ensemble des vaches étudiées et montre une activité ovarienne normale pour la majorité des vaches.



**Résultats de la superovulation et de la récolte embryonnaire :****Tableau 07 :** Résultats du traitement de superovulation et de la récolte embryonnaire.

N° de vache	5360	455	4248	6325	2132
Protocole	1	2	2	1	2
Chaleurs	Naturelles	Naturelles	Naturelles	Induites	Induites
Ovaire gauche	01 Kyste folliculaire	05 Corps jaunes	03 Corps jaunes	15 Corps jaunes + Kyste Folliculaire	06 Corps jaunes
Ovaire droit	01 Corps jaune	05 Corps Jaunes	01 Corps jaune cavitare	10 Corps jaunes	04 Corps jaunes
Nombre d'embryon	/	/	0	01	0
Qualité embryon	/	/	/	Mauvaise (dégénéré)	0
Nombre d'ovocyte	/	/	0	08	0
Qualité ovocytaire	/	/	/	Mauvaise	0
Remarque	<b>Pas de récolte</b>	<b>Pas de récoltée (Cervicite)</b>	Vache très agitée	Vache agitée mais récolte facile	Vache très calme et récolte facile

Le tableau n°07 résume l'ensemble des résultats du traitement de superovulation et de la récolte embryonnaire. Trois vaches sur les cinq traitées ont pu être collectées, 50 corps jaunes observés à l'échographie, 08 ovocytes non fécondés récoltés et un seul embryon de mauvaise qualité (dégénéré) récupéré.

La vache N° 5360 qui a subi un traitement de superovulation selon le protocole N°1 et sur chaleurs naturelles n'a pas été récoltée en raison de sa réponse nulle au traitement. Elle a présenté un kyste folliculaire sur l'ovaire gauche et un seul corps jaune sur l'ovaire droit.

Idem pour la vache N°455 qui n'a pas été récoltée en raison d'une cervicite qui a rendu la pénétration impossible malgré l'utilisation d'un dilateur cervical. Cette vache a présenté une réponse ovarienne moyenne avec 5 corps jaunes sur chaque ovaire. Elle a été traitée suivant le protocole N°2 et sur chaleurs induites.

Les vaches N°4248 et 2132 traitées par le protocole N°2 ; sur chaleurs naturelles pour la première et induites pour la deuxième ont présenté respectivement une réponse de 3 et 6 corps jaunes sur l'ovaire gauche, un (cavitare) et 4 corps jaunes sur l'ovaire droit. Aucun élément biologique n'a été récolté.

Seule la vache N° 6325 a présenté une réponse satisfaisante au traitement subi selon le protocole N° 1 sur chaleurs induites ; on a enregistré à l'échographie un résultat de 15 corps jaunes et un kyste folliculaire sur l'ovaire gauche et 10 corps jaunes sur l'ovaire droit. A la récolte on a récupéré 08 ovocytes non fécondés et un embryon dégénéré.

### III.2.DISCUSSION :

#### Note d'Etat Corporel :

Dans une étude menée chez des vaches Montbéliardes, **Delacharlerie (1995)** a montré que l'état corporel des vaches était lié de façon significative à la production d'embryons transférables, les meilleures donneuses étant les vaches en bon état (note d'état  $\geq 3$ ) par rapport aux vaches en état moyen (note d'état  $< 3$ ). [32]

La Note d'Etat Corporel retenue pour les vaches laitières au-delà de 60 jours post-partum et avant tarissement est de **2.75** (pic de lactation NEC=2.5). [92]

Dans notre étude, la note moyenne relevée lors de la première visite dans le cadre du suivi et de la sélection des vaches potentiellement donneuses d'embryons était de **3**, supérieure à la valeur de référence précitée. Cette note était associée à des cas d'acidoses, de boiteries et quelques épisodes d'acétonémie causés par une alimentation mal estimée (inadéquate) en quantité et en qualité.

Suite aux recommandations données, un changement de la ration alimentaire était effectué. On a constaté une variation instable de la NEC au cours des trois visites qui ont suivi, probablement en raison de la transition dans le régime alimentaire. Une amélioration était observée lors de la cinquième visite où on a relevé une NEC moyenne de **2.59** au voisinage de la valeur ciblée.

La NEC de trois vaches sur les cinq super ovulées était de **2.75** tout au long du protocole et la NEC des deux autres a présenté une variation (BCS LOSS) de **(-0.25)** pour l'une et une augmentation de **(+0.25)** pour l'autre entre l'évaluation avant l'entame du traitement et le jour du début des injections pour rester stable pour le reste des observations.

Trois vaches sur les cinq super ovulées ont présenté une diminution de la NEC moyenne de **(-0.07)**, **(-0.16)** et de **(-0.44)** et deux une augmentation de **(+ 0.25)** et de **(+0.17)** entre la phase de sélection et la phase du traitement. Cependant la NEC moyenne est restée stable avec une valeur de **2.8** pas très loin de la note recommandée.

D'après **DRAM (1999)**, une note de **2.5 à 3.5** révélerait un état corporel suffisant pour que l'animal donne de bonnes performances reproductives. Les NEC des vaches super ovulées relevées pour les deux phases d'étude correspondent aux valeurs citées, elles varient entre **2.5** et **3.5**. [92]

#### Paramètres biochimiques et hormonaux :

L'hypoglycémie enregistrée pour les 21 vaches étudiées à J0 (**0.4 ± 0.06 g/l**) et J 11 (**0.19 ± 0.08 g/l**) est associée à un statut énergétique négatif. Elle est due à une insuffisance de la production des AGV (Acides gras volatils) entre autres le propionate qui est le principal précurseur du glucose chez les ruminants.

D'après **Whitaker et al, (1993)** et **Laizeau (2003)**, les indicateurs métaboliques d'un déficit énergétique sont : la glycémie, des teneurs plasmatiques en Acides Gras Non Estérifiés (**A.G.N.E.**), en cholestérol et en corps cétoniques ; plus particulièrement en  $\beta$ - Hydroxy-butyrates (BHB). [36]

Whitaker *et al*, (1993), ont rapporté que lorsque le déficit énergétique augmente, les teneurs plasmatiques en A.G.N.E et en BHB augmentent alors que la glycémie diminue. [36]

Dans notre étude, malheureusement les AGNE et BHB n'ont pas été dosés pour cette phase de suivi et de sélection mais des taux physiologiques normaux du BHB dans le lait (**0.1 et 0.2mmol/l**) ont été relevés dans le cadre d'une autre étude faite dans la même période que la nôtre.

Le taux moyen du cholestérol enregistré pour J0 et J11 a montré des valeurs physiologiques normales de **1.29 [±0.26] g/l** et **1.26 [±0.25] g/l**. Idem pour les dosages de l'albumine et des protéines totales, témoins d'un statut protéique normal même si l'on a enregistré des hypo urémies.

L'hypoglycémie enregistrée associée à une hypo-urémie de **0.14 [+\_0.02] g/l** relevée à J11 sont les conséquences d'une acidose ruminale compliquée d'une acidose métabolique, et met le doigt encore une fois sur une alimentation trop riche en ressources énergétiques rapidement fermentescibles, pauvre en fibres et surtout distribuée en grande quantité.

La vache N° **6325** a présenté une légère hypoglycémie de **0.54 g/l**, une urémie de **0.25 g/l** à J0 et de **0.17 g/l** à J11, cholestérol normal, un taux de protéines totales et d'albumine normale, un taux de BHB de **0.3mmol/l** et un taux des AGNE de **0.53 mmol/l** au début du traitement qui atteint une valeur de **1.55 mmol/l** le jour de la récolte.

Les taux normaux de BHB relevés ainsi que la NEC qui est restée constante tout au long de l'opération du transfert embryonnaire et correspondant aux valeurs recommandées (**2.5-3.5**), indiquent l'absence d'une cétose de type I et d'une balance énergétique négative malgré le taux élevé des AGNE.

Les acides gras non estérifiés (mesure de la lipomobilisation) augmentent en cas d'hypoglycémie [32] ; d'après Andersson (1988), la concentration en AGNE varie en fonction de l'alimentation et du stress subi par les animaux [48].

Les dosages du cortisol le jour de la récolte montrent un taux élevé de **8.77ng/ml** reflétant un état de stress chez cette vache. Ce qui peut expliquer le taux élevé des AGNE relevé.

Avant le début du traitement, la vache N°**2132** a présenté une urémie normale (**0.28g/l**), un taux de BHB normal (**0.5mmol/l**), une hypoglycémie (**0.44g/l**), un taux des AGNE élevé (**1.31mmol/l**) et une hyper-cortisolémie de **8.85 ng/ml**.

Le jour de la récolte embryonnaire on a enregistré une hypo-urémie (**0.13 g/l**), un taux de BHB normal (**0.3 mmol/l**) ; un taux élevé des AGNE (**1.28 mmol/l**) et une hyper-cortisolémie de (**12.27ng/ml**).

Idem que la vache N° **6325** le taux élevé des AGNE trouvé pour cette vache est associé à une situation de stress révélée par une hyper-cortisolémie enregistrée à J0 et à J11.

Pour la vache N° **5360** on a noté une hyper-urémie (**0.9 g/l**) associée à une hypoglycémie (**0.45g/l**) et un taux des AGNE (**0.86 mmol/l**) au-dessus de la normale qui renseignent sur un déficit énergétique avant le début du traitement.

Le jour de l'IA on a enregistré une hypo-urémie (**0.12 g/l**) associée à une hyperglycémie (**0.74 g/l**) et un taux élevé des AGNE (**2.92mmol/l**) avec un taux normal de BHB (**0.2mmol/l**), révélant un cas de Stéatose hépatique. Une hyper-cortisolémie de **9.25 ng/ml** reflète un état de stress chez la vache le jour de la récolte.

Avant le traitement, on a enregistré un taux élevé de BHB de **2.2 mmol/l** indiquant que la vache N°**455** était en bilan énergétique négatif qui a abouti à une cétose du type I.

Les résultats récupérés le jour de l'IA ; un taux normal de BHB (**0.4 mmol/l**) et d'AGNE (**0.1mmol/l**) ; confirme l'absence d'un déficit énergétique. L'hyperglycémie (**1.01g/l**) enregistrée, associée à une hypo-urémie (**0.14 g/l**) révèle un cas d'acidose. La vache **455** a présenté une hyper-cortisolémie de **9.35 ng/ml** le jour de la récolte.

Une acidose métabolique latente pourrait être à l'origine d'une diminution de la réponse à la sécrétion d'insuline ce qui engendre une augmentation de la sécrétion de cortisol. [48]

En début du traitement, on a enregistré un taux des AGNE de **0.61mmol/l** et un taux de BHB de **0.8 mmol/l** ce qui indique que la vache N° **4248** était en bilan énergétique normal.

Vers la fin de l'opération du transfert embryonnaire on a noté un taux normal de BHB, une urémie au voisinage de la normale, une hypoglycémie, une cortisolémie de **6.45 ng/ml** et une augmentation dans la concentration des AGNE (**1.06 mmol/l**) correspondant probablement à une situation de stress.

### **Réponse au traitement de superovulation et collecte embryonnaire :**

La réponse ovarienne au traitement de superovulation était dans l'ensemble satisfaisante avec un nombre total de **50** corps jaunes ; une moyenne de **10 CJ** par vache. Ce résultat est supérieur à celui enregistré par **Adel (2003)** ; avec une moyenne de **7CJ** par vache et de **Ferroukh et al., (2008)** ; avec une moyenne de **05 CJ** par vache. [90]

Cependant, le résultat de la récolte embryonnaire était décevant ; un seul embryon dégénéré et **08** ovocytes non fécondés sont récoltés ; un résultat très loin de celui réalisé par **BEHIDJI et KELLOU., (2011)** ; ces derniers ont obtenu une moyenne de **15.5** embryons. [90]

Au cours de cette étude et dans la phase de sélection des donneuses on a enregistré des variations dans la NEC reflétant des changements dans le statut énergétique des vaches et aussi une hypoglycémie pour l'ensemble des vaches avant l'entame du traitement de super ovulation et des hypo et hyperglycémies au cours du traitement.

Le glucose semble être la principale source d'énergie utilisée par l'ovaire. L'absence du glucose, perturbe le développement des follicules et la production d'embryons en réponse à un traitement de super ovulation [10] [47]. Selon **Gong et al., (2002)**, une hyperglycémie chez la vache est associée à la production d'embryons de mauvaise qualité. [47]

Des travaux menés chez les génisses par (**Broster, 1973 ; Dunne et al., 1997 ; Dunne et al., 1999 ; Nolan et al., 1998**), ou chez la brebis par (**McEvoy et al., 1995 ; Parr et al, 1987**), qui ont également montré l'impact négatif d'un excès énergétique autour de l'ovulation sur la sécrétion de progestérone et la viabilité de l'embryon. [31]

(Britt, 1992a ; Britt, 1992b ; Butler, 2003 ; Senatore et al., 1996), ont rapporté qu'un déficit énergétique conséquent en tout début de lactation pourrait affecter la qualité des ovocytes dès les premiers stades du cycle de maturation et entraîner une réduction de la fertilisation de l'ovule. [31]

Depuis 1992, la théorie de Britt est généralement acceptée pour décrire l'effet de l'environnement nutritionnel de la vache sur l'aptitude de l'ovocyte à être fécondé. Elle suppose que la qualité de l'ovocyte et la capacité stéroïdienne du follicule sont déterminées par l'environnement biochimique et hormonal pendant la période de croissance folliculaire qui précède l'ovulation (environ 80 jours chez la vache). [6] [31] [36]

La vache N° 5360 pour laquelle on a relevé une hyper-urémie avant le traitement, une balance énergétique négative en début de traitement et une cétose du type II (stéatose), le jour de la récolte a présenté à l'échographe un kyste folliculaire sur l'ovaire gauche, un taux sanguin élevé des AGNE et on a constaté une mauvaise réponse ovarienne au traitement.

D'après Nibart, (1991) la présence de kystes ovariens conduit à une activité ovarienne pratiquement nulle. [36]

Selon Canfield et al, (1990) ; Sinclair et al., (2000), une augmentation de la concentration de l'urée a été associée à une réduction de la fertilité des vaches à cause des effets toxiques de l'urée sur l'ovocyte et ou sur l'embryon. [47]

En effet, quand les concentrations circulantes d'urée sont élevées, le pH de l'utérus est réduit, ce qui entraîne des modifications de la composition ionique du liquide utérin, créant ainsi des conditions hostiles pour la survie de l'ovocyte, des spermatozoïdes et de l'embryon. Le taux de fécondation est diminué et la mortalité embryonnaire précoce augmentée. [6]

DOHOO et MARTIN (1984), ont montré que les vaches en acétonémie subclinique sont plus sujettes au développement de kystes ovariens qui altèrent la fonction de reproduction [3] [46] [6]. La corrélation avec le taux d'AGNE serait encore plus puissante que celle avec le BHB. [46]

Vanholder, Opsomer et Kruif (2006), ont rapporté qu'une exposition prolongée aux AGNE pourrait être responsable d'une croissance folliculaire retardée et favoriser l'apparition de kystes ovariens. De plus et d'après Yung et al., (1996) l'ovulation en présence des AGNE est caractérisée par un corps jaune anormal soit de plus petite taille en plus d'un niveau de production de progestérone à la baisse. [81]

Selon Iossa et al., (2002) ; Van Hoeck et al., (2013), lorsque les acides gras sont présents en grande quantité, il y a une augmentation de l'activité mitochondriale et par le fait même une augmentation de la production de radicaux libres. [81]

On a relevé un épisode de cétose type I pour la vache N°455 avant le début du traitement et une acidose le jour de l'IA. Cette vache a montré une réponse ovarienne moyenne au traitement mais malheureusement elle n'a pas pu être récoltée en raison d'une cervicite.

L'acidose a une incidence négative sur l'immunité et l'involution utérine et elle augmente le risque de métrite. [32]

Les vaches N°4248 , 2132, 6325 ont présenté une élévation des taux des AGNE associée à une élévation des taux du cortisol dans le sang en fin de protocole en relation avec une situation de stress vécue par ces vaches ,engendré par le traitement de super ovulation et les manipulations qui l'accompagnent.

**Nibart, 1991**, a montré que tout stress avant et pendant le traitement de super ovulation est néfaste puisqu'il conduit à la formation d'ACTH, et/ou à empêcher la décharge de LH et à favoriser ainsi, soit la formation de kystes ovariens, soit l'ovulation d'ovocytes de mauvaise qualité [36].Ce qui explique la qualité de l'embryon et des ovocytes récoltés.

Les taux de cortisol enregistrés entre le début et la fin du traitement semblent être indépendants du type de protocole de stimulation appliqué. On a enregistré presque les mêmes variations pour les deux protocoles.

Les vaches N°455 et 2132 stimulées suivant le protocole 2 sous chaleurs naturelles pour la première et induites pour la deuxième ont présenté la même réponse au traitement avec un total de 10 corps jaunes chacune.

D'après **Baruselli et al., (2012) ; Nasser et al., (2011) ; Rivera et al., (2011) ; Rivera et al., (2009)**, les concentrations de progestérone pendant un traitement de super ovulation ont une influence sur la croissance folliculaire, la qualité des ovocytes et la qualité des embryons .[54]

L'implant intra-vaginal de progestérone est un outil fréquemment utilisé en reproduction bovine. Bien que son efficacité soit reconnue lors de l'utilisation des protocoles de synchronisation de la saillie, la concentration plasmatique de progestérone qu'il engendrera sans la présence concomitante d'un corps jaune n'est pas décrite de façon exhaustive chez la vache laitière. [54]

**Pursley et Martins, (2011)** ; rapporte qu'actuellement, il est assumé qu'une concentration plasmatique de progestérone élevée pendant la croissance du follicule ovulatoire avant la lutéolyse permet d'améliorer la fertilité de la vache laitière, bien qu'il n'est toujours pas clair comment un bas niveau de progestérone plasmatique affecte la fertilité. [54]

**Cerri et al. (2011a)**, ont rapporté que le fluide folliculaire était altéré lors d'un bas niveau de progestérone par rapport à un niveau lutéal de P4, ce qui pourrait potentiellement affecter la qualité des ovocytes et/ou des embryons [54] [47]

**Rivera et al., (2011), Denicol et al., (2012)**, ont proposé de maintenir une progestéronémie de plus de 2,0 ng/ml pendant la croissance folliculaire lors de l'utilisation d'un protocole de synchronisation afin de maintenir un taux de conception élevé. [54]

**Baruselli et al., (2012)**, expliquent qu'un niveau élevé de P4 pourrait être bénéfique en régularisant la pulsativité de la LH, évitant ainsi une maturation prématurée de l'ovocyte et permettant une meilleure qualité d'ovocytes/embryons lors d'un protocole de super ovulation.[54]

## IV. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Fonction de luxe, la reproduction est la première touchée par toute atteinte de l'homéostasie, comme elle est la dernière à subir les effets d'une correction adéquate.

L'objectif de notre étude était de mettre en évidence l'effet du stress et des maladies métaboliques sur les résultats de la superovulation et sur la qualité embryonnaire et ovocytaire dans le cadre d'un programme de transfert embryonnaire mené au niveau d'un centre de recherche à Baba Ali en utilisant deux protocoles de stimulation et en se basant sur des chaleurs naturelles et induites.

Les résultats ressortis et discutés de cette étude sont en accord avec la littérature et les résultats de plusieurs autres études faites dans le même sens que la nôtre.

Une mauvaise réponse en nombre et /ou en qualité a été relevée pour les cinq vaches super-ovulées en relation avec la manifestation de maladies métaboliques (cétose type I, stéatose et acidose) et /ou de situations de stress engendrées par la manipulation des animaux.

Le stress et les maladies métaboliques retentissent sur la fonction ovarienne par la perturbation directe ou indirecte des fonctions physiologiques de l'axe hypothalamo-hypophysaire mais aussi en induisant des changements dans la composition du microenvironnement de l'ovocyte, de l'embryon et /ou des spermatozoïdes.

La petite taille de notre échantillon, la diversité et complexité des profils biochimiques (et hormonaux) qui ont fait l'objet de notre étude ne permettent pas de mettre en évidence la supériorité d'un protocole sur un autre ni l'impact de l'usage d'implant intra vaginal sur les résultats de superovulation ; pour cela d'autres études avec un plus grand effectif et avec des dosages rigoureux de progestérone auront sûrement un plus grand intérêt.

Une élimination des causes d'apparition de ces troubles métaboliques par une meilleure estimation des rations alimentaires et l'implication dans le diagnostic précoce sont des moyens d'amélioration des résultats du transfert embryonnaire.

Cependant, la non-spécificité des marqueurs du stress et leurs implications dans d'autres situations physiologiques et la diversité des facteurs et des mécanismes pouvant perturber la fonction de reproduction compliquent la prise en charge et la détection de ces situations.

L'ADN circulant libre est le nouveau marqueur de stress (marqueur de choix) proposé et utilisé par l'équipe de laboratoire de biologie de la reproduction de l'hôpital Montpellier sous la responsabilité du **Pr S. Hamamah** pour choisir le meilleur cycle pour une tentative de FIV et améliorer les résultats de la procréation médicalement assistée.

L'usage d'un tel marqueur dans la sélection des donneuses d'embryons permettra d'améliorer les résultats de la superovulation et du transfert embryonnaire d'une part et de limiter les pertes économiques des organismes d'une autre part.

## **Références bibliographiques :**

**[1] :A. CORDOVA, C. PERREAU, B. SCHMALTZ-PANNEAU C, Y. LOCATELLI, C. PONSART, P. MERMILLOD, 2013.** Mise en évidence d'un dialogue moléculaire et fonctionnel entre l'embryon préimplantatoire bovin et l'oviducte grâce à un modèle in vitro. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 41 -537–539. Elsevier Masson SAS.

**[2] :A.MEDJAD, M. MAHIEDDINE, 2016.** Influence du bilan énergétique sur les résultats de la superovulation chez les vaches donneuses d'embryons. Mémoire docteur vétérinaire. Institut des sciences vétérinaire Blida.

**[3] : ALEXANDRE, GREGORY, DAMIEN FOURNET, 2012.** Conduite à tenir en cas d'acétonémie subclinique – enquête auprès des vétérinaires de terrain .Thèse doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil.

**[4] :ALEXIS, BERNARD KIERS ,2005.** Analyse des résultats de reproduction d'élevages bovins laitiers suivis Avec le logiciel vetoexpert. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

**[5] : AMELIE BOURDIEC, 2014.** Impact des facteurs embryonnaires sur la réceptivité maternelle. Thèse Doctorat en microbiologie-immunologie. Université Laval. Québec, Canada

**[6]: ANDREW PONTER, DOMINIQUE REMY, BENEDICTE GRIMARD, 2013.** Le Point Vétérinaire / Prévention nutritionnelle en élevage bovin.

**[7] :ANNE-CLAIRE, MARIE BRISVILLE, 2006.** Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique. Thèse de Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

**[8] : ANNE-LAURE NIVET, 2014.** La voie génomique de la qualité ovocytaire chez la vache et chez la femme. Doctorat en sciences animales. Université Laval. Québec, Canada.

**[9] : ANNIE BARBEAU ,2012.** Rôle de l'estérification des acides gras dans la régulation de la sécrétion d'insuline et le stress métabolique induits par le glucose. Université de Montréal

**[10] : ARDJOUN KHALIL DJALAL, 2004** Impact de la cétose sur la reproduction chez la Jersiaise en élevage intensif: cas de la ferme de Wàyembam dans la zone périurbaine de Dakar. Mémoire de diplôme d'études approfondies De productions animales. Université Cheikh Anta Diop De Dakar.

**[11] : BENEDICTE GRIMARD, 24 et 25 octobre 2000.** Nutrition, production laitière et reproduction chez la vache laitière : aspects métaboliques. Draveil Commission Bovine.

**[12] : BOUAZIZ, 2010 .** Les biotechnologies de la reproduction dans l'espèce bovine. Cours de reproduction .Université de Constantine.



**[13] : BRETEAU GAËLLE ,2010 .**Etude des paramètres d'ambiance pour le bien être des Bovins lors du transport de longue durée.Thèse grade docteur vétérinaire.Université Paul Sabatier de Toulouse.

**[14] :C. PONSART, B. MARQUANT-LEGUIENNE, P. HUMBLLOT, 2004.**Les biotechnologies de l'embryon bovin, évolution et perspective, Maisons Alfort. Renc. Rech. Ruminants, 11

**[15] : CECILE MARIE MADELEINE TANGUY DEZAUX, 2004.** Etude du rôle de l'AMPC dans la reprise de la méiose ovocytaire chez la chienne. Thèse pour le Doctorat vétérinaire .Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

**[16] : CECILE TOMASZEWSKI, 2009.** Absence d'embryons ou embryons Non transférables en ICSI : Que dire aux patients? Une étude nancéenne et revue de la littératureThèse pour le grade deDocteur en médecine Faculté de médecine université Henri Poincaré, Nancy 1

**[17] : CHARBEL CHBAT, 2012.**Comparaison des pratiques et des résultats de reproduction des vaches laitières au Liban et en France. Thèse Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Vetagro sup Campus vétérinaire de Lyon.

**[18] : CHRISTIAN VIGNEAULT, 2008.**Étude de l'activation de la transcription chez le jeune embryon bovin. Thèse pour le grade de Philosophiae Doctor en sciences animales Université Laval Québec.

**[19] : CHRISTINE VIARIS DE LESEGNO, CECILE TANGUY-DEZAUX, MARTINE CHEBROUT, KARINE REYNAUD, SYLVIE CHASTANT-MAILLAR, 2005** .Maturation ovocytaire *in vitro* chez la chienne. Bull. Acad. Vét. France - Tome 158 - N°2

**[20] : CUVELIER C, CABARAUX J.-F., DUFRASNE I., ISTASSE L., HORNICK J.-L, 2005.**Transport sanguin et métabolisme hépatique des acides gras chez le ruminant. Ann. Méd. Vét., 149, 117-131

**[21] : CUVELIER C., CABARAUX J.-F., DUFRASNE I., ISTASSE L., HORNICK J.-L, 2005.** Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminants. Ann. Méd. Vét., 149, 49-59

**[22] : D. MONNIAUX, A. CARATY1, F. CLÉMENT, R. DALBIÈS-TRAN, J. DUPONT1, S. FABRE, N. GÉRARD, P. MERMILLOD, P. MONGET, S. UZBEKOVA1, 2009.** Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. Inra Productions Animales, numéro 2

**[23] : DANY PLOURDE, 2011.**Analyse du transcriptome et de la qualité de l'embryon bovin produit sous différentes conditions.Thèse pour grade de Maître es sciences (M.Sc.). Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Université Laval Québec Canada.

**[24] : DAVID FRANCOZ, YVON COUTURE, 2014 .Manuel de médecine des bovins .Edition MED'COM.**

**[25] : Dr ADEL DJALLEL, 2004. Thèse de Magister .Institut vétérinaire Blida.**

**[26] : DR J. COLLARD ,2014 .Les marqueurs biologiques du stress oxydant .Article Synlab Belgique.**

**[27] : Dr JEAN-SEBASTIEN LAIZEAU, 2003. Facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache laitière de race montbéliarde. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.**

**[28] : DR NINO GUY CASSUTO, 2016 .Quelle est la meilleure stratégie pour sélectionner les embryons au laboratoire ? .ALGER SAMERE**

**[29] : DR .WALTER S MARCONTONI ,2005. Le stress et émotions.**

**[30] :ELISABETH ALGAVA, DOMINIQUE CHOUANIÈRE, CHRISTINE COHIDON JEAN-YVES DUBRÉ, FRANCE KITTEL , ANNETTE LECLERC, MICHEL LE MOAL, MARC LORIOU, MARIE-PIERRE MOISAN, ISABELLE NIEDHAMMER, VALERIE PEZET-LANGEVIN, CATHERINE SERMET , HELENE SULTAN-TAIEB, LAURENCE WEIBEL, 2011 . Stress au travail et santé - Situation chez les indépendants © Les éditions Inserm.**

**[31] : EMMANUEL TILLARD, 2010. Approche globale des facteurs associés à l'infertilité et l'infécondité chez la vache laitière: importance relative des facteurs nutritionnels et des troubles sanitaires dans les élevages de l'île de la Réunion. Thèse pour grade de Docteur de l'Université Montpellier II.**

**[32] : F. DELETANG, P. HIVOREL. Maîtriser la reproduction, c'est maîtriser l'avenir CEVA Santé Animale.**

**[33] :F. CRISTOFORI, G. QUARANTA, M. SIDIBE, M. MATTONI, G. TRUCCHI 1, D. BELEMSAGA, 2001 .Essais de production et de collecte d'embryons chez la vache Somba. Revue Élev. Méd. vét. Pays trop, 54 (3- 4) : 263-268 .Ressources animales**

**[34] :F. GUIGNOT, 2005 .Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Productions Animales INRA, 18 (1), 27-35.**

**[35] :F. ROBERT, J. PASCARD, T.AUBERT, 2006.Utilisation d'un marqueur du stress oxydatif pour évaluer l'impact des périodes de stress chez les bovins : cas du vêlage et du transport allotement chez les veaux.Renc. Rech. Ruminants.**

**[36] : FASSI FIGHRI AICHA, 2006 .Collecte et maturation des ovocytes bovins : effet de l'état nutritionnel sur le rendement et la qualité des ovocytes. THÈSE Doctorat d'Etat en sciences biologiques. Faculté des Sciences de Rabat.**

- [37] : FELLAK AMEL, BOUTRAROUA FATIHA, 2013** .Les biomarqueurs du stress chez les bovins. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale vétérinaire d'Alger.
- [38] : FLORENCE BRUNET,2002**. Rationnement et maladies métaboliques de la vache laitière.Thèse pour grade de docteur vétérinaire.Ecole nationale vétérinaire de Lyon.
- [39] : FRANCIS ENJALBERT, 1998**. Alimentation et Reproduction chez la Vache Laitière - SNDF.
- [40] : FRANCK PELLESTOR, 2004**. Âge maternel et anomalies chromosomiques dans les ovocytes humains.M/S : médecine sciences, vol. 20, n°6-7, p. 691-696.
- [41] : GABRIEL DOUVILLE, 2013**. Étude de l'expression génique dans les cellules de granulosa bovines provenant de différents statuts folliculaires et dans les cellules de granulosa humaines provenant de différents protocoles de stimulation.Mémoire de Maîtrise en Sciences Animales. Université Laval.
- [42] : GAËL CAGNONE, 2013**. Impact du stress de la culture in vitro sur la survie et le transcriptome embryonnaire chez le bovin « Entre adaptation et viabilité ».Thèse Doctorat En Sciences Animales. Université Laval. Québec, Canada.
- [43] : GERARD LEBEL, 2013**.Guide d'auto soins pour la gestion du stress.
- [44] : GILBERT BONNES, JEANINE DESCLAUDE, CAROLE DROGOUL, RAYMOND GADOUD, ROLAND JUSSIAU, ANDRE LE LOC'H, LOUISE MONTMEAS, GISEL ROBIN ,2005** .Reproduction des animaux d'élevage .Deuxième édition .Educagri édition.
- [45] : GILLES BRUNEAU, CHRISTIAN VAISSE, ALAIN CARATY, PHILIPPE MONGET, 1999**. La leptine : Une clé pour la reproduction. Médecine/sciences ; 15 : 191-6.
- [46] : GUILLAUME FORGEAT, 2013**.Déficit énergétique avant et après vêlage chez la vache laitière : Les liens entre les indicateurs.Thèse pour grade de Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon I.
- [47] : HASINA SANTATRINIAINA RASOLOMBOAHANGINJATOVO, 2011**.Relations entre le statut utérin, les paramètres biochimiques du sérum et du liquide de lavage utérin et la production d'embryons chez les vaches laitières après suroovulation. Mémoire pour le grade de maître ès Sciences (M. Sc.) en sciences vétérinaires. Université de Montréal.
- [48] : HELENE, VIRGINIE, ALINE MICHAUX ,2008**.Cétose de la vache laitière : Dosage du beta-hydroxy-butyrate dans le lait avec le lecteur optium xceed®.Thèse pour le grade de docteur vétérinaire. L'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

**[49] : HUMBLET M.-F., GODEAU J.-M, 2005.**L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë, dans l'espèce bovine. Ann. Méd. Vét, 149, 20-33.

**[50] : J.M.GOURREAU ; F.BENDALI, 2008 .**Guide pratiques des maladies des bovins .Edition France agricole, 4ème Edition ; Février.

**[51] : J.M.PAYNE, 1983.** Maladies métaboliques des ruminants domestiques. Editions du point vétérinaire.

**[52] : J.MANDELBAUM, J-M.ANTOINE, O.FIORI, 2006.** L'ovocyte : Avancées fondamentales et thérapeutique .J Gynecol Obst et Biol Repro, 35 (cahier 2) : 2S47 ,2S48

**[53] : JACQUES TESTART, 2004.** Des ovules en abondance ? Médecine sciences, vol. 20, n° 11, p. 1041-1044.

**[54] : JEAN-PHILIPPE PELLETTIER ,2013.** Superovulation chez la vache laitière : Impact de la progestéronémie. Mémoire grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal.

**[55] : JEAN-PHILIPPE ROBERT-GRENON, 2013.** Etude de l'ARN polysomal durant la maturation de l'ovocyte bovin.Mémoire pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M. Se) sciences animales. Université Laval.

**[56] : JEAN-YVES DOURMAD, ALAIN CARPENTIER, BENEDICTE LEBRETET MARIE-CHRISTINE MEUNIER-SALAÜN, 2006.** Le bien-être animal, un facteur d'évolution des systèmes de production porcine. .Bull. Acad. Vét. France - Tome 159 - N°3

**[57] : JULIETTE, ANNICK, MICHELE JOLY ,2007.** Le peripartum de la vache laitière : aspects zootechniques et sanitaires. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil.

**[58] : KAIDI NABILA ,2006 .**Contribution à l'étude du transfert embryonnaire chez la vache laitière Diplôme Dr Vétérinaire. ENV Alger.

**[59] : KARINE REYNAUD, SANDRA THOUMIRE, MARIE SAINT-DIZIER, ZAHID TAHIR, MARTINE CHEBROUT, SYLVIE CHASTANT-MAILLARD, 2011 .**Les follicules ovariens poly-ovocytaires : Physiologiques et pas si rares.Bull. Acad. Vét. France.

**[60] : KARINE TREMBLAY ,2007.**Etudes de la régulation post-transcriptionnelle des ARNm deL'ovocyte bovin.Thèse de doctorat en sciences animalespour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.). Université Laval.

**[61] :L. ANGULO, C. GUYADER-JOLY, S. AUCLAIR, S. PONCHON, C.GONZALEZ, C.HENNEQUETANTIER, M.BOUSSAHA, P.HUMBLOT, R.DALBIES-TRAN, C.PONSART, 2011.** La qualité de l'ovocyte bovin : du phénotype aux gènes. Renc. Rech. Ruminants, 18.

**[62] : LUIS MANUEL BALDOCEDA BALDEON ,2014.**Analyses génomiques et phénotypiques contrastant les embryons bovins des races Holstein et Jersey.Thèse Doctorat en sciences animales .Université Laval Québec, Canada.

**[63] :M. BENKHALIFA, E. BERTHE, A. DEVAUX, P. MERVIEL, H. COPIN.** Novembre/Décembre 2013.Nutrition et ovocyte. Le dossier Nutrition et fertilité réalités en gynécologie-obstétrique 170,

**[64] :M. CAPRIO, juillet/octobre 2004.** Leptine et reproduction.Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition (VIII), n° 4-5.

**[65] : MAUD VALLÉE, 2007.** Identification de gènes spécifiques à l'ovocyte conservés au cours de l'évolution.Thèse de doctorat en Sciences Animales pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD.) Université Laval.

**[66] : MELANIE HAMEL, 2009.** Études des marqueurs de compétence exprimés dans les cellules folliculaires afin d'améliorer l'évaluation de la qualité des ovules chez l'humain.Thèse de doctorat en sciences animales pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.) Université Laval.

**[67] : MOUHAMADOU DIAW ,2014.**Expression et effets des wnts sur l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte chez la vache. Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.).Université de Montréal.

**[68] :N.G. CASSUTO, 2016.** Est-il utile d'observer les embryons aux stades précoces de leur développement quand une culture prolongée est effectuée ? Non. Gynécologie Obstétrique et Fertilité.

**[69] : NOLWENN BÜHLER, 2014.** Ovules vieillissants, mères sans âge? Infertilité féminine et recours au don d'ovocytes en Suisse.Enfances, Familles, Générations, n° 21, p. 24-47.

**[70] :P. BOTTIN A, V. ACHARD, B. COURBIERE, M. PACI, A. GNISCI, E. JOUVE D, J.-M. GRILLO A, O. PAULMYER-LACROIX, 2015.** Politique de transfert électif d'un embryon à 48/72 h : quels résultats après transferts frais et transferts d'embryons congelés. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 43 (2015) 297–303.Elsevier Masson SAS.

**[71] : PASCALE MAY-PANLOUP, MARIE-FRANÇOISE CHRETIEN, YVES MALTHIERY ET PASCAL REYNIER, 2004.**Mitochondries et reproduction. Médecine sciences, vol. 20, n°8-9, p. 779-783.

**[72] : PHILIPPE CHEMINEAU, BENOIT MALPAUX, JEAN-PIERRE BRILLARD ET ALEXIS FOSTIER, 2010.** Traitements photopériodiques et reproduction chez les animaux d'élevage.Bull. Acad. Vét. France - Tome 163 - N°1.

**[73] : PHILIPPE CORTEN, 2011.** Stress et stress pathologique. Psychopathologie du travail ULB. Université Libre de Bruxelles.

**[74] : PHILIPPE MONGET, PASCAL FROMENT, CECILE MOREAU, BENEDICTE GRIMARDI ET JOËLLE DUPONT, 2004.** Les interactions métabolisme-reproduction chez les bovins Influence de la balance énergétique sur la fonction ovarienne. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

**[75] : PIERRE HAINAUT, 2002 .**ADN circulant : Une source d'information pour la détection et le suivi du cancer. Article

**[76] : PITON ISABELLE ,2004.** Canicule et reproduction chez la vache laitière. Thèse Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon.

**[77] : PR .MICHEL THIBIER 1999.**AFSSA - Colloque Biotechnologies de la reproduction animale et sécurité sanitaire des aliments.

**[78] :PROF. CH. HANZEN ,2008-2009.**La production d'embryons in vitro chez la vache.

**[79] :PROF. CH. HANZEN ,2008-2009.**La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine.

**[80] :PROF. CH. HANZEN, 2014-2015.**La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine. Université de Liège.

**[81] : RACHÈLE TREMBLAY ,2016.** Impact du stress métabolique sur la programmation épigénétiques de l'embryon bovin .Mémoire pour grade Maître ès sciences (M.Sc.) Université Laval Québec, Canada.

**[82] : REMI LABRECQUE, 2015.**Analyse du transcriptome de l'ovocyte bovin en lien avec la compétence au développement. Thèse Doctorat en sciences animales Philosophiae. Université Laval .Québec .

**[83] : SABINE TRAVER, ELODIE SCALICI, TIFFANY MULLET, NICOLAS MOLINARI, CLAIRE VINCENS, TAL ANAHORY, SAMIR HAMAMAH.** Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to predict *in vitro* Fertilization Outcome. PLoS ONE 10(8): e0136172. Doi:10.1371/journal.pone.0136172.

**[84] : SAMIR HAMAMAH, YVES MENEZO ,1999.** Ovocyte et embryon de la physiologie à la pathologie .Edition Ellipses.

**[85] : SARA-MYRIAM SCANTLAND-MARCHAND, 2014.**Transcriptome et métabolisme de l'ovocyte bovin .Thèse Doctorat en Sciences Animales Philosophiae. Université Laval Québec, Canada

**[86] : SIMONE GILGENKRANTZ.** Œuf. Médecine sciences, vol. 20, n° 11, 2004, p. 949.

**[87] : VIRGINIE GRIDELET, 2015.**L'implantation embryonnaire : Etude des récepteurs endométriaux à l'hCG /LH blastocytaire et intérêt de la mesure du G-CSF folliculaire.Thèse pour le grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques. Faculté de médecine Université de Liège.

**[88] :W.C.D. HARE ,1984.** Progrès techniques en matière de transfert d'embryons et implications pathologiques .Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.

**[89] : WIEMREKIK, 2010.** Etude du profil d'expression génique des blastocystes chez le bovin.Mémoire pour le grade de Maître es science (M.Sc.) Faculté de médecine Université Laval Québec.

**[90] :W.KASSED, 2016.**Transfert embryonnaire .Mémoire de Docteur vétérinaire Institut vétérinaire de Blida.

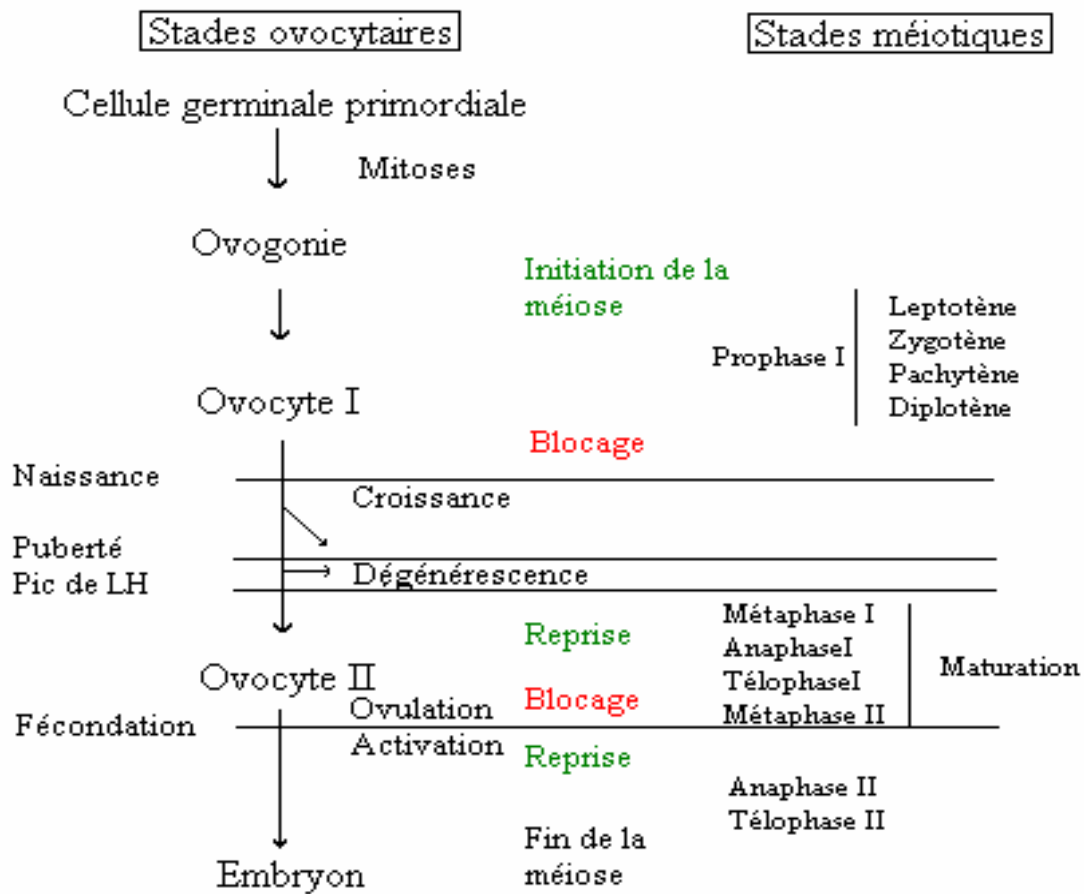
**[91]: WEBSTER. G, EDMONDSON A.J., I.J. LEAN, C.O. WEAVER AND T. FARVER, 1989.** A body condition scoring chart for Holstein dairy cows .J. Dairy Sci. 72:68-78.

**[92]:Y.LAURENT, DRAM .ED, HANZEN.C, HOUTAIN .JY, FALL.A, .**Profil de l'état corporel au cours du postpartum chez la vache laitière. Ann Med Vet, **1999**,143.

**[93] :Y. ROLLIN, GUYOT H., L. THERON, A. SIMON, C. HANZEN, G. LAMAIN. 2011 .**Carnet Clinique de médecine de troupeau Liège, Juillet 2011 3ème édition Office des Cours – FMV p 101

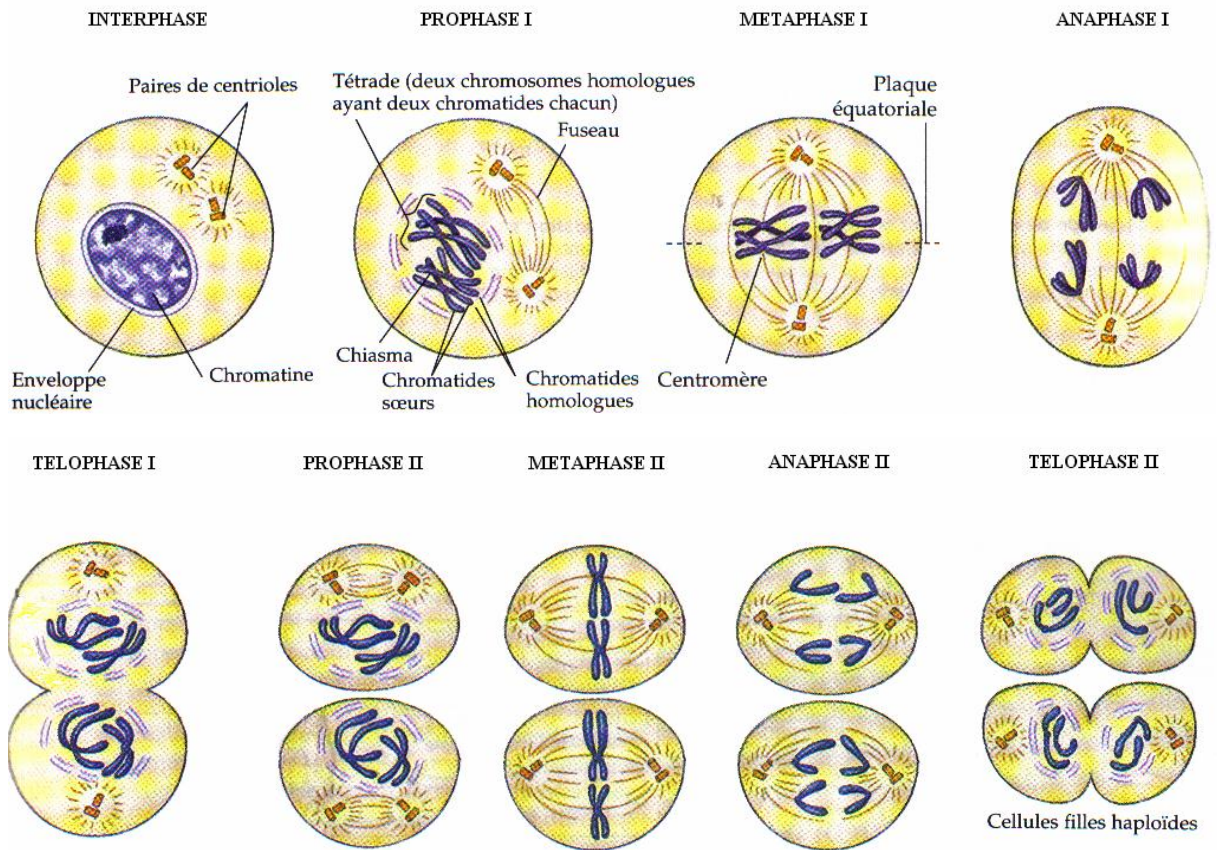
**[94] :Y.STEPHANE, FREDERIC, RODOLPHE LEGRAND ,2003.**Transfert embryonnaire en race charolaise en clientèle : Etude des facteurs de réussite liés à la receveuse et à l'embryon. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

**[95] : Z.BAZIN, 1984.** Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches pies-noires. ITEBRNED. Paris (France). 31 p.

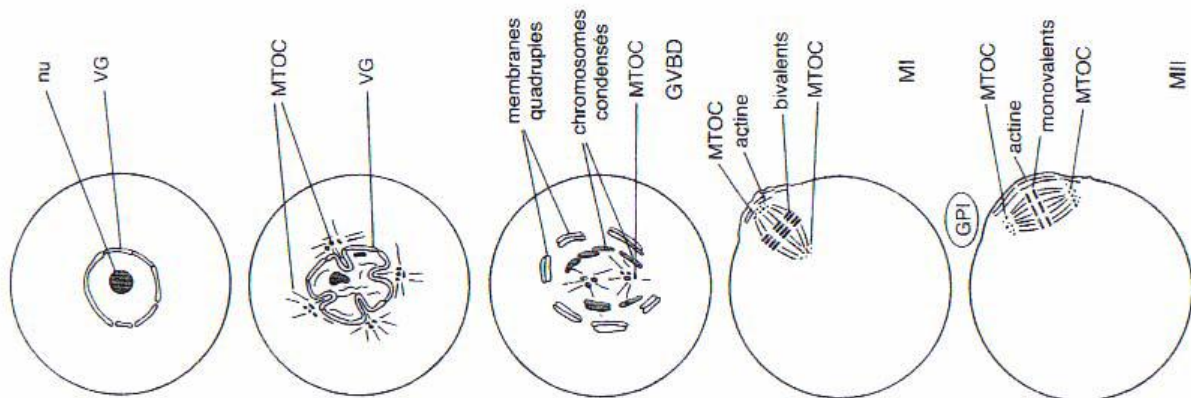


**Figure I.1** : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à l'embryon (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). [15]





**Figure I.2 :** Phases de la méiose (d'après Campbell, 1995). [15]



**Figure I.3 :** Changements nucléaires et formation de la première division méiotique chez les rongeurs (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). [15]

VG : vésicule germinative ; GVBD rupture de la vésicule germinative ; nu : nucléole ;  
MTOC : centre organisateur des microtubules ; MI : métaphase de première division  
méiotique ; MII : métaphase de deuxième division méiotique ; GPI : premier globule polaire.

## Réponses à un stress :

Le stress se manifeste dans des situations : originales, imprévisibles, manque de contrôle et menace à l'ego. [29][30]

Selye conclut que la réaction de stress est non spécifique du stressor. Les agents nocifs produisent, quelle que soit leur nature et d'une manière non spécifique un ensemble de réactions qu'il a nommé « syndrome général d'adaptation » qui se traduit principalement par la sécrétion d'hormones corticostéroïdes et de catécholamines dans le flux sanguin. [7][30]

Ce syndrome se décompose en 3 phases : [7] [30] [37]

- La phase d'alarme ou d'urgence qui active le système orthosympathique (production de catécholamines) et durant laquelle l'organisme réagit au stimulus ressenti. [7] Cette phase peut durer 20 à 30 minutes. [37]
- La phase de résistance qui active le système neuroendocrinien (synthèse de glucocorticoïdes) et durant laquelle l'organisme est capable de répondre aux exigences physiologiques du maintien de son homéostasie. [7][37][13]

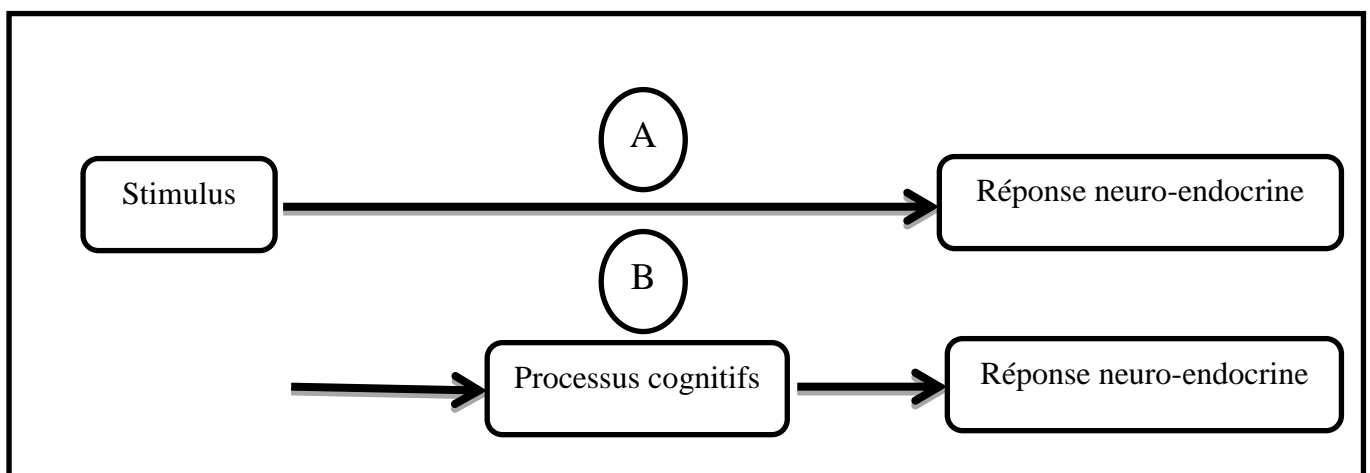
C'est un processus compensatoire pour restaurer la balance physiologique, il prolonge l'action des catécholamines [13]

Il apparaît divers dérèglements métaboliques, hormonaux et atteintes d'organes. [30]

- la phase d'épuisement où les limites de tolérance de l'organisme sont dépassées et au cours de laquelle peuvent apparaître diverses maladies. Cette phase survient si le stimulus se maintient et que la situation de stress persiste. [7][13]

Suite aux progrès de la science dans le domaine de la neuro-endocrinologie le schéma de Selye a été remis en cause.

En effet le caractère systématique, quasi réflexe, de la réaction de stress est contesté et on prolonge à l'heure actuelle son concept par un schéma dit « transactionnel » qui fait intervenir un maillon supplémentaire qui est l'interprétation du stimulus par l'individu ou la perception que l'individu a de la situation.[7]



(A) : Le modèle stimulus-réponse de Selye.

(B) : Le modèle transactionnel.

**Figure II.1** : Schémas conceptuels du stress. [7]

La perception d'un déséquilibre entre les contraintes que lui imposent son environnement et l'autoévaluation de ses propres capacités pour y faire face est une notion importante. [43]

Le stress est donc un état de débalancement de l'équilibre du corps et qui est perçu comme étant menaçant pour l'individu. Son ampleur est déterminée par l'interprétation de la situation. [43][30]

De l'évaluation et de l'interprétation ainsi que des mécanismes cognitifs-émotionnels en jeu, il en ressort un état dit « subjectif », donc propre à un sujet en interaction avec son environnement. [30]

Le stressor aura des effets différents, de nuls à délétères, selon les caractéristiques individuelles génétiques et acquises du sujets : processus de stress, maîtrise de l'homéostasie, capacités d'ajustement, histoire personnelle, vulnérabilités potentielles. [30]

Face à une agression donc à une situation de stress l'organisme tente de rétablir son homéostasie par trois réponses possibles :

- **Comportementale : [7] [37]**  
Réponse la plus simple et la plus fréquemment mise en œuvre par l'organisme. Cette réponse permet à l'organisme de s'éloigner du stressor sans l'éliminer et fait intervenir le cortex moteur ainsi que le système myoarthrosquelettique. Par exemple un animal qui a trop chaud va rechercher une zone plus fraîche : il s'agit d'une réponse adaptée au stimulus ressenti.
- **Nerveuse autonome : [7] [37]**  
Il s'agit d'une réponse rapide et non spécifique mise en œuvre par le système orthosympathique. Par exemple, la peur provoque une augmentation du rythme cardiaque via la libération de catécholamines (noradrénaline par les fibres nerveuses et adrénaline par la Médullo-surrénale).
- **Neuroendocrinienne : [7] [37]**  
Met en œuvre l'axe hypothalamo-hypophysaire et ses différents effecteurs que sont les glandes endocrines, les glandes surrénales principalement. La plaque tournante de ce système est l'hypophyse qui est régulée par l'hypothalamus via des neuro-hormones.

### **Physiologie du stress :**

L'organisme gère les changements corporels et émotionnels imposés par les perturbations environnementales par des mécanismes adaptatifs et vitaux construits pour rétablir les équilibres physiologiques, lesquels sont essentiellement non conscients. [30]

Le stress met en œuvre le système sensoriel, qu'il soit interne ou externe, puis le système nerveux central qui intègre les informations obtenues et orchestre une réponse biologique non spécifique au stressor. [7]

## 1. Structure impliquées dans la réponse du stress : [37]

- Thalamus : Centre spécialisé dans la gestion des messages en provenance des organes sensoriels olfactifs, kinesthésiques lesquels sont ensuite dirigés vers les aires spécifiques du cortex cérébral.
- Amygdales : Centre de commandement recevant rapidement une information brute en provenance du thalamus pour une action immédiate.
- Hippocampe : Centre d'intégration de la mémoire. Il reçoit du cortex d'une façon différée l'information nécessaire pour l'élaboration des souvenirs conscients à propos d'évènements récents.
- Hypothalamus : Sensible à l'action des stressés émotionnels, libère les hormones ou les transmetteurs nécessaires à la mise en place de la réponse « Fuite-agressive » par le biais du système nerveux autonome.
- Hypophyse : Situé sous l'hypothalamus dans la région basale moyenne du cerveau et divisée en une partie antérieure et une partie postérieure.
- Glandes surrénales : situées juste au-dessus de chacun des deux reins. Elles sont impliquées dans de très nombreuses fonctions de l'organisme via de nombreuses hormones qu'elles synthétisent et relâchent dans la circulation sanguine.
- Organes sensoriels internes (tels les récepteurs carotidiens de la pression artérielle) et externes (récepteurs sensoriels classiques du toucher, de la douleur, de la chaleur...)

## 2.-Etapas de la réponse a un stress :

L'homéostasie implique des servomécanismes locaux permettant de maintenir les équilibres au sein des systèmes physiologiques.

La réponse adaptative de l'organisme est extrêmement rapide, organisée par le système sympathique et la glande médullo-surrénale sous le contrôle du système nerveux central. Il s'agit d'une activation générale avec réaction émotionnelle. [30]

Dans des cas extrêmes, l'application prolongée d'un stress ou d'un stress intense conduit à l'épuisement, la maladie et la mort de l'animal : les mécanismes physiologiques, d'ajustement et d'évaluation, sont débordés. [76][30]

Néanmoins, le stress n'a pas qu'un impact négatif ; il permet, entre autres, la survie de l'animal et son adaptation. [76]

### 2. A. Prise en charge du stressé :

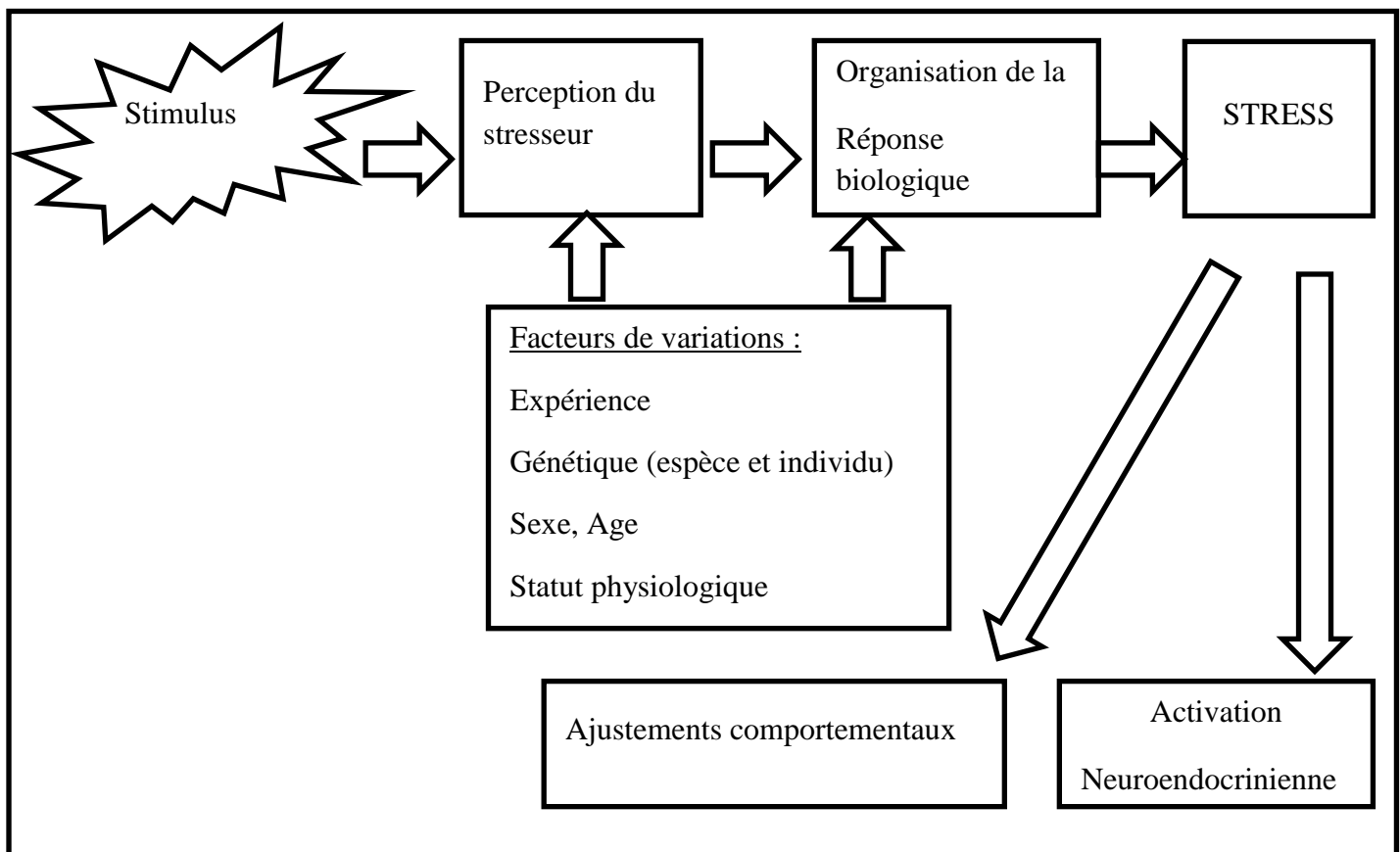
- Réception du stressé par les organes sensoriels (les stimuli psychologiques et sociaux sont directement « ressentis » au niveau du cerveau). [29][7]

- Intégration et traitement de l'information afin d'en déterminer le niveau «d'agressivité» et programmation de la réaction au stress au niveau du cortex sensoriel et du système limbique. [29][7]

Le couple cortex/système limbique est un système d'analyse comparative utilisant comme banque de données des "souvenirs" issus d'expériences affectives et de l'apprentissage. [29]

- Déclenchement de la réponse de l'organisme via l'amygdale et l'hippocampe qui agissent sur l'hypothalamus et la formation réticulée du tronc cérébral afin d'activer le système nerveux sympathique et les glandes surrénales. [29]

De nombreux facteurs sont capables d'influencer la perception et l'intégration d'une information, tels que l'âge, la maturité du système nerveux, le sexe de l'individu mais aussi une certaine prédisposition ou une sensibilité plus importante en relation avec le patrimoine génétique de chaque individu. [7]



**Figure II.2 :** Quelques facteurs modulant la perception et réaction face à un stressor potentiel [7]

## 2. B. Ajustement comportemental : [7]

Le premier système biologique activé est le système myoarthrosquelettique qui participe à la réponse comportementale de l'organisme.

Souvent cette réponse suffit pour rétablir l'homéostasie mais dans le cas contraire c'est les systèmes neuro - endocriniens : sympathique et corticotrope principalement, qui sont mis en œuvre de façon non spécifique

## 2. C. Réponses neuro-endocrine :

### ➤ La réponse adrénérurgique :

Le système nerveux autonome orthosympathique est très rapidement activé lors de stress chez un organisme. Il dispose de deux modes d'action : l'un local et ciblé via les fibres nerveuses post-ganglionnaires et l'autre à distance vis-à-vis de l'ensemble des organes possédant les récepteurs adéquats via la circulation sanguine qui véhicule les catécholamines libérées par les glandes surrénales [7]

Les catécholamines sont synthétisées quelques dizaines de secondes après la stimulation initiale et ne restent que quelques minutes dans le sang en raison de leur courte demi-vie. [13]

Leur action générale permet d'initier des processus biologiques permettant la fuite, la lutte ou l'effort d'adaptation.

Il y a une corrélation étroite entre l'amplitude de la libération de catécholamines et l'intensité du stresser. [13]

Cette libération sanguine des catécholamines par le système sympathique dit également catabolique va entraîner : [13] [7]

- ✓ Une augmentation de la glycolyse au niveau des muscles squelettiques et du foie.
- ✓ Une augmentation de la lipolyse par une action sur les cellules adipeuses.
- ✓ Une augmentation de la fréquence des battements cardiaques et de la force de contraction du cœur
- ✓ Une augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle (vasoconstriction).
- ✓ Une augmentation de la fréquence respiratoire et dilatation des bronchioles (Une oxygénation optimale).
- ✓ Une augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine par une libération des érythrocytes de la rate.
- ✓ Inhibition de la sécrétion d'insuline par le pancréas et réduction de l'utilisation de glucose par les tissus insulino-dépendants.

La réponse adrénérurgique est donc rapide suite à la perception du stresser, elle est de courte durée cependant elle induit d'importants changements physiologiques et biochimiques au niveau de l'organisme.

### ➤ La réponse de l'axe corticotrope :

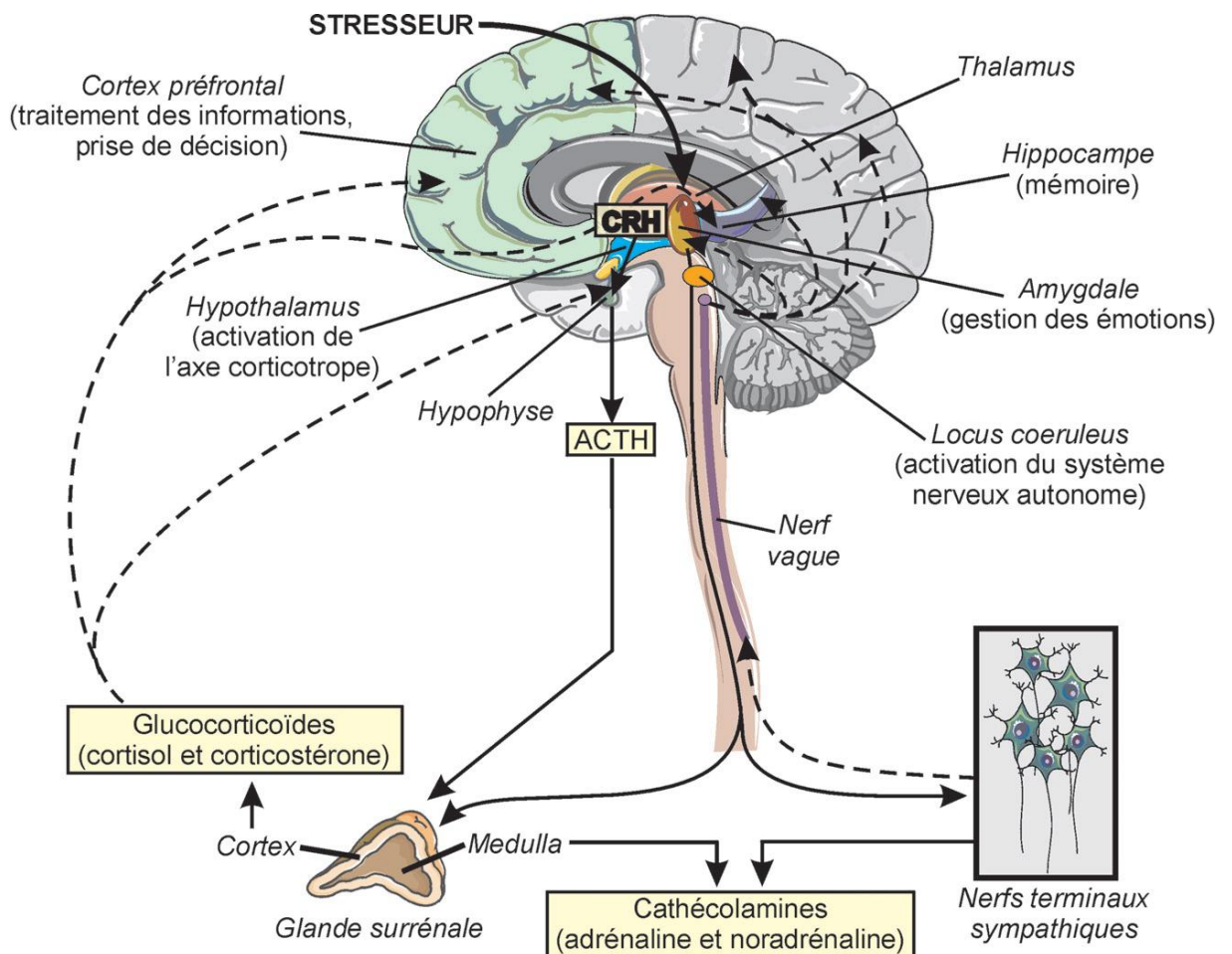
L'axe corticotrope aussi appelé hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien est sous le contrôle des centres nerveux supérieurs et a, avec eux, des connections anatomiques ; le noyau para-ventriculaire reçoit des fibres noradrénergiques issues du tronc cérébral. Les catécholamines centrales ont un effet stimulant sur l'axe corticotrope [7]

Les glucocorticoïdes représentent le principal facteur d'inhibition de l'axe corticotrope. Ils exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de l'Adreno-Cortico-Trophic Hormone (ACTH) et de l'hormone de relargage du Cortisol (CRH) ce qui permet de réguler la sécrétion de cortisol dans le sang. [13][7][30]

Dans une situation de stress, l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien intervient dans un premier temps par la libération d'ACTH puis de glucocorticoïdes. [76]

L'hypothalamus est le premier maillon de cet axe, il sécrète l'hormone de relargage du Cortisol (CRH/F pour Cortisol Releasing Hormone/Factor)). [13]

La CRH stimule l'antéhypophyse grâce au système porte pour synthétiser l'ACTH dite hormone corticotrope ou de stress, qui stimule la production de cortisol au niveau de la medullo- surrénale. [13][30]



**Figure II.3 :** Effet du stress aigu sur le cerveau [30]

Le cortisol n'est pas une réponse destinée à agir ou à se détendre immédiatement mais surtout à résister dans l'épreuve. [73]

Le rôle physiologique de l'augmentation des gluco-minéralocorticoïdes lors du processus de stress est de protéger contre toutes les réactions de défenses activées par le stress en les contrecarrant et les empêchant d'aller au-delà des mécanismes homéostatiques. [30]

Il existe deux types de récepteurs aux glucocorticoïdes. Les récepteurs de type I (ou rénaux ou récepteurs aux minéralocorticoïdes MR) possédant une très forte affinité pour les glucocorticoïdes et retrouvés en particulier dans le système limbique et les récepteurs de type II (ou hépatiques ou récepteurs aux glucocorticoïdes GR) qui ont une affinité environ dix fois moins importante pour les hormones glucocorticoïdes et sont représentés d'une manière ubiquitaire. Toute fois ces récepteurs existent dans l'hippocampe. [7] [30]

À l'état basal, les MRS sont occupés alors que les niveaux des hormones sont bas, les GRS n'étant que partiellement occupés. Sous l'effet des stressseurs et des sécrétions pulsatiles des corticostéroïdes, les GRS deviennent pleinement occupés.

Ainsi, l'activation des MRS garantit un niveau basal stable d'activation, l'homéostasie et l'activation des GRS (associée à celle des MRS) provoquent une activation neuronale intense en relation avec la nécessité adaptative [30]

Le cortisol se lie aux récepteurs, le complexe hormone-récepteur est transporté vers le noyau pour se lier sous forme de dimères au sein de l'ADN à des éléments de réponse spécifiques (G/M RE pour Glucocorticoid/ Mineralocorticoid Responsive Elements,) et ainsi affecter les taux de transcriptions des gènes répondant aux hormones. [30][13]

Les récepteurs, activés, peuvent bloquer ou stimuler l'activité d'autres facteurs de transcription par des interactions protéines-protéines résultant soit en une désensibilisation, soit en une hyper-activation de ces facteurs. Il en est ainsi pour des transmissions relevant de facteurs immunitaires [30]

- ✓ Action néoglucogénique : Les glucocorticoïdes augmentent la production de glucose à partir de substrats non glucidiques et notamment à partir des protéines. (Protéines de structures). [7][30][73]
- ✓ diminue l'absorption intestinale de calcium. [43]
- ✓ Action sur le système immunitaire en modifiant la numération et formule leucocytaire, diminution des lymphocytes T suppresseurs et une baisse de l'activité des cellules NK. [7][30][73]
- ✓ Les glucocorticoïdes modulent la réaction inflammatoire par :
  - Inhibition de la synthèse et de la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les monocytes. [7]
  - Activation de la synthèse d'une protéine, la lipocortine, qui a pour effet d'inhiber la formation des leucotriènes et des prostaglandines. [7]

Les conséquences physiologiques immédiates du stressseur seront donc, dans l'ordre chronologique, une augmentation du tonus cardiovasculaire l'activation immunitaire, la



mobilisation des sources d'énergie, la réduction ou la disparition des potentialités sexuelles et reproductives, l'augmentation du flux sanguin cérébral, la perte d'appétit, et la mise en route des processus de consolidation mnésique (action centrale sur l'hippocampe).et par la suite augmentation du taux sanguin du cortisol.[30]

Lorsque les mécanismes d'adaptation ont été efficaces, la cortisolémie revient à la normale. Cependant le stress n'est pas dépourvu de conséquences et ce même lorsque le stress est d'amplitude et de durée modérée donc de faible importance. [7] [13]

La sécrétion de corticostéroïdes qui augmente la néoglucogenèse et la mise à disposition de source d'énergie pour les muscles, mais qui dégrade également des protéines dites de structure pour y parvenir, diminue ainsi les capacités de croissance de l'organisme. [7]

Une hyper-cortisolémie prolongée est un indicateur de stress chronique. [13]

## SCORE CORPOREL :

### 1. Définition :

Indicateur de la Balance énergétique qui évalue la quantité de graisse sous-cutanée au niveau des lombes, du bassin et de la base de la queue sur une échelle de 1 (maigre) à 5 (gras). Le score corporel (S.C.) actuel reflète la balance énergétique passée mais l'évolution du S.C. reflète la balance énergétique actuelle. Ce score ne permet qu'une détection lente des problèmes (quelques semaines). [93]

### 2. Buts :

- Diminuer les fluctuations de S.C. durant la lactation
- Réduire le nombre de vaches à problèmes (trop grasses ou trop maigres)
- Evaluer indirectement l'adéquation entre apports alimentaires et production laitière


























Note de condition corporelle	Coupe transversale de l'épine dorsale (vertèbres lombaires)	Vue arrière (coupe) des hanches	Vue latérale de la ligne entre l'ischion et la hanche (apophyse transverse)	Cavité entre l'attache de la queue et l'ischion	
				Vue arrière	Vue de profil
1. Vache très maigre					
2. Ossature évidente					
3. Ossature et couverture bien proportionnées					
4. L'ossature se perd dans la couverture tissulaire					
5. Vache grasse					

Figure III.1 : Grille d'évaluation de la condition corporelle [91]

### 3. Moments :

Dans l'objectif de standardiser les recommandations et les objectifs de note d'état, il est important d'effectuer ce travail à des moments-clé du cycle de la vache : tarissement, vêlage, mise à la reproduction. Cela permet également de suivre l'évolution des réserves et donc la conduite d'élevage et de rationnement pendant des périodes stratégiques : période sèche, début de lactation [95].

### 4. Points forts/points faibles :

La notation de l'état corporel devient un outil indispensable dans le suivi des élevages bovins. Les intérêts et les limites d'utilisation sont synthétisés dans le tableau.

**Tableau III.1** : Points forts/points faibles de la notation de l'état corporel. [95]

Points forts	Points faibles
- Méthode rapide, non onéreuse, répétable 25, non invasive, ne nécessitant pas d'équipement spécifique 44, note indépendante du poids et de la taille de l'animal	- Plusieurs échelles : connaissance de l'échelle utilisée
- Connaissances des réserves énergétiques de l'animal /du troupeau	- Evaluation subjective
- Evaluation du statut nutritionnelle de l'animal / du troupeau	- Nécessité d'un suivi et d'une périodicité de la notation pour obtenir des résultats intéressants
- Evaluation de la conduite génétique et nutritionnelle du troupeau	



**Figure VI.1 :** DVM-NEFA pour le dosage des acides gras non estérifiés



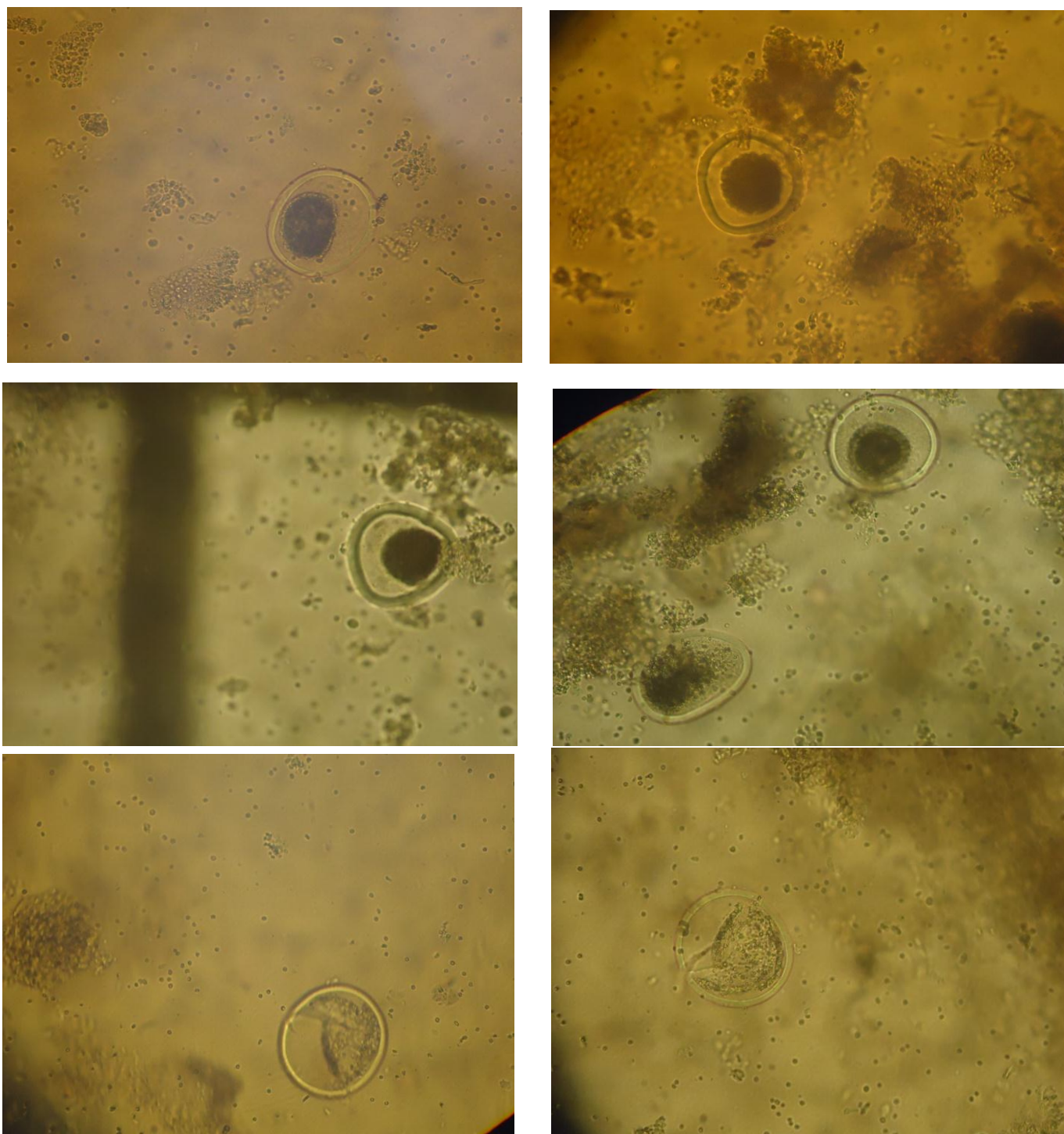
**Figure VI.2 :** Automate analyseur de type COBAS c 6000



**Figure VI.3 :** Lecteur OPTIUM EXCEED pour dosage de glucose et des BHB.

**Tableau V .I :** Profils biochimique et hormonaux des 21vaches durant la phase du suivi et de sélection.

VARIABLES	GLU (g/l)		UREE (g/l)		CHOL (g/l)		PRT (g/l)		ALBS (g/l)		CORT ng/ml		P4 (ng/ml)	
	J0	J11	J0	J11	J0	J11	J0	J11	J0	J11	J0	J11	J0	J11
<b>N° VACHES</b>														
<b>1</b>	0,37	0,23	0,26	0,12	1,32	1,44	66,9	65,7	31,8	33	5,28	5,53	0,271	0,087
<b>2</b>	0,29	0,06	0,24	0,15	1,41	1,3	69,8	64,4	29,7	32,9	6,37	7,35	1,73	2,58
<b>3</b>	0,38	0,16	0,23	0,14	1,15	1	69	57,8	30,8	29,7	14,97	19,61	0,869	4,39
<b>4</b>	0,366	0,2	0,27	0,1	0,8	0,92	76,5	70,7	25,9	28,7	6,21	4,33	0,816	0,334
<b>5</b>	0,44	0,25	0,19	0,14	1,51	1,33	68,2	56,9	32,9	31,6	9,41	1,25	2,82	1,77
<b>6</b>	0,43	0,31	0,23	0,17	1,73	1,72	75,2	69,5	35,4	36,7	9,6	3,23	2,56	2,87
<b>7</b>	0,43	0,17	0,21	0,13	1,09	1,13	76,2	69,1	24,3	24,9	12,9	9,48	6,58	2,04
<b>8</b>	0,37	0,09	0,18	0,14	1,19	1,23	66,4	62,3	31,8	32,9	4,68	6,63	0,237	0,135
<b>9</b>	0,46	0,21	0,28	0,13	1,91	1,44	80	69,5	31,2	29,6	8,85	5,77	0,48	0,32
<b>10</b>	0,46	0,25	0,25	0,22	0,93	0,87	66,4	63,4	27,5	25,8	29,09	10,27	2,54	1,49
<b>11</b>	0,41	0,2	0,15	0,12	1,38	1,21	65,2	56,6	34	31,8	3,71	6,43	3,64	0,29
<b>12</b>	0,34	0,17	0,23	0,11	1,08	0,95	75,2	71,5	29,9	23,1	8,26	2,01	0,398	0,234
<b>13</b>	0,38	0,14	0,18	0,13	1,09	1,05	65,8	58,7	29,2	29,1	6,73	0,909	2,05	0,146
<b>14</b>	0,43	0,17	0,22	0,13	1,38	1,52	69,8	70,6	30,9	33,9	9,96	2,13	3,68	0,398
<b>15</b>	0,32	0,08	0,28	0,15	1,51	1,51	71,1	62,2	31,6	31,3	8,82	13,63	0,279	0,147
<b>16</b>	0,35	0,06	0,24	0,15	1,22	1,11	71,6	62,6	35,7	33,2	2,1	3,18	0,438	2,36
<b>17</b>	0,3	0,22	0,2	0,13	1,54	1,76	74,6	74,7	32,7	36,3	22,58	6,58	5,2	1,3
<b>18</b>	0,49	0,23	0,2	0,12	1,02	1,4	68	66,2	31,9	32,1	3,59	7,12	0,537	7,12
<b>19</b>	0,45	0,26	0,24	0,13	1,24	1,28	72,2	63	32,7	32,1	6,08	4,12	0,389	0,271
<b>20</b>	0,46	0,35	0,12	0,15	1,2	1,09	63,6	64,3	28,8	34	7,55	0,598	0,741	0,906
<b>21</b>	0,43	0,16	0,16	0,15	1,33	1,11	76,5	73,7	35,3	27,8	8,39	10,06	0,369	3,19
<b>MOY</b>	0,40	0,19	0,22	0,14	1,29	1,26	70,87	65,40	31,14	30,98	9,29	6,20	1,74	1,54
<b>ECART TYPE</b>	0,06	0,08	0,04	0,02	0,26	0,25	4,56	5,42	2,95	3,51	6,35	4,61	1,80	1,78



**Figure VII.1** : Quelques images de l'embryon et des ovocytes récupérés de la récolte de la vache N° 6325