

1013THV-1



1013THV-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOC

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

UNIVERSTE SAAD DAHLAB -BLIDA-

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES VETERINAIRE DE BLIDA

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DE :

DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

**THEME**

**ETUDE DE LA RÉACTION DES VACHES AU  
TRAITEMENT DE SUPEROVULATION A  
BASE DE FSH**

Réalisé par : *Amis Ouerdia Warda*

et

*Chouihi Fatma*

Jury :

- *Promoteur : Mr.ADEL D.*

*MAA à INV*

- *Examineurs : Mr. KAIDI R.*

*Pr à INV*

*Mr.BESBACI M.*

*MAA à INV*

Année universitaire : 2014 -2015

## **REMERCIEMENTS:**

*Nous remercions le bon DIEU qui nous a donné la volonté, le courage et la force, pour accomplir ce modeste travail, qui nous a permis de mettre en application le savoir acquis au sein de l'institut.*

*Nous tenons par le présent travail à témoigner notre reconnaissance envers notre promoteur et encadreur Mr ADEL DJALLEL pour toute son aide et sa disponibilité ainsi que ses conseils.*

*Sincères remerciements*

*Aux jury: Pr KAIDI R. M.A. BESBACI M.*

*A nos collègues pour leur conseils ainsi que leurs aides.*

*A « ammi NASSER », l'employeur au niveau de la station expérimentale pour son aide et sa disponibilité.*

*A tous nos enseignants qui nous en former durant toutes nos années scolaire jusqu'à la faculté.*

## « Dédicaces »

*Je dédie ce modeste travail:*

- ❖ *A mes très chers parents à qui je dois tout, je profite de les remercier pour leur encouragement, leur aide, le soutien qu'ils m'ont apporté et le sacrifice qu'ils ont fait pour moi, que Dieu les protège et les entoure de sa bénédiction.*
- ❖ *A mes chers frères: «Yahia» «Said» «Ismail» «Housseem» et « leurs femmes»*
- ❖ *A ma chère sœur «Assia»*
- ❖ *Mes niesses «Lamis», «Ilhame» et «Ghofrane» et mes neveux «Aniss»*
- ❖ *A toute ma grande famille grands parents paternels et maternelle, oncles,tantes et cousins (es)*
- ❖ *Et surtout à toi ma binome «Warda» et sa famille*
- ❖ *A tous mes amis «Fatouma» «Yamina» «Asma» « Abir» «Amel» «Sabiha» «Samia» et «Zola»*
- ❖ *A tous mes collègues de la promotion (2015-2016).*
- ❖ *A mon promoteur qui nous a aidé, a tous ceux qui me sont très chers et la famille «Belmili».*

« **FATMA** »



## *« Dédicaces »*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude a mes chers parents; qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et mon éclairé le chemin par leur conseil judicieux.*

❖ *J'espère qu'un jour,*

*Je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prêtent bonheur et longue vie inshallah.*

❖ *Je dédie aussi ce travail a mon cher mari qui m'a beaucoup aidé et soutenu jusqu'à la fin de mon cursus sans oublier mes chères sœurs et mon cher frère, mes neveux et nièces.*

❖ *A toute ma famille et ma belle famille.*

❖ *A mon chère binôme « FATMA » et toute sa famille et a nos amies.*

❖ *Aussi bien a mon promoteur qui nous a encadré, mes professeurs qui m'ont enseigné, a mes confrères et consœurs de ma promos «2010-2015» et a tous ceux qui sont chers pour nous.*

*« WARDA »*



## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Chronologie du developpement folliculaire (D'après FIENI et al, 1995).....	04
<b>Figure 02:</b> Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel.(Source UNCEIA Groupe Fertilité Femelle 2006 ).....	12
<b>Figure 03:</b> Echographie d'un ovaire d'une vache superovulée (HANZEN 2009).....	22
<b>Figure 04:</b> Ovaire des vaches superovulées (HANZEN 2009).....	22
<b>Figure 05:</b> Chronologie du développement (j0 à j9) (InWINTERERGER- TOMES et SEVELLEC 1987.....	25
<b>Figure 06:</b> Dépôt de la semence dans les voies génitales de la vache (Source: BARRET, 1992)..	31
<b>Figure 07:</b> Matériel d'insémination.....	41
<b>Figure08:</b> Matériel de récolte et recherche d'embryons.....	43

## Liste des photos

<b>Photo A:</b> Glaire cervicale au moment d'œstrus (Vache 9003).....	44
<b>Photo B:</b> Cuve d'azote.....	46
<b>Photo C:</b> Insémination artificielle.....	47

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau I:</u></b> Classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCEIA 1990).....	29
<b><u>Tableau II:</u></b> Cheptel expérimental utilisé....	40
<b><u>Tableau III:</u></b> Dates d'apparition des chaleurs.....	45
<b><u>Tableau IV:</u></b> Traitement effectué.....	46
<b><u>Tableau V:</u></b> Suivi des dernière chaleurs avant l'initiation du traitement.....	47
<b><u>Tableau VI:</u></b> Résultat du traitement de la superovulation.....	48

## Liste des abréviations

E2: œstrogène.

eCG: equine Chorionic Gonadotropin.

FCS: FetalCalf Serum.

Folltropin V est un extrait pituitaire porcin constitué de 84% FSH et 16% LH Mapletoft.

FSH: Follicule Stimulating Hormone.

FSHp: Follicle Stimulating Hormone d'origine porcine.

GnRH: gonadotrophin releasing hormone.

IA: Insémination Artificielle.

IGF1: Insulin-Like Growth Factor 1.

L'antigène HY: est élément d'histocompatibilité qui ne se forme qu'à la surface des cellules males.

LH: Luteinizing Hormone.

NaCL: Chlorure de sodium.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

PEG: un polyéthylène glycol.

PGF2 $\alpha$ : Prostaglandine F2 $\alpha$ .

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin.

TGF-b: Transforming Growth Factor-b.



## Résumé:

La super ovulation est une biotechnologie qui a pour but de produire des embryons à partir d'un animal de haute qualité génétique. C'est ainsi que les chercheurs dans ce domaine ont mis au point une méthode qui a permis d'utiliser le potentiel reproductif de la vache. En effet, en injectant une gonadotropine à certain moment du cycle on peut induire une superovulation.

L'objectif principal de notre étude est la réduction du nombre d'injections d'un traitement de superovulation par la pFSH sur la réponse super-ovulatoire chez des vaches de races Prim Holstein au niveau de la station expérimentale de la faculté agro-vétérinaire et biologie de l'Institut de Blida.

Notre expérience a concerné 5 vaches laitières de race Prim Holstein. Un traitement par un extrait hypophysaire « Stimufol » (gonadotrophines hypophysaires FSH/LH 40%) a été appliqué selon un planning rigoureux sur chaleurs de références et chaleurs de superovulation, une double insémination artificielle a été réalisée à 50 et à 60 heures après l'injection de la prostaglandine suivie d'une récolte par lavage utérin et une évaluation et enfin une classification sous microscope photonique des embryons.

Au traitement de superovulation, la vache traitée a bien répondu, par une bonne qualité de chaleurs et un embryon dégénéré et 5 ovocytes non fécondés, alors que l'autre vache, n'a eu aucune réaction au traitement.

D'autres travaux sur un nombre de récoltes plus importants sont nécessaires pour plus de certitude. Cela nous permettra de maîtriser la technique et de pouvoir la proposer aux éleveurs.

**Mots clé:** superovulation, œstrus, récolte embryonnaire, bovin, vaches, Follicule stimulation hormone porcine (pFSH).

**summary:**

Superovulation is a biotechnology that aims to produce embryos from an animal of high genetic quality. Thus researchers in this area have developed a method of using the reproductive potential of the cow. Indeed, by injecting gonadotropin at some point in the cycle can produce superovulation.

The main objective of our study is the reduction in the number of injections of a superovulation treatment by the super-pFSH ovulatory response in Prim Holstein cows at the experimental station of the agro-veterinary faculty and biology of the Institute of Blida.

Our experience has involved two Holstein dairy cows. Treatment with pituitary extract « Stimufol » ( pituitary gonadotropins FSH/LH 40%) which was applied for two cows in a rigorous schedule of heats and heats of reference superovulation, a double artificial insemination was performed at 50 and 60 hours after injection of prostaglandin followed by harvesting a flushing and evaluation and finally a classification under optical microscope embryo

Treatment of superovulation, the cow treated has answered by a good quality of heat and a degenerated embryo and unfertilized oocytes 5, while the other cow, had no reaction to treatment.

Further work on a number of important corps is needed for greater certainty. this will also allow us to master the technique and be able to offer to farmers.

**Key words:**

superovulation, estrus, embryo harvesting, bovine, Cows, porcine Follicle Stimulating Hormone (PFSH).

## ملخص

فرط الإباضة هي التكنولوجيا الحيوية التي تهدف إلى إنتاج اجنة انطلاقا من حيوان ذو نوعية وراثية عالية و بالتالي فقد طور الباحثون في هذا المجال وسيلة لاستخدام الامكانيات الانجابية للبقرة

في الواقع يمكن من خلال حقن الغدد التناسلية و في وقت معين مضاعفة انتاج البويضات (فرط الإباضة)

الهدف الاساسي لدينا هو تقليص عدد الحقن لفرط الإباضة بعلاج هرموني

شملت التجربة خمسة ابقار حلوب من نوع بريم هولشتاين تمت معالجة الابقار بواسطة مستخرج من الغدة النخامية ستيמיبول

و هذا طبقا لجدول زمني و قد تم التلقيح الاصطناعي على مرتين (مزدوج) خمسون ساعة و ستون ساعة بعد حقن FSH/LH 40% البروستاجلوندين تم حصاد الاجنة و التقديم

البقرة 9003 استجابة للعلاج لفرط الإباضة نوعية جيدة من الحرارة و جنين (رديء) و خمس بويضات غير ملقحة الا ان البقرة

5001 لم تستجيب و لم تكن لها اي ردة فعل للعلاج

هناك حاجة للمزيد من العمل على عدد المحاصيل لمزيد من اليقين هذا سوف يسمح لنا باتقان هذه التقنية و اقتراحها على المربيين

## مفتاح الكلمات

العلاج الهرموني , الابقار, الحصاد الجنيني, فرط الإباضة



## Table de matière

○	Liste des figures et photos.....	I
○	Liste des tableaux.....	II
○	Liste d'abréviation.....	III
○	Résumé.....	IV
○	Abstrat.....	V
○	ملخص.....	VI

### Introduction générale.

### La partie bibliographique:

#### Chapitre I: physiologie du fonctionnement ovarien chez la vache

laitière.....	1
I.1. Introduction.....	1
I.2. Aspect morphologique du développement folliculaire.....	1
I.2.1. Phase de multiplication.....	1
I.2.2. Phase de croissance.....	2
I.2.2.1. Le follicule primordial.....	2
I.2.2.2. Le follicule primaire.....	2
I.2.2.3. Le follicule secondaire.....	2
I.2.2.4. Le follicule tertiaire.....	3
I.2.2.5. Le follicule mur (Follicule de De Graaf ).....	3
I.2.3. Phase de maturation.....	4
I.3. L'atrésie folliculaire.....	5
I.4. Dynamique de la croissance folliculaire.....	5
I.4.1. Recrutement.....	5
I.4.2. Sélection.....	6
I.4.3. Dominance.....	6
I.5. Physiologie du cycle œstral.....	7
I.5.1. Les différentes phases du cycle œstral.....	7
I.5.1.1. Pr-œstrus.....	7
I.5.1.2. Œstrus.....	7
I.5.1.3. Met-œstrus.....	7
I.5.1.4. Di-œstrus.....	8
I.6. Les hormones intervenants dans la régulation du cycle œstral.....	8
I.6.1. Les hormones d'origines hypothalamique.....	8
I.6.1.1. GnRH.....	8
I.6.2. Les hormones d'origines hypophysaires.....	8
I.6.2.1. FSH.....	8
I.6.2.2. LH.....	9

I.6.3. Les hormones d'origine folliculaire.....	9
I.6.3.1. Action inhibitrice sur la croissance folliculaire.....	9
I.6.3.1.1. Inhibine.....	9
I.6.3.2. Action stimulante sur la croissance folliculaire.....	9
I.6.3.2.1. Follistatine.....	9
I.6.4. Les hormones d'origine ovariennes.....	10
I.6.4.1. Oestrogène.....	10
I.6.4.2. Progestérone.....	10
I.7. La composante comportementale.....	11
I.7.1. Détection de l'œstrus.....	11
I.7.2. Les manifestation de l'œstrus.....	13
I.7.3. La durée et l'intensité de l'œstrus.....	13
I.8. Développement embryonnaire.....	13

## Chapitre II: Superovulation et récolte des embryons.

II. Superovulation.....	16
II.1. Préparation de la donneuse.....	16
II.1.1. Choix de la donneuse.....	16
II.1.2. Examen de la donneuse.....	17
II.1.3. Age.....	17
II.1.4. Etat sanitaire.....	17
II.2. Préparation des receveuse.....	17
II.3. Les différentes hormones utilisées dans le traitement de superovulation....	18
II.3.1: eCG: equine Chorionic Gonadotrophine.....	18
II.3.2. Prostaglandine (PGF2α).....	19
II.3.3. Les extraits hypophysaires.....	19
II.3.4. FSH.....	19
II.4. Facteurs de variation.....	20
II.4.1. Le statut ovarien.....	20
II.4.2. Variabilité entre individus dans population folliculaire ovarienne et liens fonctionnel dans un individu.....	23
II.5. Facteurs déterminants la réponse de superovulation.....	23
II.5.1. Facteurs extrinsèques.....	23
II.5.1.1. Climat.....	23
II.5.1.2. Alimentation.....	24
II.6. Récolte.....	24
II.6.1. Matériel.....	25
II.6.2. Technique (Chirurgicale et non chirurgicale).....	26
II.6.2.1. Chirurgicale(Récolte invasive).....	26
II.6.2.2. Non chirurgicale (Ou voie cervicale).....	27
II.6.3. Examen et classification des embryons.....	27
II.7. Technique d'insémination artificielle.....	29
II.7.1. Moment de l'insémination artificielle.....	29



II.7.2. Procédé d'insémination artificielle.....	29
--	----

### Chapitre III: transfert embryonnaire

III. Transfert embryonnaire.....	31
III.1.Introduction.....	31
III.2. Technologies liées au transfert d'embryons.....	31
III.2.1. La cryoconservation des embryons.....	31
III.2.2. Le sexage des embryons.....	32
III.2.3. Les micromanipulations d'embryons.....	33
III.2.4. Les techniques de micro-njections.....	34
III.2.5. La fécondation in vitro.....	34
III.3. Les avantages des transfert d'embryons.....	34
III.4. Technologies des procédures de transfert embryonnaire.....	35
III.4.1. La gestion des donneuses.....	35
III.4.1.1. La sélection des donneuses.....	35
III.4.1.2. L'alimentation de l'animal donneur.....	35
III.4.1.3. Le cycle œstral de la donneuse.....	35
III.4.1.4. La gestion des donneuses et receveuses.....	36
III.4.1.4.1. La détection de l'œstrus.....	36

### La partie expérimentale

1. Introduction.....	39
2. L'objectif.....	39
3. Matériels et méthodes.....	39
3.1. Matériel.....	39
3.1.1 Animaux.....	39
3.1.2 . Médicaments.....	40
3.1.3. Matériel de la contention.....	40
3.1.4.Matériel du traitement.....	41
3.1.5. Matériel de l'insémination.....	41
3.1.6. Matériel de récolte et recherche d' embryon.....	42
4. Méthodes.....	44
4.1. Détection des chaleurs.....	44
4.2. Le traitement de superovulation, l'insémination et la récolte.....	45
5.Résultat.....	47
5.1. Résultat de suivi des chaleur.....	47
5.2. La réponse a la superovulation.....	48
5.3. La récolte des embryons.....	48
6. Discussion.....	49
7. Conclusion.....	50



## Introduction générale:

La réponse au traitement de super-ovulation reste le facteur limitant essentiel du nombre d'embryons produits par vache traitée. L'étude des relations entre réponse au traitement et état de la population folliculaire met en évidence les moyens d'améliorer cette réponse.

L'amélioration génétique des troupeaux s'est développée de façon remarquable grâce à l'insémination artificielle, technique mise au point dans les années 50 et qui a connu depuis un développement considérable puis-qu'à présent, la quasi totalité des vaches laitières et environ 10% des femelles de races à viande sont inséminées. L'autre méthode qui a permis l'acceptation du progrès génétique est plus récente: c'est le transfert embryonnaire. Cette technique a commencé à être utilisée dans les élevages à la fin des années 70.

En France, afin que la mise en place de cette nouvelle technique se fasse avec le maximum d'efficacité, «un programme national pour l'étude et le développement de la transplantation embryonnaire» a été décidé par le ministère de l'agriculture, programme qui a duré 3 ans (1979-1981) sous la direction conjointe de l'INRA et de l'ITEB. Cette organisation s'est avérée fructueuse puisque, le nombre moyen de bons embryons produits par femelle traitée est passé de 2,4 à 4,4. Il est vrai que tout était à valider; méthodes des stimulation ovarienne et d'insémination, technique de collecte, critère de jugement des embryons. Cependant bien que la technique ait été améliorée sur bien, des aspects, les bilans annuels des opérations de productions d'embryons par animal traité n'a pratiquement pas évalué depuis cette époque.

Le nombre d'insémination a été progressivement réduit à 2 (12h et 24h après le début des chaleurs) sans que le pourcentage d'œufs fécondés soit affecté. Il a même été montré que si l'œstrus était détecté avec beaucoup de rigueur, une seule insémination était suffisante (LACAZE et al., 1992). Ces même auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet taureau. Pour ce qui concerne l'influence de la fertilité du mâle sur la production d'embryon, il faut aussi penser que le choix du taureau dépend en premier lieu de caractéristiques d'ordre génétique. Le risque d'une mauvaise fécondation peut être accepté, compte tenu de l'intérêt génétique d'un accouplement.

Il semble donc que dans les conditions habituelles, le nombre d'embryons collectés par donneuse dépende pour l'essentiel du nombre d'ovulation.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

## **Chapitre I: physiologie du fonctionnement ovarien chez les vaches laitière:**

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

L'ovaire des mammifères a un énorme stock d'ovocytes qui sont formés au cours de la vie fœtale (DRIANCOURT et al., 1991), estimés aux environs de 133000 (ERICKSON, 1966).

La fonction principale de l'ovaire est d'assurer la croissance des follicules qui permettent la production d'un nombre limité d'ovocytes murs prêts à être relâchés. La formation de l'ovocyte est le résultat de plusieurs étapes de différenciation de l'ovogonie qui débutent dès la formation du fœtus (GORDON, 1994).

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

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

### **I.2. Aspect morphologique du développement folliculaire:**

Le développement folliculaire chez la vache passe par trois étapes qui sont:

-phase de multiplications

-phase de croissance

-phase de maturation

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

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

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

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

Chez la majorité des mammifères la multiplication se termine avant ou peu après la naissance (HANZEN et al, 2000), cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal, le nombre de follicules primordiaux a été estimé chez la vache à environ 40000 vers l'âge de 2 à 3 ans et 2500 entre 12 à 14 ans (ERICKSON, 1966).



### **I.2.2. Phase de croissance:**

Cette étape de croissance ne concerne que 10 du stock folliculaire, comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et celui de l'ovulation, elle est particulièrement longue et variable selon les espèces.

Se caractérise par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme, le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordiale, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaire et de De Graaf représentant les follicules antraux (HULSHOF et al, 1994), (Voir figure 01).

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

Cette étape coïncide avec l'isolement et l'arrêt méiotique des ovocytes pendant l'ovogenèse. Au moment de la naissance tous les ovocytes primaires sont entourés par une mince couche unistratifiée de 4 à 8 cellules épithéliales folliculaires somatiques aplaties, aussi appelées des cellules de la granulosa. Celles-ci sont séparées du reste stroma ovarien fibreux par une mince membrane basale, les cellules épithéliales folliculaires dérivent de l'épithélium cœlomique, les follicules primordiaux représente en permanence la majorité des follicules dans l'ovaire.

En effet, cette association entre l'ovocyte dégénère suite à la reprise de la méiose (Russe, 1983). Cette population de follicules, qui est à son maximum pendant la vie fœtale, représente la réserve d'ovocytes pour la vie reproductive de la vache (DRIANCOURT et al., 1991).

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

Lors du passage du follicule primordial au follicule primaire, l'épithélium folliculaire qui entoure l'ovocyte devient cubique ou prismatique et ce caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubique, c'est durant cette période que l'ovocyte synthétise; et secrète les glucoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse; la zone pellucide, d'une épaisseur d'une dizaine de microns, elle est constituée de 95 de trois glycoprotéines organisées en longues filaments interconnectés, appelées ZP1, ZP2, ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par la ZP1 seul la glycoprotéines ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique(YANAGIMACHI, 1994).

#### **I.2.2.3.follicule secondaire:**

Lorsque le follicule primaire persiste ils se transforment en follicules secondaire au moment où l'épithélium folliculaire devient pluristratifié, ce dernier va alors former la couche granulosa, du follicule secondaire des prolongement cytoplasmique issus des cellules adjacentes de la couche granulosa traversent la zone pellucide pour assurer l'approvisionnement de l'ovocyte. Au-delà de la membrane basale, le stroma ovarien se transforme en thèque du follicule.

L'ovocyte ici atteint son volume maximal, il s'est entouré d'une pellucide bien différenciée et de deux ou trois couches de cellules cubiques formant la granulosa l'ensemble est

limité extérieurement par la membrane basale qui s'est transformé en membrane de Slavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et de proteohéparane sulfate.

#### **I.2.2.4. Le follicule tertiaire:**

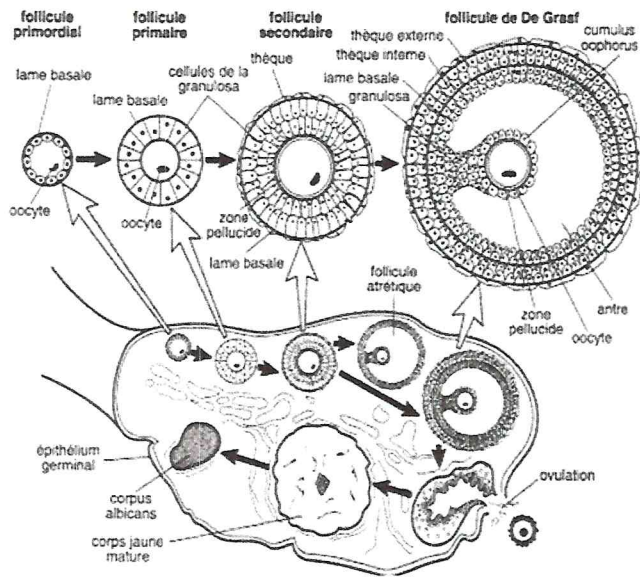
Caractérisent par l'apparition des petites lacunes remplies de liquide dont la confluence forme la cavité folliculaire (antrum) dans la granulosa. Atour de l'ovocyte, la granulosa fait saillie dans l'antrum constituant le cumulus oophorus ou disque proligère. L'ovocyte est devenu entre-temps si grande que son noyau à la taille d'un follicule primaire. le tissu conjonctif autour du follicule c'est déjà différencié en une thèque interne bien vascularisée avec des grandes cellules riches en liquides (production hormonale) et en une thèque externe qui forme la transition avec le stroma de l'ovaire et qui contient les grandes vaisseaux.

Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante, compris entre 25 et 50, il dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules, qui s'atrévient (ARMSTRONG, 1993), a ce stade, et chez tous les mammifères, le follicule cavitaire s'entoure, en dehors de la membrane de Slavjanski, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riches en ARN et en enzymes nécessaires a la steroidogenèse, et par la thèque externe formée d'un tassement de tissus conjonctif du stroma ovarien.

#### **I.2.2.5. le follicule mur (follicule de De Graaf):**

C'est la phase terminale du développement folliculaire, cette phase ne concerne qu'un follicule sur mille entré en croissance (SAUMANDE, 1991), le follicule mur se caractérise par une taille maximale de 25 mm chez la vache, par un nombre maximal de cellules granuleuses et par activité mitotique minimale de la grauleuse, gonflé de liquide, le follicule affleure en surface de l'ovaire, l'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et cumulus oophorus, les thèque interne et externe sont bien différencies et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne, la thèque interne est une glande a part entière, la thèque externe est de nature fibreuse, une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et la membrane basale, chez la vache; il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0,13 mm atteigne la taille préovulatoire (LUSSIER et al., 1994).





**Figure 01:** Chronologie du développement folliculaire (d'après FIENI et al 1995).

**I.2.3. phase de maturation:**

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

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

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

### **I.3. L'atrésie folliculaire:**

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

Il a été démontré chez plusieurs espèces, que l'atrésie est provoquée par l'apoptose ou mort cellulaire programmée (TILLY, 1991; HUGHES et GOROSPE, 1991).

### **I.4. Dynamique de la croissance folliculaire:**

A partir de la puberté, la croissance folliculaire est permanente et des vagues de croissance et d'atrésie se succèdent. A partir du pool de follicules ovariens (follicule primordial), 15 à 30 follicules vont commencer leur développement chaque jour et quitter la réserve. Au bout de plusieurs mois, certains atteignent le stade de follicule tertiaire. Trois phénomènes vont ensuite se succéder: recrutement, sélection et dominance (MIALOT et CHASTANT, 2000). La croissance folliculaire s'effectue sous forme de vagues pendant: -la phase folliculaire du cycle œstrale -la phase lutéale -la gestation -anoestrus post-partum.

#### **I.4.1. Recrutement:**

Le recrutement est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonadodépendants, il concerne chez les ruminants 2 à 5 follicules de taille comprise entre 3 et 6 mm (DRIANCOURT et al, 1991). Ces follicules ont dépassé le stade où habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiques. Le recrutement est un phénomène aléatoire, provoqué par l'augmentation transitoire du taux circulant de FSH (Follicle Stimulating Hormone), 2 à 4 jours précédant le début de vague folliculaire, se fixe sur les récepteurs de la granulosa:

° Activation de l'aromatase:

L'aromatase des cellules thécales en E2:

-stimulation de l'aromatase pour promouvoir la synthèse d'E2, induction de la formation des récepteurs de LH

°Hormones de croissance GH:

-amélioration de la croissance des plus gros follicules, activation de la sécrétion des facteurs de croissance IGF1, prolifération et différenciation folliculaire.



#### **I.4.2.Sélection:**

Lors de la sélection, l'augmentation de la fréquence des pulses de LH stimule la production d'œstradiol et d'inhibine par la granulosa des gros follicules. Œstradiol et inhibine agissent conjointement en réduisant progressivement la sécrétion de la FSH, réduction responsable de la sélection (WEBB *et al.*, 1999). En effet, la prévention de la chute de FSH par injection de cette hormone à petite dose conduit à une polyovulation (ENNUYER, 2000; FIENI *et al.*, 1995).

Lorsqu'un follicule dominant a acquis suffisamment de récepteurs à LH pour lui permettre de subsister quand le taux de FSH diminue, il sécrète de grandes quantités d'oestrogènes et continue à croître en raison de l'augmentation de sa propre sensibilité à la FSH et à la LH, et par production de facteurs locaux, notamment des IGF. L'action de l'IGF-I semble régulée par la concentration en ses protéines-ligands, les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) : une diminution de la concentration en IGFBP, entraînant une plus grande biodisponibilité de l'IGF-I, serait déterminante dans le mécanisme d'acquisition de la dominance (AUSTIN *et al.*, 2001 ; MONGET *et al.*, 2002). La sécrétion réduite de FSH ne permet plus en revanche la croissance des follicules non sélectionnés (ENNUYER, 2000).

#### **I.4.3.Dominance:**

La phase finale de la maturation folliculaire, caractérisée par augmentation nette des E2 et le facteur qui détermine la dominance du follicule est inconnu deux hypothèses: existence d'une protéine régulatrice FRP (Follicle Regulatory Protein) mais non confirmée et la sécrétion du follicule dominant de substance inhibitrice de la synthèse de FSH peut continuer son développement en présence de concentration minimal de FSH, hormone toujours indispensable.

La dominance correspond au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide de volume du ou des follicule(s) ovulatoire(s). Bien que la FSH diminue, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne (l'œstradiol qu'il produit amplifie sa synthèse d'IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1) qui stimule sa synthèse d'œstradiol). La suite de l'évolution du follicule dominant dépend de l'évolution de la progestéronémie. Si la progestéronémie diminue, c'est-à-dire s'il y a la lutéolyse, alors que le follicule dominant de la 2<sup>ème</sup> vague est en phase de croissance, il ovule. Si, à l'inverse, la progestéronémie se maintient à un niveau élevé après que le follicule dominant ait atteint sa taille maximale, il commence à régresser, et une autre vague de croissance apparaît (DRION *et al.*, 1996).

Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules tertiaires antraux de diamètre égal ou supérieur à 5 mm parmi lesquels apparaît le follicule dominant. Chez la vache, un cycle comporte un follicule dominant. Si 3 vagues sont observées, elles débutent en générale aux 2<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jours du cycle. Si 2 vagues sont observées, elles apparaissent aux 2<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jours du cycle (DRION *et al.*, 1996). Ceci explique la variation de la longueur des cycles parfois observés.

## **I.5. physiologie du cycle œstral:**

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

Le cycle œstral est composé de deux phases: une phase lutéale et une phase folliculaire. La phase lutéale et une phase folliculaire. La phase lutéale débute suite à l'ovulation et à ce moment, le folliculeuse transforme en corps jaune qui persiste jusqu'au jour 16 à 18 du cycle œstral (jour 0=œstrus).

Pendant la phase lutéale, le corps jaune sécrète de la progestérone et maintient des niveaux élevés de cette hormone. La phase folliculaire débute au moment de la régression du corps jaune vers le jour 18 du cycle, où on observe une diminution des concentrations de progestérone.

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

### **I.5.1. Les différentes phases du cycle œstral:**

#### **I.5.1.1. Proœstrus:**

Représente la période de transition entre la fin d'un cycle et le début du cycle suivant. Cette phase dure un à trois jours (entre le 20<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> j). Elle est caractérisée par la régression du corps jaune du cycle précédent et la croissance folliculaire du cycle suivant. L'utérus s'hypertrophie, l'endomètre est congestionné et oedémateuse, les glandes utérines augmentent leurs activités sécrétoires (KOLB, 1975).

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

#### **I.5.1.2. Œstrus:**

Elle représente la période de réceptivité sexuelle et période d'éclatement du follicule, ponte ovarienne, acceptation du male (FONTAINE, 1995). L'œstrus est duré en moyenne de 15 heures (2 – 30h maximum marquant le premier jour d'un cycle) et l'ovulation qui est spontanée, survient environ 14 heures après la fin des chaleurs (INRAP, 1988).

L'œstrus est plus ou moins marqué selon les individus, il se traduit surtout par de l'agitation, les animaux essaient de monter sur les autres, l'appétit diminue. Pendant la période de l'œstrus, la muqueuse vaginale est fortement congestionnée, le col est ouvert et permet le passage des spermatozoïdes (KOLB, 1975).



### **I.5.1.3.Metœstrus:**

La phase qui succède à l'œstrus pendant la quelle les cellules de la granulosa du follicule ovulatoire subit une luteinisation responsable de la formation du corps jaune ou bien est l'installation du corps jaune et va du jour 1 au jour 6 du cycle (INRAP, 1988), caractérisée par la diminution de la sécrétion des glandes utérines cervicales et vaginales, si celui-ci est fécondé, le corps jaune reste actif et empêche la maturation du nouveau follicule. Si la fécondation n'a pas eu lieu, le corps jaune régresse (KOLB, 1975).

### **I.5.1.4.Dioestrus:**

Il dure 10 à 11 jour (6<sup>ème</sup> au 17<sup>ème</sup> jours du cycle) (DERIVAUX et ECTORS, 1980), correspond à la période d'activité du corps jaune (sécrétion accrue de progestérone P4) (SOLTNER, 1999). Les glandes utérines subissent une hyperplasie et hypertrophie, la sécrétion du tractus génital sont rare et se collent muqueuse vaginale devient pale.

## **I.6.Les hormones intervenant dans la régulation du cycle œstral: (Voir figure 02).**

### **I.6.1.Les hormones origine hypothalamique:**

#### **I.6.1.1.GnRH:**

C'est le régulateur fondamental de la fonction reproductrice chez les animaux (gonadotrophin releasing hormone ou gonadolibérine), qui est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus.

La GnRH se lie alors aux récepteurs spécifiques situés sur les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, ce qui provoque la synthèse et la libération des gonadotrophines, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (ROCHES 1997). la GnRH est une des rare hormones à induire la synthèse de ses propre récepteurs.

Le caractère pulsatile de la sécrétion du GnRH semble jouer un rôle important dans la libération des gonadotrophines. En effet, l'administration exogène continue de peptide a une dose relativement élevée, soit in vivo, soit in vitro, provoque dans tous les cas une perte progressive de la réponse LH et FSH de l'hypophyse. La nature de la liaison entre le système nerveux central et l'hypophyse via le système porte hypothalamo-hypophysaire permet une stimulation très fine des cellules gonadotrope. C'est à ce niveau que le message hormonal, plus lent, sert à coder l'état physiologique.

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

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

## **I.6.2.Hormone origine hypophysaire:**

### **I.6.2.1. FSH:**

La FSH (Follicule Stimulating Hormone) est une glycoprotéine synthétisée par l'antéhypophyse. Le rôle de la FSH est établi dans l'étiologie des vagues folliculaires (ARMSTRONG, 1993; ADAMS, 1994). FSH (dominant) assure la croissance et maturation des follicules qui auraient du subir l'atrophie tout en stimulation d'autres follicules a une demi vie courte de l'ordre de 20 à 70 minutes (KOHLEK et COLL, 1968 cités par NIBART et BOUYSSOU, 1981).

La FSH contrôle le développement de l'ovaire et la croissance folliculaire, prépare l'action de la LH (Lutéinising Hormone) par la fragilisation de la membrane du follicule et stimule la synthèse des œstrogènes par les follicules (RIEUTORT, 1995).

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

### **I.6.2.2.LH:**

La LH (Luteinising Hormone) c'est une glycoprotéine sécrétée par l'antéhypophyse, elle contrôle la maturation finale des follicules avec le FSH, provoque l'ovulation, induit la formation du corps jaune et la synthèse de progestérone (Derivaux et Ectors. 1980). Elle stimule la sécrétion de différents stéroïdes (œstrogènes, progestérone) (Sairam, 1974).

## **I.6.3.Hormone origine folliculaire:**

### **I.6.3.1.Action inhibitrice sur la croissance folliculaire:**

#### **I.6.3.1.1.Inhibine:**

L'inhibine est une glycoprotéine, formée de deux sous unités alpha et bêta (COMBARNOUS, 1994), appartenant à la famille des Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), elle est synthétisée au niveau des cellules de la granulosa chez les bovins. De nombreuses régulations interviennent pour contrôler sa sécrétion endocrine (FSH et LH), paracrines (l'epidermal growth, le TGF- $\beta$ , l'interféron  $\gamma$ , l'androsténone) et autocrine (l'IGF-1, le TGF- $\beta$ , l'activine et la FSH-p«FSH-suppressing protein») (FINDLAY, 1993).

L'inhibine présente une dualité d'action. La première s'exerce de manière locale, c'est-à-dire au niveau des follicules eux-mêmes: l'inhibine limiterait de manière autocrine la conversion d'androgène en œstrogène par action sur l'aromatase présente au niveau des cellules de granulosa (WOODRUF et al, 1990). La seconde action de l'inhibine est périphérique: elle inhibe la sécrétion de FSH hypophysaire.



### **I.6.3.2.Action stimulante sur la croissance folliculaire:**

#### **I.6.3.2.1.Follistatine:**

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

### **I.6.4.Hormone origine ovarienne:**

#### **I.6.4.1.œstrogène:**

Œstrogène signifie qui provoque l'œstrus. Secrétés par les cellules de la thèque interne des follicules et par les cellules interstitielles. Parmi les œstrogènes, l'hormone essentielle sécrétée par l'ovaire est représentée par le 17 $\beta$  œstradiol (VAISSAIRE, 1977). L'œstradiol-17 $\beta$  est prédominant, il est à cet effet souvent exclusivement dosé.

Chez les bovins trypanotolérants, les valeurs limites d'œstradiol trouvées par (DIOUF 1991) sont de 6,9-15 pg/ml chez la Ndama. Meyer et Yesso 1992 cités par Sauveroche et Wagner (1993) trouvent pour leur part des limites plus faibles: 5,8-10,8pg/ml(NDAMA) et 5,1-10,9 pg/ml (BAOULÉ).

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

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

#### **I.6.4.1.Progestérone:**

Secrétée par les cellules lutéiniques du corps jaune, elle est également synthétisée dans la corticosurrénale et dans le placenta de certaines espèces (DERIVAUX et ECTORS, 1980).

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

L'évolution souvent observée dans la progestéronémie est la suivante: moins de 1ng/ml de j0 jusqu'à j2-j3; j0= jour du début de l'œstrus, 1 à 1,4ng/ml jusqu'à j8-j9, 7 à 14ng/ml (9,5=0,4ng/ml) jusqu'à j17, de j17 à j20 diminution et retrouve à moins de 1ng/ml. Selon SAUEROUCHE et WAGNER (1993), la progestéronémie élevée en phase lutéale chez les races trypanotolérantes (jusqu'à 15ng/ml) comparée aux valeurs des autres races (moins de 5ng/ml) serait un caractère spécifique de ces races trypanotolérantes. Outre l'étude de l'activité ovarienne, le dosage de progestérone permet de poser un diagnostic précoce de gestation ou plus précisément de non gestation.

### **I.7.La composante comportementale: L'œstrus**

C'est l'ensemble des phénomènes physiologiques et comportementaux qui précède et accompagne l'ovulation chez les femelles des mammifères. Bien qu'étant le seul événement visible du cycle, sa détection n'est pas toujours aisée. De nombreux facteurs ont en effet des incidences sur l'extériorisation de l'œstrus, sa durée et intensité (SAUVEROCHE et WAGNER, 1993).

#### **I.7.1.Détection de l'œstrus:**

Opération délicate mais dans la précision est essentielle, la détection des chaleurs est élément clé dans la maîtrise de la reproduction des animaux domestique par la biotechnologie animales. Parce que toutes les étapes de la production au transfert d'embryons sont fixé par rapport au début de l'œstrus. C'est ci qui fait écrire RECCA (1981): « **maîtriser la reproduction c'est d'abord bien détecter les chaleurs** ».

Diverses méthodes existent pour faciliter la détection des chaleurs ( HANZEN, 1981, GUEYE, 1983, DIOUF, 1991, MEYER et YESSO, 1991). Il y a des méthodes par observation direct ou indirecte (marqueurs et révélateurs des chevauchements) et des méthodes de détection non visuelles (dosage des hormones sexuelles, mesure de PH intra-vaginal, ect...). Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients, et donc selon le cas offre une sensibilité et spécificité variable.

Parmi elle la détection par observation directe mérite par une attention particulière.

Pour être efficace, chaque individu du troupeau doit être identifié. De plus deux observations d'une demi-heure environ peuvent être fixées matin et soir: en élevage extensif, tôt le matin avant la remise au pâturage et le soir au retour à l'étable. Une double période d'observation permet la détection de 88% des chaleurs (DOLANSON, 1968 cité par HANZEN, 1981). L'observation permanente est cependant plus efficace mais l'éleveur n'a pas que cela à faire.

Une bonne détection exige de l'observateur la connaissance des modifications comportementales en période de l'œstrus.

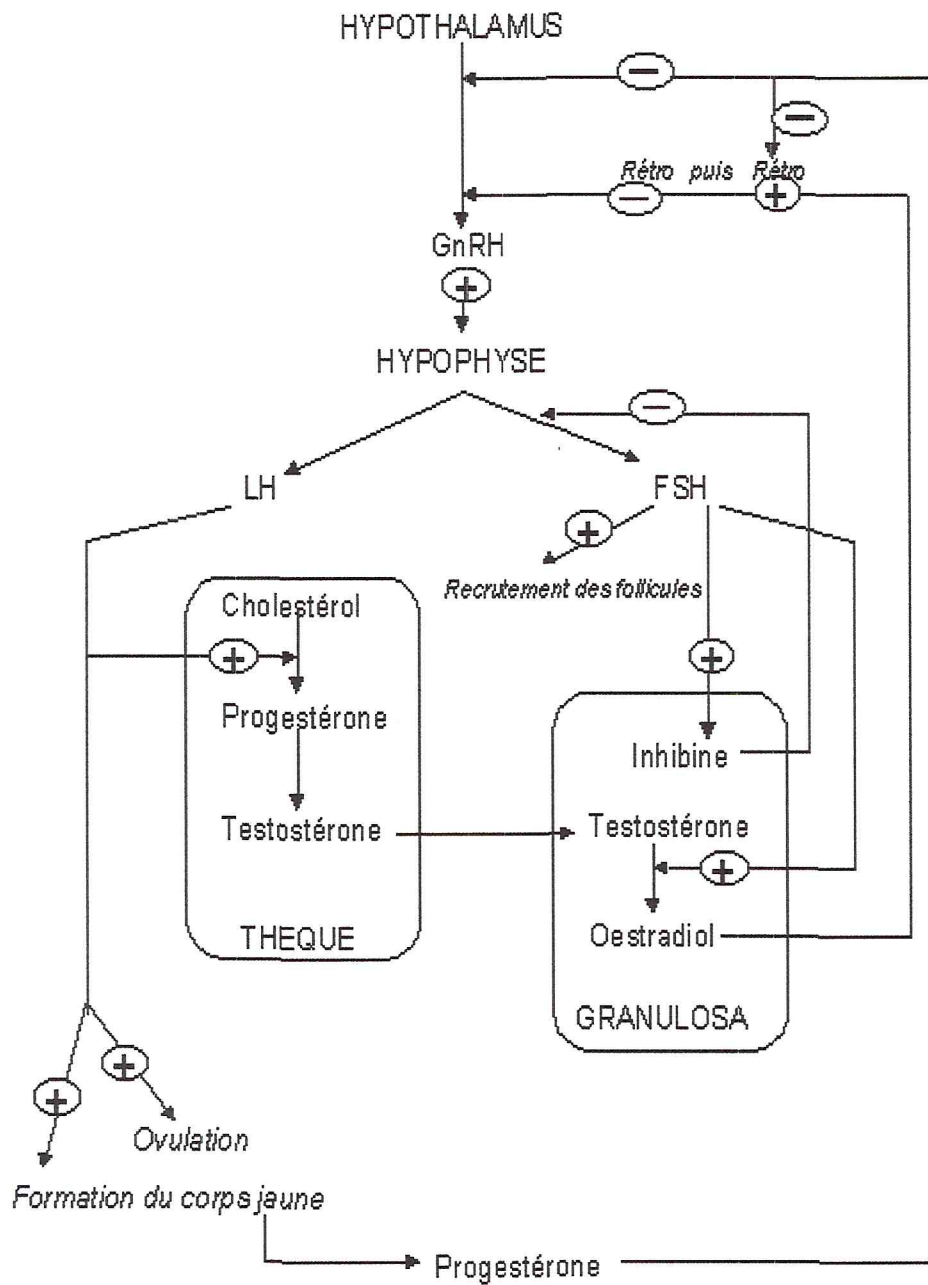


Figure 02: Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel.

Source: UNCEIA Groupe Fertilité Femelle (2006)



### **I.7.2. Les manifestation de l'œstrus:**

En dépit d'une multitude de manifestation (activité généralement limitée, appétit réduit, attirance d'autre vache, beuglements fréquents, tentative de chevauchement d'autres vaches, recherche de la proximité des males), l'acceptation du chevauchement par un congénère (male ou femelle), donc l'immobilisme postural de la femelle, représente le signe majeur de l'œstrus. C'est le critère généralement retenu pour caractériser le début de l'œstrus.

Certains signes anatomiques révèlent également l'état d'œstrus. Il s'agit entre autres de la tuméfaction et de la congestion de la vulve, parfois de l'émission puis de l'écoulement d'une glaire transparente entre les lèvres vulvaires. Pendant cette période, l'examen transrectal des organes génitaux internes révèle à la palpation, un utérus très tonique (signe pathognomonique) et au niveau de l'ovaire un gros follicule ou un point ovulatoire.

### **I.7.3. La durée et l'intensité de l'œstrus:**

- La durée:

La durée exacte de l'œstrus est de détermination parfois difficile. Ce qui la rend en fait difficile c'est la détermination de son début et sa fin, lesquels repères ne sont assez nets que lors de chaleurs intenses.

Elle en moyenne de l'ordre 10 à 12 heures en cycle naturel (RALAMBOFIRINGA, 1975).

-l'intensité:

Elle peut être traduite à travers le nombre de chevauchements acceptés (lui-même fonction de la durée des chaleurs) par unité de temps (heure ou demi-heure).

Les bovins trypanotolérants présentent une valeur très peu réduite ou comparable aux 4 à 6 chevauchements rapportés chez les bovins des pays tempérés (PACCARD, 1985 cité par SAUVEROCHE et WAGNER, 1983).

C'est au cours de la nuit que l'œstrus se manifeste avec plus d'intensité. Selon SAUVEROCHE et WAGNER (1993), les vaches n'extériorisent mieux un comportement sexuel que pendant les heures fraîches. L'activité de monte apparaît en effet le plus souvent en début de soirée et se termine généralement en début de soirée et se termine généralement en début de matinée.

### **I.8. Développement embryonnaire:**

L'ovogenèse est le processus de développement d'un ovocyte ou d'un œuf par accumulation des populations d'ARN maternel et des protéines (TELEFORD & SCHULTZ, 1990; De SOUSA et al., 1998). Les follicules renferment des ovocytes qui sont bloqués au stade diploptène de la prophase I de la méiose (De SOUSA et al., 1998). La décharge pré ovulatoire de la LH et la libération de l'ovocyte par le follicule vont permettre de reprendre la méiose (AVERY et al., 1998; De SOUSA et al., 1998). Le début de la croissance folliculaire est caractérisée par la



rupture de la vésicule entraînant le processus de la méiose de métaphase I à métaphase II (SHEA, 1981; AVERY et al., 1998). Une fois le premier globule polaire expulsé, les ovocytes vont rester dans un stade statique jusqu'à la fécondation (SHEA, 1981; AVERY et al., 1998). La taille du follicule détermine sa compétence et sa capacité à reprendre la méiose ( AVERY et al., 1998), chez les bovins laitiers elle se situe autour de 110µm de diamètre pour l'ovocyte et 2 mm pour le follicule ( AVERY et al., 1998). La folliculogénèse se est caractérisée par une augmentation du diamètre du gamète vers à peu près 30 µm dans le follicule primordial jusqu'à 120 µm dans le follicule tertiaire ( De SOUSA et al., 1998). La fécondation est caractérisée par la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte ( Teleford & Schultz, 1990).

La taille moyenne de l'embryon bovin est entre 150 et 190 µm avec une épaisseur de 12 à 15 µm pour la zone pellucide ( LINDNER & WRIGHT, 1983). Les trois premiers cycles cellulaires se développent avec un type constant de synthèse protéique ( CROSBY et al., 1988; TELEFORD & SCHULTZ, 1990). Jusqu'au stade blastocyte, l'embryon n'est pas d'une grande taille; toutefois, les cellules se multiplient de 2 à 16 cellules par clivage ( LINDNER & WRIGHT, 1983).

Le stade de deux cellules a la forme d'un axe de divisions qui sont arrangées dans des angles droits des unes rapport aux autres (HAMILTON & LAING, 1946). Un embryon à quatre cellules contient des blastomères qui sont arrangées en paires qui se ressemblent à la figure de croix (HAMILTON & LAING, 1946). Les embryons à huit cellules sont arrangés sous forme de sphères en moule, uniformes en taille, et les blastomères sont étroitement groupés ( HAMILTON & LAING, 1946). Le spermatozoïde peut aussi encore être visible dans la zone pellucide (HAMILTON & LAING, 1946). Une morula, embryon de 5 jours, est constituée de 16 à 32 cellules (SHEA, 1981; LINDNER & WRIGHT, 1983) se présentant sous la forme d'une sphère ( LINDNER & WRIGHT, 1983). Les embryons de 16 cellules ont des blastomères centralement ayant ses propres noyaux, et qui sont entourés d'autres cellules ( HAMILTON & LAING, 1946). Les blastomères sont aisément identifiables. La masse cellulaire de l'embryon occupe 60 à 70% de l'espace péri vitellin (HAMILTON & LAING, 1946; LINDNER & WRIGHT, 1983).

La morula est compactée au 6<sup>ème</sup> jour et elle est caractérisée par des blastomères étroitement collés les uns aux autres formant ainsi une masse compacte (SHEA, 1981; LINDNER & WRIGHT, 1983). Au 7<sup>ème</sup> jour l'embryon se développe en un jeune blastocyte ( LINDNER & WRIGHT, 1983). Les embryons jeunes blastocytes ont une couche extérieure de trophoblaste prononcée avec une masse cellulaire innée proéminente et compacte (HAMILTON & LAING, 1946; CHANG, 1952; SHEA, 1981; LINDNER & WRIGHT, 1983).

Tandis que le blastocoele s'allonge, les cellules innées se déplaceront vers un côté de l'embryon (SHEA, 1981). La taille d'un jeune blastocyte est environ 172 µm de différenciation diamètre ( CHANG, 1952). Le jeune blastocyte va se développer en un blastocyte, qui est caractérisé par une différenciation prononcée du trophoblaste extérieur et de l'étranglement de la masse cellulaire innée compacte (CHANG, 1952; LINDNER & WRIGHT, 1983). Les cellules allongées et aplaties se présentent sous forme de cellules trophoblastiques (CHANG, 1952;



SHEA, 1981), elles sont réparties en tranches fines le long de la zone pellucide ( HAMILTON & LAING, 1946). Au 8<sup>ème</sup> jour l'embryon se développe en un blastocyste, ou il commence à augmenter de taille (1,2 à 1,5 fois sa taille originale) ( LINDNER & WRIGHT, 1983). Les cellules embryonnaires au 10<sup>ème</sup> jour, commencent à se différencier on a donc des cellules endodermes, des cellules embryons sont collectés au 7<sup>ème</sup> jour suivant l'oestrus quand l'embryon devrait être considéré comme une morula tardive ou jeune blastocyste (SHEA, 1981). Selon des résultats d'une étude faite par SHEA en 1982, 57% des embryons collectés au 7<sup>ème</sup> jour sont des jeunes blastocystes tandis que les 36% autres sont des morulas tardives. Les résultats de SHEA aussi montrent qu'il y a un taux de gestation de 58% suite à 366 transferts au 7<sup>ème</sup> jour (1981). On obtient des morulas en collectant des embryons au 5<sup>ème</sup> jour.

La détermination du nombre et de la morphologie de cellules à ce stade sont difficiles ( SHEA, 1981). Si les embryons sont collectés au 9<sup>ème</sup> jour, l'embryon sera probablement «sorti» de la zone pellucide (SHEA, 1981). La zone éclore, l'embryon peut être difficilement trouvé (SHEA,1981). La collecte d'embryons au 12<sup>ème</sup> jour, quand l'élongation a commencé, peut être faite à l'œil nu, mais le dommage de la paroi du trophoblaste est probable (SHEA, 1981).

La morphologie des embryons peut varier d'une apparence idéalement sphérique de la portion protoplasmique de l'ovaire vers une apparence dégénérative de diminution de la portion protoplasmique de l'ovaire (SHEA,1981). Les embryons sont classés en se basant sur la qualité du développement embryonnaire selon les standards de LINDNER & WRIGHT (1983) qui a été modifié ultérieurement par la société internationale du transfert embryonnaire ( ROBERTSON & NELSON, 1998). Les embryons jugés comme excellents sont sphérique, symétriques et la taille, la couleur et la texture de leurs cellules sont uniformes (LINDNER & WRIGHT, 1983).

Les embryons bons ont des imperfections insignifiantes telles qu'un peu de blastomères compactés présentant des vésicules, avec une forme irrégulière (LINDNER & WRIGHT, 1983). Les embryons Excellents et bons ont été combinés pour grade 1 (ROBERTSON & NELSON, 1998;HASLER, 2001). Les embryons moyens ne posent pas des problèmes sévères; ils ont des blastomères compactés contenant des vésicules, et peu de cellules dégénérées (LINDNER & WRIGHT, 1983). Les embryons de classe dite « moyenne » sont répertoriés dans le grade 2 (ROBERTSON & NELSON, 1998; HASLER, 2001). Finalement, les embryons médiocres ou grade 3 sont des embryons qui ont des problèmes sévères; des nombreuses blastomères compactés contenant de nombreuses vésicules larges, des cellules dégénérées, des cellules de taille variée, avec une masse embryonnaire encore viable LINDNER & WRIGHT, 1983; ROBERTSON & NELSON, 1998). 8 à 12 cellules embryonnaires collectées au 7<sup>ème</sup> jour indiquent que l'embryon est mort, l'embryon est dégénéré ou l'ovulation a été retardée (SHEA, 1981). Les embryons dégénérés produisent de mauvais résultats de gestation (SHEA, 1981). Selon une étude effectuée par LINDNER & WRIGHT (1983), le taux de gestation est probablement moins affecté par le stade de développement embryonnaire que par sa qualité. Les embryons pauvres en qualité ont rendu le taux de gestation bas, alors que les taux d'embryons classés comme excellent ou bon ont rendu le taux de gestation haut (LINDNER & WRIGHT, 1983).

## **Chapitre II: Superovulation et récolte des embryons**

### **II. Superovulation:**

Chez les ruminants, la stimulation de la fonction de reproduction repose sur des interventions favorisant la reprise d'activité ovarienne après la mise, le contrôle de l'ovulation chez les femelles cyclées ou encore destinées à provoquer la superovulation chez des femelles de haute valeur génétique. Dans l'induction de l'activité ovarienne, l'association progestagène +PMSG (ou eCG) (AGUER et al., 1982; CHUPIN et al., 1977; GRIMARD et al., 1992) est le plus souvent employée chez les bovins allaitants ou les petits ruminants. Le recours au GnRH et aux prostaglandines est également possible, en particulier chez la vache laitière au cours du post-partum (HUMBLOT et THIBIER, 1980), ou encore pour contrôler l'ovulation chez les femelles toujours non fécondées après plusieurs inséminations (HUMBLOT et THIBIER, 1981; THIBIER, 1985; HUMBLOT et SAUMANDE, 1993).

Enfin dans tous les cas où la LH pourrait être active (contrôle du moment de l'ovulation, femelle présentant des structures folliculaires kystiques), l'hCG ou le GnRH, plus facile à préparer et dont l'action potentielle est équivalente, sont employés (HUMBLOT et SAUMANDE, 1993). Chez les ruminants domestiques, et plus particulièrement chez les bovins, le recours aux hormones gonadotropes hypophysaires est donc basé essentiellement sur l'utilisation de FSH pour obtenir la superovulation en vue du transfert embryonnaire chez des femelles au potentiel génétique intéressant (NIBART, 1991; SAUMANDE, 1995).

#### **II.1. préparation de la donneuse:**

##### **II.1.1. choix de la donneuse:**

Choisir une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse. Elle convient d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité. De même, il s'avère indispensable d'identifier la présence éventuelle de la lésion du tractus génital. L'animal super ovulé aura autant que faire se peut accouché normalement, n'aura pas présenté des complications puperales ou de post-partum telles qu'une rétention placentaire, une infection utérine, fièvre vitulaire ou de l'acétonémie. Il y' aura accouché depuis 60 voir 90 jours au moins il sera en phase de bilan énergétique positive. Il y' aura manifesté deux ou trois chaleurs à intervalle régulier.

L'exploration manuelle, le col et les cornes utérines seront de diamètre normal (-5 cm).

Un corps jaune sera présenté sur l'ovaire.

En général la donneuse doit combler quelque critères:

- Femelles sans anomalies génitales
- Femelles qui sont cyclées normalement, après pic de lactation
- Bonne génétique (10 % supérieurs).
- Body conformation score (RASAD, 2004).



### **II.1.2.Examen de la donneuse:**

-Examen général:l'animal ne doit en souffrir de n'importe quelle maladie métabolique ou infectieuse

-Examen génital:l'animal ne doit pas présenter de problèmes gynécologiques, le fonctionnement ovarien doit être normal et la vache ou la génisse ne doit avoir aucun problème de reproduction.

### **II.1.3.Age:**

En utilisant des données pour les récoltes effectuées au cours des vingt dernières années, l'âge moyen des donneuses qui sont des génisses âgées de moins de deux ans. La tendance vers des donneuses en transfert embryonnaire plus jeunes est évidente, avec un âge moyen fluctuant entre 5,7 et 6 ans (68-72 mois) avant 2004. Depuis ce temps, l'âge des donneuses en TE au Canada a toutefois diminué progressivement pour atteindre 4,2 ans (51 mois) en 2012. En lien avec la tendance à la baisse de l'âge moyen des donneuses en TE, l'utilisation de génisses âgées de moins de deux ans. Avant 2000, environ 15 % des donneuses étaient âgées de moins de deux ans, mais ce pourcentage a chuté sous la barre de 10 % de 2000 à 2006. Depuis 2009, la tendance visant à effectuer des récoltes d'embryons chez des génisses a rapidement augmenté pour atteindre 19 % en 2011 et 22 % en 2012 (BRIAN VAN DOORMAL; 2013).

### **II.1.4. État sanitaire:**

### **II.2 .Préparation des receveuses:**

Il faut accorder une priorité aux génisses car les résultats obtenus sont en moyenne de 50 % de gestation. En utilisant des multipares comme receveuses le résultat baisse d'environ 20 %. L'âge recommandé pour une génisse est d'environ 15 mois avec un poids qui correspond à 60 % de l'âge adulte. Pour finir il faut choisir des animaux dociles car les manipulations sont nombreuses surtout pour la synchronisation et la pose de l'embryon qui est une étape extrêmement délicate.

Il est conseillé de prévoir plus de receveuses que d'embryons à mettre en place car toutes les receveuses synchronisées ne seront pas aptes à recevoir un embryon. L'opérateur réalise un palper trans-rectal pour s'assurer de la présence d'un corps jaune sur un des deux ovaires. Si l'opérateur a le moindre doute sur la présence du corps jaune le transfert ne se fera pas.

Avant le transfert il est essentiel de noter les chaleurs des receveuses, car c'est le meilleur critère de la bonne cyclicité des femelles. Au minimum deux chaleurs doivent être observées avant de commencer la synchronisation. De plus les femelles choisies comme receveuses doivent présenter un état d'engraissement moyen.



### **II.3. Les différentes hormones utilisées dans le traitement de superovulation:**

La superovulation est une technique utilisée principalement chez les vaches laitières (naturellement mono-ovulantes), dans le but d'obtenir plusieurs embryons de bonne valeur génétique qui seront transplantés chez des femelles dites receveuses. La superovulation s'obtient en stimulant la folliculogénèse terminale et en réduisant l'atresie des follicules pré ovulatoires. On utilise pour cela des traitements à base de FSH ou d'eCG, il y a beaucoup de recherches dans lesquelles des réponses super ovulatoires plus grandes ont été rapportées quand des traitements super stimulant ont été amorcés 8-12 jours après l'œstrus (LINDSELL et d'autres, 1986, RAJAMAHENDRAN et CALDER; 1993). Le traitement gonadotrophine commencé en 8-12 jours après que l'œstrus est basé sur la connaissance d'apparition de la seconde vague folliculaire de nos jours (HASLER; 1992, HUHTINEN; 1992, BUNGARTZ et NIEMANN; 1994, SATO 2005). Cependant, on a montré le jour d'apparition de la seconde vague folliculaire pour différer entre deux à trois vagues des cycles des animaux individuels (SIROIS et la FORTUNE; 1988, WEBB et ARMSTRONG; 1998). Il est rapporté que, seulement 20 % du cycle d'œstrus sont disponibles pour amorcer le traitement au moment de l'apparition de vague folliculaire. C'est-à-dire 80 % du cycle d'œstrus ne sont pas conducteur à une réponse super ovulatoire optimale (Bó 2004). Quelques nouveaux protocoles se sont développés pour obvier à ce problème par le contrôle exogène tant de lutéal que de la fonction folliculaire (Gordon 2005).

Ces dernières années, des combinaisons progestagen /progestérone+ œstradiol ont été utilisés au contrôle d'apparition de vague folliculaire. Cette demande offre aussi l'avantage d'introduire des traitements super ovulatoires à la fois qui sont optimaux pour le recrutement de follicule, indépendamment de l'étape du cycle d'œstrus (NASSER, 1993, BARACALDO 2000). Ces nouveaux protocoles permettent l'initiation de traitements super stimulants à un temps auto-désigné (Bó 2006). Cependant, l'intervalle à l'apparition d'une nouvelle vague folliculaire est tout à fait la variable dans des vaches traitées avec des différents préparatifs d'œstradiol et le jour d'initiation de traitement gonadotrophine après ces divers préparatifs a une grande importance sur la réponse de superovulation (COLAZO 2005).

#### **II.3.1. eCG: equine Chorionic Gonadotrophine:**

L'eCG (equine Chorionic Gonadotropin), anciennement appelée PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), est une glycoprotéine extraite du sérum de jument gravide : elle possède une double activité FSH et LH. C'est la plus économique et elle est efficace en une seule injection de 2 000 à 2 500 UI, mais elle a deux inconvénients

– Sa demi-vie très longue (cinq jours) fait qu'elle agit encore au moment de la décharge ovulante de LH et peut entraîner la transformation kystique de l'ovaire. Ceci peut être évité par l'injection d'un anticorps anti-eCG par voie intraveineuse au moment de la première ou de la deuxième insémination (DHONDT, 1978) ;

– Les activités FSH et LH sont portées par la même molécule, ce qui rend impossible leur séparation.

### II.3.2. Prostaglandine (PGF<sup>2</sup>a):

Dans tous les cas, ces traitements sont renforcés par une injection de prostaglandine 48h après le début du traitement de la superovulation. Cette injection est destinée à dissoudre le corps jaune éventuel, qui s'opposerait à l'ovulation .

### II.3.3. Les extraits hypophysaires:

Les extraits hypophysaire de porc principalement, contiennent de la FSH et de la LH. La demi-vie très courte (70 min) de ces hormones nécessite leur injection pendant quatre jours, à raison de deux injections par jour pour maintenir un taux sanguin suffisant. L'importance du rapport FSH/LH dans les traitements de superovulation a été démontrée par (CHUPIN, 1985 ), et certaines sociétés commerciales produisent des préparations mieux purifiées de FSH et LH.

Les modalités de traitement de stimulation ovarienne, les hormones sont injectées en phase lutéale (entre J8 et J13, avec J0 = jour des chaleurs) d'un cycle naturel ou induit. Deux jours après l'injection d'eCG ou à la cinquième injection de FSH, un analogue de PGF<sub>2</sub>α est administré pour provoquer la lutéolyse et permettre l'ovulation. Celle-ci se déroule sur plusieurs heures étant donné que plusieurs ovocytes sont libérés, et deux inséminations sont généralement effectuées, 12 et 24 heures après le début des chaleurs observée.

### II.3.4. FSH: Follicular Stimulating Hormone:

L'hormone folliculo- stimulante (FSH) est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 30 000 daltons produite par l'hypophyse. C'est une hétéro-dimère car elle est composée de deux sous-unités différentes : α et β. La sous-unité α (89 acides aminés) est commune à toutes les gonadotrophines, y compris l'hormone thyroïdienne. La sous-unité β (118 acides aminés), en revanche, est spécifique de l'hormone. La fonction principale de la FSH est de promouvoir et de soutenir la croissance des follicules ovariens chez la femme et la spermatogenèse chez l'homme. La FSH stimule la synthèse de son propre récepteur dans les cellules de la granulosa et les Cellules de Sertoli. Elle stimule également l'activité de l'aromatase dans les cellules de la granulosa (enzyme qui permet la conversion des androgènes en œstrogènes). La FSH est donc aussi responsable du « choix du follicule dominant ». La synthèse et la sécrétion de la FSH par l'hypophyse est sous le contrôle de différents régulateurs tels que la GnRH (gonadotropin releasing hormone d'origine hypothalamique), les œstrogènes ovariens, l'activine et l'inhibine (tous deux d'origine gonadique).

La FSH est disponible dans le marché sous forme de plusieurs produits :FSH-P(100% FSH);NIH-FSH-P1 (68%FSH et 32% LH); Folltropin V (est un extrait pituitaire porcin constitué de 84% FSH et 16% LH,MAPLETOFT, 2002).Actuellement,au Canada,l'homme la plus utilisée dans le traitement de SOV est la Folltropin V (MAPLETOFT; 2002).



Récemment la pFSH a été modifié chimiquement avec un polyéthylène glycol (PEG) pour former des dérivés : PEGylatedpFSH. Les résultats indiquent que la PEGylatedpFSH est encore bioactive bien que cette activité est réduite et l'élimination d'immunoréactivité par PEGylation suggère que cette modification mérite la création d'un produit utile dans l'induction de superovulation bovine (UCHIYAMA Y; 2009).

La demi-vie de la FSH est plus courte (5 à 6 heures) que la PMSG (HANZEN;2010). Sa moindre richesse en acide sialique (5%) oblige des injections répétées pour induire une superovulation avec succès (MAPLETOFT; 2002, MONNIAUX, 1983). Sa concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et n'est plus détectable 12 heures après l'injection.

#### **II.4.Facteurs de variation:**

##### **II.4.1.Le statut ovarien**

Première preuve de relation entre le nombre de follicule , à la fin de l'échographie d'années soixante-dix et les méthodes endocrines n'étaient pas suffisamment fiable pour étudier la croissance folliculaire et la seule méthode pertinente(appropriée) qui était disponible en ce moment pour des études ovariennes était l'histologie quantitative ( voir figure 03). Cette méthode a été utilisée des laboratoire pour étudier les relations entre des populations folliculaire au moment de l'injection eCG et des réponses ovulatoires à ce traitement dans des génisses frisonnes (MONNIAUX, 1983).La conception expérimentale a été choisi tel que chaque animal était son propre contrôle. Un ovaire a été enlevé immédiatement avant l'autre a été stimulé en injectant eCG (2000 UI) et ensuite enlevé juste après l'ovulation.

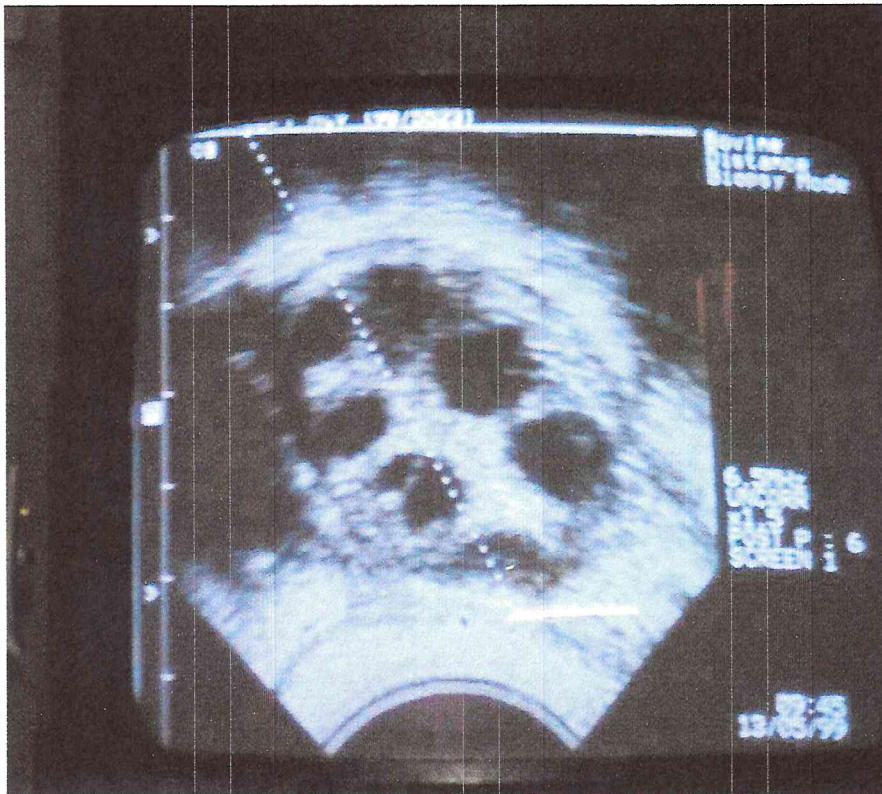
De nos résultats, le nombre de follicules plus grand que 70  $\mu$  Le m du diamètre (des follicules avec plus de 2 couches de cellules granulosas) par ovaire révélaient être tout à fait la variable entre des animaux : il a varié entre 53 et 755 dans les ovaires "de contrôle" (récupéré auparavant eCG l'injection) et entre 73 et 881 dans les ovaires "stimulés" (récupéré après l'ovulation) des génisses étudiées. Cependant, dans chaque génisse le nombre(numéro) de follicules dans les deux ovaires acceptés étroitement(de près) (MONNIAUX, 1983). De nouvelles comparaisons entre le contrôle et l'ovaire stimulé ont montré qu' eCG peut augmenter la prolifération de cellules granulosas (évalué par leur index de mitotique) dans preantral et tôt antral des follicules, stimuler la croissance de l'antra dans des grands follicules antral et réduire le nombre(numéro) du plus grand des atretic, la suggestion Un peu "de sauvetage" de follicules antral d'atresia (MONNIAUX , 1984).



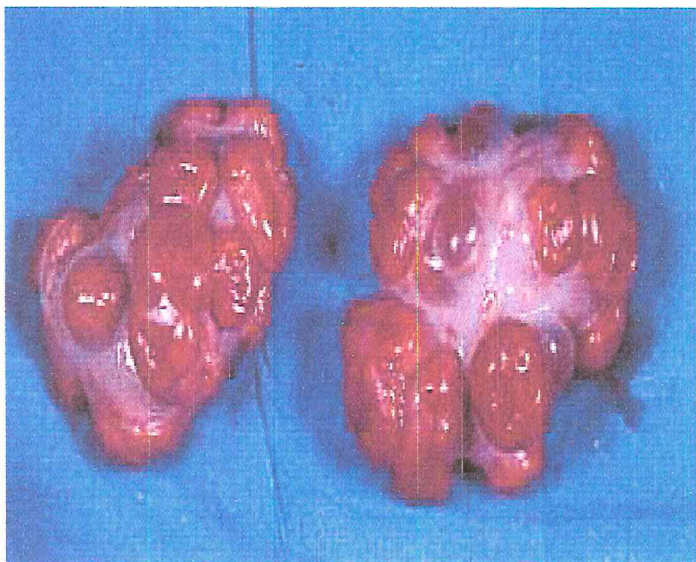
Une découverte intéressante était l'existence d'une relation proche entre le nombre total de follicules dans l'ovaire avant le traitement et le nombre de jeunes corpus (des ovulations récentes) plus lutéinisés des follicules non rompus dans l'ovaire stimulé . Des corrélations semblables ont été aussi observées Avec les types différents de follicules dans l'ovaire de contrôle , mais le nombre d'ovulations seul n'était pas corrélé significativement avec aucune sorte de variable folliculaire mesurée avant le traitement. La relation entre le nombre de grand antral atretique des follicules avant le traitement et le nombre de follicules luteinized dans l'ovaire stimulé a suggéré que certains tôt atretique des follicules ne puissent pas ovuler, mais seulement luteinize après eCG.

Cette étude a confirmé l'existence d'une grande variabilité entre-individu de populations folliculaire précédemment rapportées dans le bétail (RAJAKOSKI 1960; ERICHKSON 1966; TESTART 1972; MARIANA et HUY, 1973; SCARAMUZZI 1980). De plus, il a montré pour la première fois que la variabilité du statut ovarien pourrait expliquer une grande partie de la variabilité entre-individu de la réponse ovarienne à un traitement super ovulatoire.

Ce résultat était postérieur confirmé par d'autres études utilisant l'histologie ou l'échographie ovarienne très performante pour la détection de follicules antral plus grand que 2mm le diamètre dans la vache (KAWAMATA 1994; CUSHMAN et d'autres. 1999; TANEJA et d'autres. 2000; SINGH et d'autres. 2004; DUROCHER, 2006; IRLANDE, 2007) et ovaires de mouton (MOSSA . 2007).



**Figure 03:** Echographie d'un ovaire d'une vache superovulée (HANZEN 2009).



**Figure 04:** Ovaires des vaches superovulées (HANZEN 2009)



#### **II.4.2. Variabilité entre-individu dans populations folliculaire ovariennes et liens dans-individu fonctionnels:**

Un des problèmes principaux de la production d'embryon est l'existence d'animaux mal répondants, indépendamment du traitement ovarien stimulant utilisé. Des génisses avec moins de 200 follicules croissants sains au moment de la stimulation sont bas-Répondant des animaux et ceux avec plus de 500 de ces follicules sont des animaux hauts répondant.

Comparant le total folliculaire les populations de bétail choisi pour de hautes différences du compte de follicule antral pendant des vagues folliculaire. Une haute corrélation entre le compte de follicule antral pendant des vagues folliculaire étudiées par l'échographie et les nombres de follicules antral primordiaux, transitoires, primaires, secondaires et petits sains étudiés par l'histologie (L'IRLANDE, 2008) En général des différences importantes de l'activité ovarienne peuvent exister entre des individus, ils concernent la population totale de follicules croissants (des nombres et des taux de croissance) et ils pourraient être associés aux différences numériques de la réserve ovarienne de follicules primordiaux et leur capacité pour entrer dans la croissance folliculaire. Les mécanismes déterminant ces différences entre des individus restent inconnus jusqu'ici et un déterminisme génétique est fortement probable. On l'a récemment proposé que la nutrition maternelle et la maladie pendant la gestation aient aussi un rôle critique dans le règlement de la haute variation dans la réserve ovarienne du résultat (de la progéniture) (L'IRLANDE, 2011).

À chaque cycle d'une longueur moyenne de 21 jours chez la vache, un seul ovocyte est libéré de l'ovaire. Si l'on veut qu'il y en ait plusieurs, il faut stimuler la croissance de plusieurs follicules par l'administration d'hormones gonadotropes. Classiquement, deux hormones gonadotropes soit d'origine chorionique (eCG) soit d'origine hypophysaire (FSH) sont utilisées.

#### **II.5.Facteur déterminants la réponse de superovulation :**

##### **II.5.1.Facteur extrinsèque :**

###### **II.5.1.1.Climat:**

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

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



Sous des température élevée (BENYEI , 1999) ont comparé des génisses et des vaches Holstein en lactation . Ils n'ont pas trouvé de différence significative en terme d'embryons/ovocytes non fécondés états significativement plus élevé chez les vaches . De plus, les vaches avaient significativement moins d'embryons de qualité 1 que les génisses .Selon eux, les hautes températures seraient défavorables à la qualité des embryons ou des ovocytes. La différence entre vaches et génisses également observé par (PUTNEY , 1998) semblerait due à une incapacité pour les vaches à maintenir une température corporelle normale à cause de leurs besoins métaboliques de lactation.

#### **II.5.1.2.Alimentation:**

D'après FRERET ( 2000), les apports nutritionnels notamment avant et au moment de l'insémination artificielle sont importants à considérer pour une production optimale de gamètes .

L'environnement utérin peut ainsi être modifié et compromettre la survie des embryons. Il semble claire que la suralimentation et la sous-alimentation à court ou à long terme semble être défavorable à la qualité des embryons. Cependant, pour de nombreuses études, les comparaisons sont difficiles car les variations d'apports alimentaires peuvent être extrêmes et éloignées des conditions physiologiques.

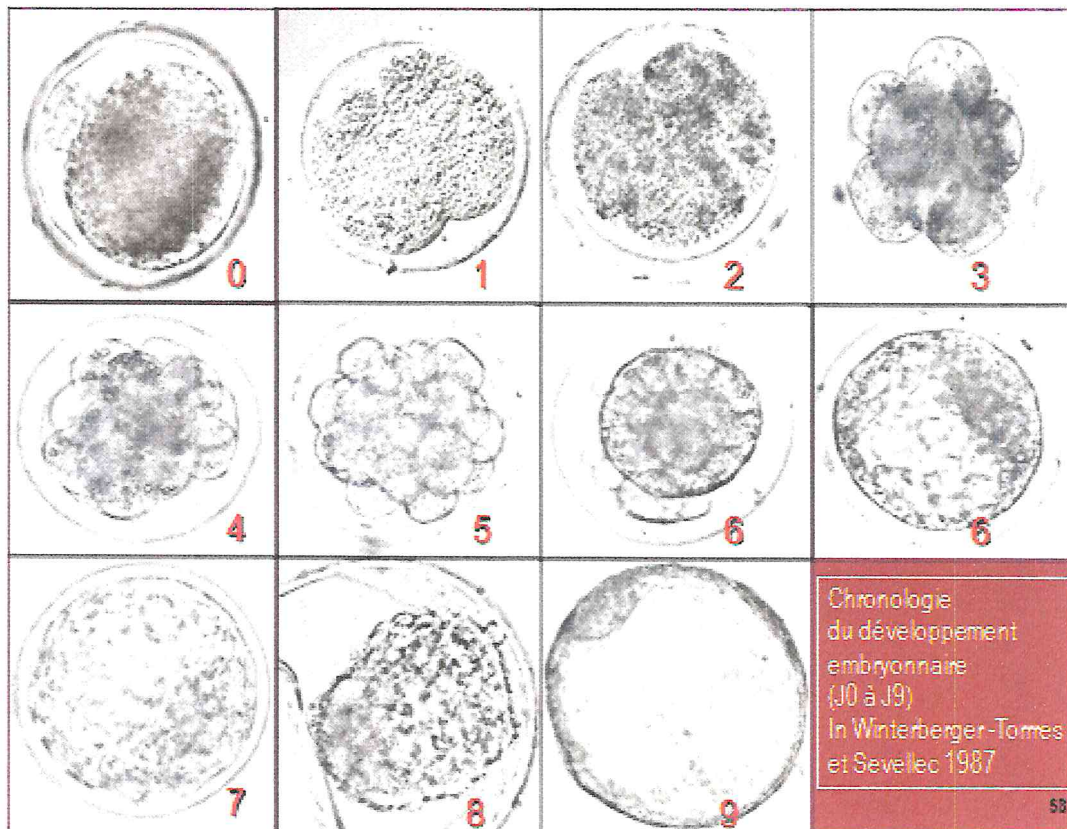
Les apports nutritionnels peuvent influencer de façon complexe la reproduction et à différent niveaux : Axe hypothalamo-hypophysaire, ovaire et utérus (O 'CALLAGHAN et BOLAND, 1999). Ainsi la croissance folliculaire et ovocytaire peuvent être affectés par les conditions alimentaires et l'équilibre énergétique (FRERET , 2000).

#### **II.6.Récolte:**

La collecte des embryons s'effectue au 7ème jour environ après l'insémination de la femelle donneuse et cela après leur sortie de l'oviducte (j4-j5). Elle est réalisée par l'introduction d'une sonde dans l'utérus de la femelle après franchissement du col utérin. Il s'agit d'une technique délicate, nécessitant beaucoup d'habileté et d'expérience.

L'opération dure environ une demi-heure. Elle consiste à injecter un liquide tampon dans la cavité utérine pour la rincer et à récupérer celui-ci dans lequel baigneront les embryons éventuellement présents.

Après la collecte, les embryons sont recherchés dans le liquide soit par filtration, soit par décantation.



**Figure 05:** Chronologie du développement (j0 à j9) (In WINTERBERGER- TOMES et SEVELLEC 1987).

## II.6.1. Matériel:

### 1. Sonde dilatatrice

- prépare le col à la pénétration de la sonde de récolte
- 60°cm, extrémité de 4 mm au sommet

### 2. Sondes de récolte

- A trois voies dite sonde IMV ou de Cassou
  - air, injection, récupération
  - bille à l'extrémité partie rigide pour la mise en place
- Adieux voies dite sonde de Han
  - air et voie pour l'injection et la récupération en alternance
  - mandrin interne pour la mise en place

### 3. Seringues

- .20 ml pour gonfler le ballonnet
- .50 ml pour injecter le liquide de récolte

### 4. Liquides de récolte

- .250 à 500 ml par corne utérine de
- .PBS : Phosphate Buffered Saline
- .parfois complété de FCS (Fetal Calf Serum) à 2 %
- .Flacons stériles à 37 °C

## **II.6.2. Techniques: (Chirurgicales et non chirurgicales)**

### **II.6.2.1. Chirurgicales: (récolte invasive)**

- Réalisée sous anesthésie générale
- Incision au niveau de la ligne blanche en avant du pis
- Extérioriser l'utérus
- Réaliser une incision d'un cm de long pratiquée à la base de la corne utérine
- introduction d'un cathéter à deux voies (sonde de FOLLEY)

Le liquide de récolte était injecté via une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet qui assure l'étanchéité. Après récolte, le ballonnet est dégonflé, l'utérus et les plans chirurgicaux sont suturés. Cette technique a pour avantages un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80 %), la possibilité de juger la réponse ovarienne au traitement de superovulation par un comptage direct des corps jaunes. Elle fut pratiquement abandonnée étant donné la lourdeur de sa mise en œuvre mais aussi la difficulté de la pratiquer plusieurs fois chez un même sujet (CURTIS , 1991) .





### II.6.2.2. Non chirurgicale: (ou voie cervicale)

- La palpation ovarienne afin d'estimer le nombre de corps jaunes sur chaque ovaire
- une anesthésie épidurale basse est recommandée pour la procédure de récolte non chirurgicale. Une bonne épidurale basse se constate par une flaccidité de la queue (SEIDEL, 1992)
- La zone d'élection pour l'anesthésie est la base de l'insertion de la queue avec le sacrum plus précisément entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> vertèbre coccygienne
- La zone est tendue et lavée avec du savon iodé et ensuite badigeonnée avec de l'alcool à 70 ° pour prévenir les infections spinales
- Une quantité de 5 ML d'une solution stérile de 2 % de procaïne est suffisante

Lorsque l'anesthésie prend effet, la queue est attachée sur un coté l'arrière train est nettoyé de la boue, le rectum est vidé de toutes matières fécales. La zone vulvaire est nettoyée entièrement, par un bon lavage au savon iodé puis un rinçage abondant est pratiqué.

L'opération proprement dite commence par l'introduction de la sonde de FOLLEY entre les 2 lèvres vulvaire puis le passage de celle-ci a travers les anneaux cervicaux, l'opération est entièrement guidée par l'autre main, placée dans le rectum (SEIDEL, 1992)

Lors du passage de la sonde de FOLLEY de l'utérus; on a le choix entre deux approches pour positionner le ballonnet, celle-ci sont nommées "FLUSHING" du corps ou des cornes.

La technique se résume à injecté le liquide de récolte préalablement chauffé à la température du corps puis le récupéré la récupération se fait automatiquement pour la sonde à trois voies "capillarité" car la voie de drainage est différente de la voie d'injection des liquides de récolte, alors que la sonde à ceux voie se fait avec aspiration des fluides par la même voie d'administration grâce a une grosse seringue. Un massage utérin durant l'opération préconisé pour détacher d'éventuels embryons accrochés ou piégés sur la paroi. Les liquides récoltés sont envoyés au laboratoire et ils sont laissés décompter ou sinon filtrés à travers des filtres spéciaux pour embryons de la taille de 75 Um. Le culot ou le sédiment résultant est examiné sous une bonne binoculaire (SEIDEL, 1992)

### **II.6.3.Examen et classification des embryons:**

Les embryons récoltés après superovulation se présentent sous des aspects morphologiques divers.

Il est important d'apprécier la qualité des embryons avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques éventuelles (HANZEN; 2000). Les plus important critères de tout schéma de classification des embryons doivent être basés sur les caractères morphologiques facilement reconnaissables, et devront être retenus en relation aux taux de gestation estimés (tableau I), et attendus pour chaque grade (SEIDEL , 1991).

L'évaluation de la qualité des embryons se fait par l'intermédiaire de la taille, de la couleur, du nombre et la compacité des cellules, de la taille de l'espace péri vitellin, du nombre de cellules dégénérées, et du nombre et de taille des vésicules.



**Tableau I:** Classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCEIA 1990).

Classification	Qualité	Description
1	Excellent	Embryon idéal pour son jour de collecte , sphérique ,symétrique avec des cellules de couleurs et de texture comparables.Blastomères polygonaux au stade morula aspect compact.
	Bon	Embryon un peu en retard de développement par rapport a son jour de collecte.Ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique.Ou exclusion de quelque blastomères dans l'espace péri-vitellin .
2	Moyen	Embryon en retard de développement 1 à 2 jours blastomères sphérique au stade morula ou des défauts bien précis comme:nombreuse cellules échappées dans l'espace péri-vitellin,des vésicules des cellules dégénérées blastomères de taille variable. Aspect plus clair ou plus sombre que normal.
3	Médiocre	Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées de tailles différentes ,des vésicules grosses et nombreuses; mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable.

4	Mort ou dégénéré	Arrêt de développement à un stade précoce.  Cellules dégénérées.
---	------------------	--

. (suite du tableau I)

## **II.7. Technique d'insémination artificielle:**

### **II.7.1. Moment de l'insémination artificielle:**

L'insémination doit être pratiquée à un moment assez proche de l'ovulation. En admettant que la durée de l'œstrus est de 12 à 24 heures, que l'ovulation a lieu 10 à 12 heures après la fin de l'œstrus (HASKOURI, 2001).

DIOP (1994) conseille de réaliser des inséminations 9,5 + 3,5 heures après le début des chaleurs. Dans la pratique, les vaches reconnues en chaleur le matin sont inséminées le soir du même jour, et celles en chaleurs le matin sont inséminées le lendemain matin (BROES, 1995). La semence doit être déposée dans l'endroit optimal des voies vaginales femelle (Figure 09 et Figure 10).

Par ailleurs, cette insémination doit de préférence être réalisée pendant les périodes fraîches de la journée.

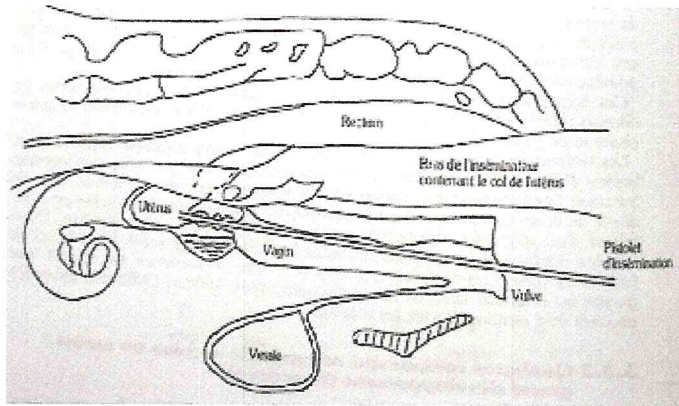
Cependant (OUEDRAOGO et al. 1996) ont révélé la nécessité de considérer le génotype de bovin avant de choisir le moment optimal pour l'IA.

### **I.7.2. Procédé d'insémination artificielle:**

Dans la pratique d'insémination artificielle, les précautions suivantes doivent être prises:

- Le matériel doit être en bon état pour ne pas blesser la femelle.
- Le matériel doit être stérile.
- L'intervention doit être faite avec douceur car l'utérus est fragile.

La semence en paillette est décongelée dans l'eau tiède (35°-37°C) pendant 15-30 secondes. Puis elle est introduite dans le pistolet de CASSOU ; le bout thermos-soudé.



*Figure 06: Dépôt de la semence dans les voies génitales de la vache (Source: BARRET, 1992).*



## **Chapitre III: Transfert d'embryonnaire:**

### **III.1. L'introduction:**

En termes simples, le transfert d'embryons consiste à prélever un embryon dans l'oviducte ou l'utérus d'un animal (femelle donneuse) et le placer dans l'oviducte ou l'utérus d'un autre animal (femelle receveuse) qui se situe à la même phase du cycle génital que la femelle donneuse. Chez les bovins, on administre généralement à la femelle donneuse à haut potentiel.

Dans les conditions de l'élevage industriel, les embryons sont transférés à des âges et stades biologiques où ils sont encore enveloppés dans une capsule relativement épaisse appelée zone pellucide, chez la vache, du 6 au 8 jour, stade 8 cellules à morula. Les embryons transférables peuvent être collectés soit par voie cervicale (bovin, équins), soit par voie chirurgicale (toutes espèce), soit à l'abattage par prélèvement de l'appareil génital. La récolte par voie cervicale est effectuée quand les élevages, les cliniques vétérinaires ou les centres spécialisée. La récolte par voie chirurgicale se fait généralement dans les cliniques ou les centres spécialisées mais peut être aussi dans les élevages. La collecte d'embryons à l'abattage se fait normalement à l'abattoir par prélèvement aseptique, puis au niveau du laboratoire par irrigation de l'appareil génital.

Chez les bovins la production annuelle de veaux par une femelle féconde peut être multipliée par 10 en moyenne. Par exemple, en élevage laitier, 70 à 90% des veaux femelles sont nécessaires au remplacement des animaux réformés pour des raisons autres qu'un manqua de productivité. Dans ce contexte, la vitesse de l'amélioration génétique du côté femelle pourrait être multipliée par 3 ou 4, si les animaux de remplacement étaient choisis parmi les 10% meilleurs sujets du troupeau (SEIDEL G.E et SEIDEL S.M 1981). La production peut aussi être augmentée en pratiquant le transfert d'embryons à partir de vaches à haut potentiel génétique, qui sont infertiles en raison d'un traumatisme, d'une maladie ou de la vieillesse (BOWEN R.A.,STORZ.LEARYJ.,1978,30) ou incapables de mener une gestation à terme pour d'autres raisons.

### **III.2. Technologies liées au transfert d'embryons:**

#### **III.2.1. La cryoconservation des embryons:**

Est une importante technique complémentaire du transfert d'embryons chez les bovins, ovins, caprins et équins parce qu'elle permet de stoker des embryons pendant longtemps. Le coût du transfert d'embryons est ainsi réduit pour l'éleveur car le transfert peut être réalisé quand une receveuse est disponible, sans qu'il soit nécessaire de synchroniser plusieurs receveuses avec chaque donneuse. De plus, cette technique évite de disposer de plus de receveuses que d'embryons ou l'inverse. La cryoconservation facilite le transport des embryons sur longues distances en vue de transferts. Antérieurement, il n'était possible de conserver les embryons plus de 48 heures qu'en les maintenant en culture, ou en les transférant dans l'oviducte ligaturé d'une autre espèce animale. La cryoconservation permet aussi de maintenir en quarantaine les embryons pendant qu'on examine l'état sanitaire des donneuses.

Les embryons (au stade morula ou blastocyste) sont généralement congelés dans ampoules ou des paillettes et sont examinés après décongélation avant d'être transférés. Récemment, on a mis au point des méthodes rapides de congélation-décongélation des embryons

en paillettes (POPESCU C.P et CRIBIU E.P 1982). Celles-ci permettent de transférer des embryons quelques minutes après leur retrait de l'azote liquide, ce qui facilite beaucoup l'opération et se pratique d'une manière comparable à l'insémination artificielle.

Actuellement, le seul problème posé par cette technique rapide est que le taux de gestation obtenu après le transfert des embryons est inférieur aux de 50 à 60% obtenus par d'autres méthodes. Ce problème pourrait être résolu par une sélection soigneuse des embryons avant congélation (KENNDAY L1993). Dans l'avenir, on peut prévoir que le transfert d'embryons sera effectué par des « transféreurs » d'une façon très semblable à l'insémination artificielle pratiquée par les inséminateurs.

### III.2.2. Le sexage des embryons:

Est une autre technique développée parallèlement au transfert d'embryons chez les bovins. Pour ce faire, la seule méthode dont on dispose au moment du transfert 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 personne n'a réussi à congeler-décongeler les embryons à ce stade si bien qu'après le sexage, ils ne peuvent pas être stockés.

Les micromanipulations permettent de sexer des embryons par analyse des chromosomes aux stades de développement ou ils peuvent être cryoconservés. Le sexage est réalisé alors directement ou par la culture de quelques blastomères. Bien que cette méthode ait été jugée comparable ou meilleure que celle appliquée aux blastocystes éclos (MOUSTAFA L.A 1978), le taux moyen de réussite est plus souvent de l'ordre de 30%. De meilleurs résultats seraient vraisemblablement obtenus sur des demi-embryons (divisés en deux) puisqu'il y aurait davantage de cellules sur lesquelles travailler. Mais il reste à déterminer quel taux de gestation sera obtenu finalement par transfert d'embryons congelés-décongelés à zone pellucide lésée, car jusqu'à présent les résultats sont très inférieurs à ceux obtenus avec des embryons congelés-décongelés zone pellucide intacte.

L'inconvénient de toutes les méthodes de sexage par analyse des chromosomes réside dans leur temps de réalisation (3heures et demie à 4 heures) et le petit nombre d'embryons qui peut être examiné par une seule personne (6 à 8/jour). La mise au point d'une méthode rapide et faible serait donc d'un grand intérêt.

Plusieurs sociétés de biotechnologie cherchent à sexer les embryons d'après la présence de l'antigène H-Y chez les embryons mâles. L'antigène HY est élément d'histocompatibilité qui ne se forme qu'à la surface des cellules mâles. Depuis quelques années, plusieurs laboratoires cherchent à mettre au point un système de sexage fondé sur l'utilisation des anticorps dirigés contre l'antigène H-Y. l'un de ces laboratoires, la société Genetic Engineering of Colorado, a déposé une demande de brevet pour le sexage des embryons bovins de 6 jours au moyen d'anticorps monoclonaux contre l'antigène H-Y avec un taux de réussite annoncé de 93% (News item 1983). Si cette société ou une autre trouve une solution, cette technique représentera une méthode facile et rapide de sexage des embryons au stade où ils peuvent être congelés et décongelés. Cela aura des conséquences économiques révolutionnaires, par exemple en élevage



laitier où la certitude d'obtenir une génisse ç tout coup, au lieu d'une fois sur deux, aura un impact déterminant sur l'efficacité des programmes d'élevage.

On discerne mal l'avantage qu'il y aurait à sexer les autres espèces d'animaux d'élevage, du moins sur le plan économique, mais la même démarche pourrait n'être appliquée que pour les bovins, bien que l'identification des chromosomes sexuels soit plus difficile.

### **III.2.3. Les micromanipulations d'embryons:**

Consistent à intervenir sur eux entre la fécondation et le début du stade blastocyste au moyen de micromanipulateurs et autres micro instruments.

On peut scinder en deux une morula ou un embryon plus précoce, placer les fragments obtenus dans des zones pellucides vides et les transférer pour obtenir de vrais jumeaux (GODKE R.A et HILL K.G 1983). On peut prélever une cellule isolée (blastomère) sur des embryons de 2, 4 ou 8 cellules, les placer dans des zones pellucides vides puis les transférer chez des receveuses pour obtenir des individus identiques(jumeaux, triplés, quadruplés, etc .) (WILLADSEN S.M et FEHILLY C.B 1983). On peut aussi produire des multiples identiques en associant des cellules isolées obtenues d'embryons de 4 ou 8 cellules (WILLADSEN S.M et FEHILLY C.B 1983).

La production de jumeaux ou de multiples identiques, qui constitue une forme de clonage, fournirait un outil de recherche inestimable pour de nombreuses études sur les animaux d'élevage, relatives à leurs maladies nutritionnelles, infectieuses ou liées à l'environnement. L'identité du génotype fait disparaître les variations individuelles que l'on doit normalement perdre en considération quand on utilise de grands animaux dans des recherches expérimentales. Avec des animaux à génotype identique, il y a une variable de moins et on peut donc utiliser moins d'animaux pour obtenir un résultat statistiquement significatif.

On peut comparer valablement les gains de poids obtenus au moyen d'aliments différents dans les mêmes conditions de milieu. On peut étudier les différences de doses pathogènes, voies d'administration, souches, environnement, sans avoir à tenir compte des variations individuelles.

En injectant des cellules d'un embryon dans un autre, on peut aussi créer des chimères intra et interspécifiques (TUCKER E.M, 1974). Celles-ci peuvent également être créées par extraction des embryons de leur zone pellucide, lorsqu'ils sont issus de couples parentaux différents, puis en les fusionnant pour former un seul embryon. Il est ainsi possible d'associer les gènes d'un caractère favorable à ceux d'un ou plusieurs autres caractères. On peut par exemple associer le patrimoine génétique déterminant la résistance aux maladies à celui déterminant une production élevée et créer ainsi de nouvelles lignées qui présentent beaucoup d'intérêt.



#### **III.2.4. Les techniques de micro injection:**

Consistent à introduire directement des macromolécules dans les cellules au moyen de micro instrument. Les applications de cette technologie sont innombrables. Récemment, on a réalisé la micro injection du gène de l'hormone de croissance du rat, fusionne avec le gène métallothionéine I de la souris, dans le pronucléus mâle de l'ovule fécondé de souris (PALMITER R.D, 1982). Cette intervention produit des souris statiquement plus grandes que leurs congénères utilisées comme témoins. Cette démonstration annonce des possibilités immenses d'accélération de la croissance chez les animaux de grande valeur économique. Une durée de production plus courte et une efficacité de conversion alimentaire accrue seraient hautement profitables.

Un élément fondamental pour ces études est l'établissement de cartes génomes, qui a fait l'objet d'investigations poussées chez l'homme et les animaux de laboratoire mais a été relativement négligé chez les animaux d'élevage. Une autre application consiste à réaliser la micro injection de virus pathogènes dans de jeunes embryons de mammifères. Cela a déjà été pratiqué sur des embryons bovins de 7 jours avec le virus BVD en vue d'études au microscope électronique (CURNOCK R.M., Day B.N et DZIUK P.J 1975). Après la micro injection, les embryons ont été transférés à des femelles receveuses pour étudier le processus d'infection embryon-fœtale, la micro injection d'un agent pathogène directement dans un embryon, son transfert puis l'étude de interaction entre receveuse et l'embryon constituent une méthode de choix pour déterminer si l'embryon est capable ou non d'entretenir l'infection et de transmettre la maladie, question capitale pour tous les responsables du contrôle et la prévention des maladies infectieuses.

#### **III.2.5. La fécondation in vitro:**

Est une autre technique de pointe qui, en association avec le transfert d'embryons, pourrait avoir une influence prépondérante sur l'élevage, en particulier si l'on peut découvrir les secrets de la maturation de l'ovocyte et récolter des ovocytes à l'abattoir. La fécondation in vitro se prête aussi à des recherches sur la transmission d'agents infectieux à l'ovule par le spermatozoïde lors de la fécondation, complétant celles manipulation des embryons. Le transfert direct peut être réalisé par des techniciens spécialisés des inséminateurs (PALMITER R.D, 1982).

#### **III.3. Avantage du transfert embryonnaire:**

Le transfert embryonnaire permet d'obtenir de bons veaux en utilisant les meilleurs taureaux et les meilleures vaches ou génisses. Maintenant le fermier peut suivre un programme embryonnaire, et obtient des productions à vie avec une seule collecte .

L'avantage du transfert embryonnaire se traduit ainsi:

Les vaches produisent seulement un veau par an. Le transfert embryonnaire permet la production de toute la progéniture en un an émanant d'une seule vache donneuse:

-Augmente le potentiel génétique du troupeau en un temps relativement court.

-Augmenter la production laitière chez la vache.

- Augmenter le poids des veaux durant le sevrage.
- Les embryons congelés peuvent être transportés quasi n'importe où.
- Préserver les races supérieures pour les futures générations grâce à la congélation des embryons (MITCHELL et DOAK, 2004)

Sur le plan sanitaire, le transfert embryonnaire est le moyen le plus sûr, au plan sanitaire, d'échanges de matériel génétique entre fermes, régions pays ou continents.

Ainsi, les équipes de transplantation embryonnaire font l'objet de contrôles réguliers permettant ainsi vérifier que toutes les procédures garantissant la qualité sanitaire des embryons sont respectées.

### **III.4. Technologies des procédures du Transfert Embryonnaire:**

#### **III.4.1. La gestion des donneuses:**

##### **III.4.1.1. La sélection des donneuses:**

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

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

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

- la valeur reproductive annuelle (on a plus d'un veau par an).
- la haute production laitière (pour un élevage laitier).
- Body conformation score corporel ( RASARD, 2004).

##### **III.4.1.2. L'alimentation de l'animal donneur:**

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

##### **III.4.1.3. Le cycle œstral de la donneuse:**

Une des clés de succès du transfert embryonnaire est la détection de l'œstrus. Ceci doit être établi avec précision. La durée du cycle œstral devrait être régulièrement normale parce que si elle est anormale elle va avoir un effet négatif sur le processus de super ovulation.

Il est préférable de procéder à la détection de l'œstrus dans deux cycles œstraux consécutifs. Habituellement elle est faite à 6 heures du matin et heures du soir. Pendant la détection de l'œstrus, il faut éviter les anomalies de détection des chaleurs telles que les chaleurs silencieuses (CURTIS, 1991).

### **III.4.1.4. La gestion des donneuses et des receveuses:**

#### **III.4.1.4.1. La détection de l'œstrus:**

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

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

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

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

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

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



**PARTIE**

**EXPERIMENTALEL**

## **Introduction:**

Le premier essai couronné de succès de prélèvement d'un embryon suivi son transfert dans une lapine fut réalisé par (HEAPE en 1891).c'est en 1951 que le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse (WILLETTE et al. 1951). Le premier veau né après transfert d'un embryon congelé puis décongelé (NAQUIT ;1973., WILMUT et ROWSON; 1973). Il portait le nom de Frosty II, Frosty I étant né suite à une fécondation réalisée au moyen de sperme congelé.

La technologie de congélation des embryons bovins à permis des échanges de matériels génétiques à l'échelle nationale et internationale. En plus, elle permet de réaliser la conservation de la diversité génétique des races femelles domestique et à gérer de façon plus économique les receveuses (INRA, prod. Anim. 1998).

## **2. Objectif:**

L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer la réponse des vaches traitées à un traitement de superovulation en réduisant le nombre d'injections de la pFSH.

## **3.Matériels et Méthode:**

### **3.1.Matériel:**

#### **3.1.1.Animaux:**

Notre cheptel expérimental se compose de 5 vaches donneuses de race améliorée sélectionnée sur la base des critères zootechniques et sanitaires, qui ont été préalablement contrôlées du point de vue de cyclicité. (Tableau II)

Au niveau de la station expérimentale de l'institut de Blida, toutes les vaches sont soumises aux mêmes conditions élevage.

**Tableau II: Cheptel expérimental utilisées.**

	Vache 1	Vache 2	Vache 3	Vache 4	Vache 5
Numéro identifiant	9003	9002	5001	5002	8002
Robe	Noire pie	Pie noire	Pie noire	Pie rouge	Pie rouge
Age	6 ans	6 ans	10 ans	10 ans	7 ans
Score corporelle	3,5	3	2,5	2	3
Protocole De Traitement De Superovulation	4 injections	Non utilisée	4 injections	Non utilisée	Non utilisée

**3.1.2. Les Médicamentes:**

- Stimufol 20%: 500µg FSH et 100µg de LH et prostaglandine (Prostavet)
- Xylocaine
- cryoptecteur(éthylène glycol)
- Azote liquide
- Bétadine
- PBS (phosphat buffered saline)
- Amoxiciline
- PGF2α (2cc)

**3.1.3. Matériel de la contention:**

- Une bride
- Une pince mouchette



-Un travail de contention.

### 3.1.4. Matériel du traitement:

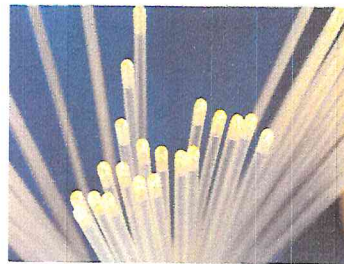
- Une seringue
- Des aiguilles stériles
- des compresses.

### 3.1.5. Matériel de l'insémination: (Figure 12)

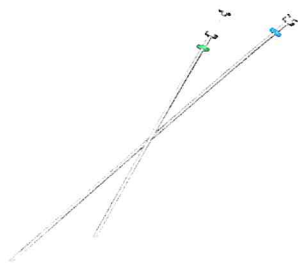
- Un pistolet de l'insémination type Cassou, un BT2
- Des paillettes d'insémination
- Chemises sanitaires
- Une paire de ciseaux
- Des gaines



**Photo 01: Paire de ciseaux**



**Photo 02: Gains**



**Photo 03: Pistolet d'insémination**

**Figure 07 : Matériel d'insémination**

### 3.1.6. Matériel de récolte et recherche d'embryons: (Figure 13)

- Des antiseptiques (alcool chirurgicale + IODE)
- Une paire de ciseaux
- Un coton
- Un anesthésique (Xylocaine )
- Seringue de 50 ml qui sert a administrer et récupérer le liquide de lavage de la corne
- Les aiguilles
- Une sonde de récolte à deux voies (minitubes® CH 16 19982/0113) et son mandrin métallique
- Des flacons vides en verre de 500 ml.
- PBS (Phosphate Bufferd Saline): Milieu de conservation des embryons
- Gants pour fouiller rectal
- Boites de pétries quadrillées
- Tubule
- Loupe binoculaire



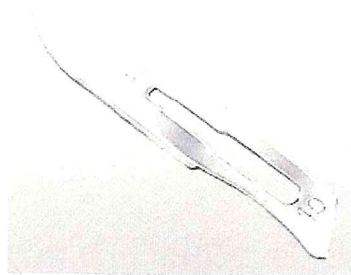
*Photo 01: Iode*



*Photo 02: Xylocaine*



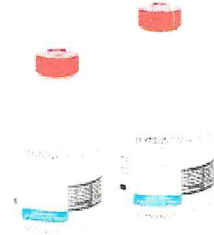
*Photo 03: Seringue*



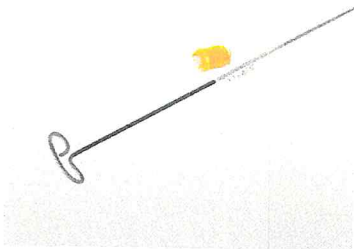
*Photo 04: Lame*



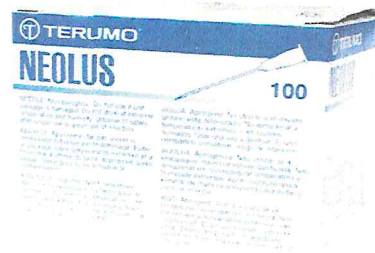
**Photo 05: Paire de ciseaux**



**Photo 06: Flacon de NaCl**



**Photo 07: Sonde de la récolte**



**Photo 08: Aiguille**



**Photo 12: Microscope loupe binoculaire**

**Figure 08: Matériel de récolte et de recherche d'embryons**



#### **4. Méthode:**

##### **4.1. Détection des chaleurs:**

La détection de la cyclicité des vaches a été réalisée par observation pendant 4 mois avec des visites régulières espacées de 7-11 jours. Des explorations trans-rectales et des observations visuelles sont utilisées pour apprécier les modifications structurales au sein des ovaires et de noter les changements comportementaux de chaque vache. (Figure A)



**Photo A:** Glaire cervicale au moment d'œstrus (Vache 9003).

**Tableau III: les dates d'apparition des chaleurs**

Vache	1 <sup>ère</sup> date de chaleur	2 <sup>ème</sup> date de chaleur	3 <sup>ème</sup> date de chaleur
PN 5001	06/11/14	23/11/14	14/12/14
PN 9003	22/10/14	12/11/14	03/12/14

#### **4.2. Le Traitement de superovulation, l'insémination et la récolte:**

Le traitement de superovulation a été initié au 10<sup>ème</sup> jour après la manifestation de chaleur naturelle. On commence toujours les injections en présence d'un corps jaune, ceci est confirmé à l'aide d'un fouiller rectal.

Le commencement du traitement a été réalisé par une injection intramusculaire de 50 mg de FSH diluée avec 9 ml de solvant Na cl donné en trois jours successifs au matin.

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

Deux inséminations artificielles de 12 heures d'intervalle ont été réalisées le 5<sup>ème</sup> jours (48 et 60 heures après l'injection de prostaglandine).

La récolte a été réalisée le 7<sup>ème</sup> jour après le jour d'insémination par rinçage des cornes grâce à une sonde souple (Sonde de Folley) munie d'un ballonnet. La bonne contention mécanique (le travail de contention) et médicamenteuse (la xylocaïne) ont facilité la manipulation. Le nombre des corps jaunes et des follicules sur les ovaires a été estimés par palpation rectale juste avant la récolte. Les embryons récolte ont été classés selon les critères morphologique. Sont considérés comme de bons embryons ceux qui ont un développement normal le jour de collecte. Cette normalité est jugée sur des critères morphologiques (taille, forme générale, intégrité, opacité) (ELSDEN FACTE RP, Nelson LD, Seidel GE Jr. 1978).

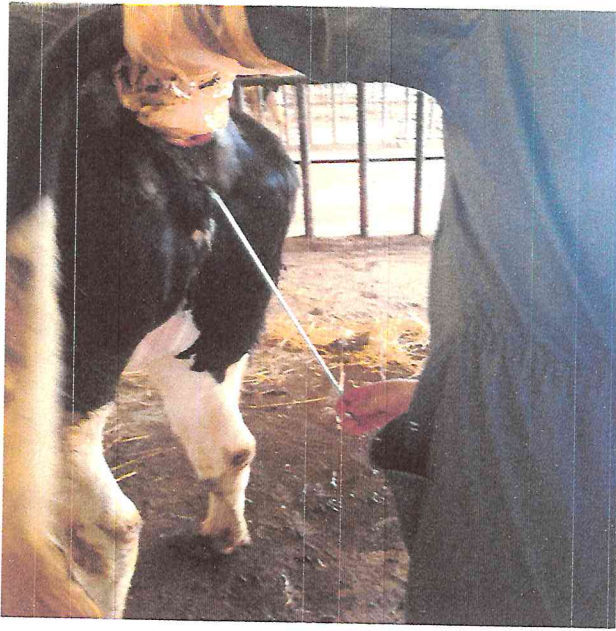
**Tableau IV:** Le traitement effectué à base de FSH.

Vaches traitées	Traitement hormonal	Date d' IA	Date de Récolte
5001	1er jour:FSH 2eme jour:FSH 3eme jour: FSH+prostaglandine	02/04/15	09/04/15
9003	1er jour:FSH 2eme jour:FSH 3eme jour: FSH+Prostaglandine	24/05/15	31/05/15



**Photo B:** Cuve d'azote





**Photo C:** Insémination artificielle de la vache

## **5. Résultats:**

### **5.1. Résultat de suivi de chaleur:**

Au début de notre travail, nous avons remarqué que les vaches ont un cycle régulier de durée moyenne de 19 – 21 jours, mais nous avons eu un changement de la durée du cycle suite aux mauvaises conditions d'élevage ce qui a retardé notre travail. (Tableau V)

**Tableau V:** Suivi des dernières chaleurs avant l'initiation du traitement

Vaches	Date d'apparition des chaleurs
5001	24/04/15
9003	15/05/15

### 5.2. La réponse à la superovulation:

Deux vaches ont été soumises au traitement de superovulation, 04 traitements ont été effectués pour chacune des vaches, une seule vache a été récoltée.

La vache récoltée est 9003 dont on a eu: -15 corps jaunes pour l'ovaire droit

-12 corps jaunes pour l'ovaire gauche+02

follicules .

Ces résultats ont montrés que tout les traitements ont donné des réponse ovariennes positives que chez la vache 9003. Alors que la vache 5001 n'a pas répondu au traitement même elle n'a pas eu une réaction de superovulation malgré qu'on a bien suivi le protocole du traitement. Cet echec est du a la sous-nutrition des vaches.

### 5.3. La récolte des embryons:

Tableau VI: Résultat du traitement de superovulation

Vaches	9003
Structures	- 01 Embryon dégénéré appartenant a la catégorie classe 04 et 05 - 05 Ovules non fécondés
Résultat	En total, 06 structures récoltées équivalent de 0% des embryons transférables.

La vache qui a répondu au traitement a produit des structures citées dans le tableau ci-dessus (Tableau VI). Donc les structures sont récoltées puis examinées sous un microscope loupe binoculaire c'est sur ce principe qu'on tri les structure embryons, ovules et corps jaunes ; puis on les sélectionnes selon leurs viabilités, sachant qu'on retient que les structures viables ce qui n'est pas le cas dans nos résultat (on en a pas eu des structures viables).

## Discussion:

certaines facteurs de variation de la réponse au traitement de superovulation ont été mis en évidence tel que l'alimentation, l'environnement. Certains auteurs ont réduit le rythme à une injection quotidienne pendant 3 à 5 jours, d'autres ont utilisé une doses unique avec une exception adaptée (LOONEY et al., 1981; KELLY et al., 1997; YAMAMOTO et al, 1995; SUGANO et al., 1999).

La réaction ovarienne des femelles traitées est satisfaisante, avec une moyenne de corps jaunes de 15 CJ par femelle comparable aux résultats de ( CHUPIN 1988 ), qui est de 14,7 corps jaunes, et celle de LUCAS-HAHN et NIEMANN (1991 ), avec un nombre moyen de 12,6 plus ou moins 1,1.

Aucun embryon utilisable n'a été récolté dans notre expérimentation, toutes les structures récoltés sont des ovocytes non fécondés et un embryon dégénéré. Ce résultat peut être expliqué par:

-Le facteur nutritionnel intervient précocement et tout au long de processus de croissance folliculaire, notamment sur le nombre de follicule recrutés. La nutrition de la donneuse peut influencer la qualité des ovocytes et des embryons récoltés. ( SANTOS et al, 2008 ) .

-Allongement du délai PGF<sub>2</sub> $\alpha$  – chaleurs, en effet DALTON et al, 2000, rapporte un taux de non fécondé de 8/10 de la totalité des embryons, si les chaleurs de superovulation se manifestant après 48 heures de l'injection de prostaglandine .

-Si on considère que la durée de vie des spermatozoïdes congelés est de 12 à 24 h d'après CONCANNON, Mc CANN, TEMPLE, (1989 ), les spermatozoïdes ne seront plus viable au moment des ovulations qui se produisent, 22 à 26 h après le pic de LH chez les animaux superovulés, selon KAFI et Mc GOWAN ( 1997 ).

Selon ANZAR et al, (2003 ), d'autres facteurs pouvant influencés la fertilité tels que la qualité de la semence et la technique d'insémination artificielle.

Les apports nutritionnels peuvent influer de façon complexe la reproduction et à différents niveaux : axe hypothalamo-hypophysaire, ovaire et utérus (O'Callaghan et BOLANDE 1999). Ainsi, croissance folliculaire et ovocytaire peuvent être affectés par les conditions alimentaires et l'équilibre énergétique (Fréret et al, 2000).

Selon SCHILLO (1992), la sous-alimentation diminue l'amplitude et la fréquence des décharges de LH qui sont nécessaires à la croissance des follicules. La sous-alimentation inhiberait la sécrétion pulsatile de LH par une réduction de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus. Il est possible que la sécrétion en GnRH soit modifiée par des métabolites spécifiques ou des hormones métaboliques traduisant le statut nutritionnel. Ces paramètres ne seraient ni la concentration en insuline ni celle en AGNE (Acides Gras Non-Estérifiés), car il n'y aurait pas de relation forte entre les variations en insuline ou en AGNE et le contrôle de la libération de LH.



## **Conclusion:**

L'amélioration de la biotechnologie liée à la production des embryons nécessite une bonne conduite d'élevage, une alimentation bien équilibrée, une détection des chaleurs, et un bon suivi de la cyclicité des vaches, bon score corporel, et les maladies.

La superovulation est soumise à plusieurs facteurs qui influencent sur la réponse des vaches au traitement, dont les résultats sont soit des embryons dégénérés, soit des ovocytes non fécondés ou carrément des récoltes nulles.

Nos résultats sont loin des résultats des secteurs spécialisés dans ce domaine, nous avons la chance de maîtriser les notions de base, la méthode ainsi que la technique de cette biotechnologie. Aussi bien que le 1<sup>er</sup> facteur influençant sur nos résultats c'est que les vaches ont été mal nourries elles ont perdu beaucoup de poids observée pendant notre travail.

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

Enfin, il faut améliorer les conditions d'élevage mais surtout l'alimentation car durant notre expérimentation les vaches étaient très mal nourries, ce qui peut être leur numéro 1 qui a influencé sur nos résultats.

- AGUER D, PELOT J ET CHUPIN D (1982).** La reproduction des bovins : Anoestrus, Post – partum, Transplantation embryonnaire. In : Journées ITEB-UNCEIA, ITEB, PARIS : 19-34.
- ANZAR M, FAROQ U, MIRZA M.A, SHAHAB M ET AHMED N (2003).** Factors affecting the efficiency of artificial insemination in cattle and buffalo in punjab, Pakistan , Pakistan veterinary journal,23 (3);106-113.
- ARMSTRONG (1993) ET ADMAS (1994).** Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1):72-80.
- AUSTIN EJ, MIHM M, EVANS ACO, KNIGHT PG, IRELAND JLH, IRELAND JJ ET ROCHEJF.** Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of the follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle - *Biol Reprod*, 2001 ; 64 : 839-848.
- AVERY B.A, HAY-SCHMIDT, P.HYTTEL ET T.GREVE (1998).** Embryon developement oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylamino Purine Prior to in vitro maturation *theriogenology* 50 334-344.
- BLAIRE V.D, AND F.B.FLANDERS, (2003).** Embryo transfer in cattle. Georgia Agricultural Education Curriculum. Office Georgia Department of Education.
- BOWEN R.W, ELSDEN R.P et SEIDEL G. E (1978 ).** Embryo transfer for cows with reproductive problems. *J. Am. vet. Med. Ass.*, 172, 1303-1307.
- BUNGARTZ L, NIEMANN H (1994).** Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Repro. Fertil.* 101, 583-591.
- CHANG M.C (1952).** Development of bovine blastocyst with a note on an implantation. *the Anatomical Record.* 113: 143-161.
- CHUPIN D (1977).** Maîtrise des cycles chez les vaches allaitantes. Quoi de neuf ? *Bull. Tech. Ins. Art.*, 15, 25-31.
- CHUPIN D. (1988).** Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire colloque sac. fr. *Etude fertil.* 26,213-232.
- CONCANON PW, LEIN D H. (1989).** Hormonal and clinical correlates of ovarian cycle, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in cows, pp 1269-1282.
- CURNOCK R.M, DAY B.N et DZIUK P.J (1975).** Embryo transfer in pigs : a method for introducing genetic material into primary specific-pathogen-free herds. *Am. J. vet. Res.*, 37, 97-98.
- CURTIS J.L (1991).** Cattle embryo transfer procedure. ACADEMIC PRESS, INC. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. P.1.
- CUSHMAN R.A, DE SOUZA J.C, HEDGPETH V.S ET BRITT J.H (1999).** Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60, 349-354.



**DALTON J.C, NADIR S, BAME J.H, NOFTSINGER M ET SAACXE R.G (2000).** The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulation cows. *J. Anim. sci.* 78, 2081-2085.

**DE SOUSA (1998) ET S.BILODEAU, GESEELS (1998).** Oogenic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis : à revider, *Molecular Reproduction and Development* : 51 :112-121.

**DISKIN M.G ET SREENAN J.M ( 2000).** Expression and detection of oestrus in cattle *repro. Nutr. Dev* 40. (p 481-491).

**DRANSFIELD M B.G, NEBEL R.L , PEARSON R.E ET WARNICK L.D (1998).** Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy sci.* 81, (p.1847-1882).

**DRIANCOURT M.A, GOUGEON A, ROYERE D ET THIBAUT C (1991).** La reproduction chez les mammifères et l'homme.

**DRIANCOURT M.A, GOUGEON A, ROYERE D ET THIBAUT C (1991).** La reproduction chez les mammifères et l'homme.

**DRION PV, BECKERSJF, ECTORS FJ, HANZEN C, HOUTAIN JY ET LONEGAN P (1996).** Régulation de la croissance folliculaire et lutéale. 1. Folliculogénèse et atresie. *Point vét*, 28: 881-891.

**ELSDEN RP, NELSON LD ET SEIDEL GE JR (1978).** Super ovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology* 9:17-26.

**ENNUYER M.** Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction-*point vét*, 2000;31 (209) : 377-383.

**ERICKSON B.H.** Developmental and senescence of the postnatal bovine ovary-*J. Anim. Sci.* 1966 b, 25,800-805.

**FIENI F, TAINTURIER D, BRUYAS JF ET BATTU I.** Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache – *Bull GTV*, 1995 ; 4 : 35-49.

**FRERET S, GRIMARD B, PONTER A ET HUMBLLOT P (2000).** Variation du niveau d'apport nutritionnel et production d'ovocytes et d'embryons chez les ruminants: étude bibliographique. *Elev. Insem.* 297, 3-25.

**GOO DHAND K.L, STAINES ME, HUTCHINSON G.S.M ET BROADBENT P.J (2000)** In vivo ovocyte recovery and in vitro embryo production from bovine ovocyte donors treated with progesterone, oestrodione and Fsthi *Anim. Reprod S C I* 63, de 145-158.

**GRAY H.G, VARNER M.A (1993).** Signe of estrus and improving detection of estrus in cattle. *Dairy Integrated Reproductive Management* 6. (p. 1-4).

**GRIMARD B, HUMBLLOT P, THIBIER M, PAREZ V ET MIALOT JP (1992).** Synchronisation de l'oestrus chez la vache charolaise : facteurs de variations de la cyclicité, prétraitement, du taux d'ovulation après traitement et du taux de fertilité à l'oestrus induit. *El & Ins.*, 250, 5-17.



- GUTHRIE R.W, COOPER B.S ET HAMMOND J.M. (1995).** Follicular atresie in pigs, Measurement and physiology. *J. Anim.Sci.* 73, 2834-44.
- HAMILTON W.J (1946).** Développement of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *Jornal of Anatomy.*80: 194-204.
- HANZEN (2000).** Cours de la production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine. P3.Faculté de médecine vétérinaire service de theriogenologie des animaux, Université de liège.
- HASLER J.F (2001).** Factors affecting Frozen and Fresh embryo transfer Pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401-1415.
- HEERCHE J.R, NEBEL R.L(1994).** Measuring efficiency and accuracy of detection of estrus J. *Dairy sci* 77 (p. 2754-2761).
- HERES L, DIELENAN S J ET VANEERDENBURG F.J ( 2000).** Validation of a new method of visual oestrus detection on the farm vet. *Q. Jan* 22 (1). (p. 50-55).
- HUHTINEN M, RAINIO V, AALTO J, BREDBACKA P ET MAKI-TANILA A (1992).** Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology.* 37, 457-463.
- HULSHOF S.C.J, FIGUEREIDO J.R, VEN DEN HURK R.** Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaris. *Vet. Quartley,* (1994), 16, 78-80.
- HUMBLOT P ET THIBIER M (1980).** Progesterone monitoring of anoestrus dairy cows and subsequent treatment with a prostaglandin F2 $\alpha$  analog and gonadotropin releasing hormone. *Ann. J. Vet. Res.,* 41, 1762-1766.
- HUMBLOT P ET THIBIER M (1984).** Evaluation comparée des méthodes de diagnostic de gestation chez les bovins. *El. & Ins.,* 200, 4-16.
- J.R MITCHELL ET G.A. DOOK (2004).** The Ertificial Insemination and Embryo Transfer of dairy and Beffe cattelen Ninth Edition. Pearson Prentice Hall. New Jersey P.3, 221, 243,327.
- JOLLY P.D, Mc DOUGALL S, FITZPATRICK L.A, MAC MILLAN K.L ET ENTWISSTLE K.W.** Physiological effects in cows. *J. Reprod. Fert.* (1994). 49, 477-492 of under nutrition on postpartum anoestrus.
- KAFI, M., McGOWAN, M R. (1997).** Factors associated with variatiion in the superovulation reponse of cattle anim. *Reprod. Sci.* 48 (2-4): 137-57).
- KELLY P, DUFFY P, ROCHE J.F.F ET BOLANN M.P (1937).** Superovulation in cottle: effet of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory reponse and endocrine patterns. *Ani.Repro.Sci.*46,1-14.
- KENNEDY L.G BOLAND M. D ET GORDON I (1983).** The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology,*19 (6), 823-832.
- KOHLER ET COLL(1968) CITES PAR NIBART ET BOUYSSOU(1981).** utilisation des hormones gondotropes chez les bovins. In les gonadotrophines. Y COMBARNOUS et Volland-Nail. Edition INRA Paris. Pp 377-394.
- KOHLER S, BRIELMONN CHUG K ET BIBERSTEIN O ( 2012).** Détection automatique des chaleurs chez les bovins; Recherche agonique suisse 1 (11- 12 ) 438-441, 2010.

LINDNER, G.M ET R.W.WRIGHT (1983). bovine embryo and morphology. *Theriogenology* 20: 407-416.

LINSELL C.E, V PAWLYSHYN, A. BIELANSKI ET R.J. MAPLETOFT(1986). Superovulation of heifers with FSH-p beginning on four different days of the cycle *theriogenologie* 26:209 – 219.

LINCASHAW A ET NIEMANN H (1991). Aspect of bovine embryo production in vivo and in vitro-In proceedings 7<sup>th</sup>AETE meeting, cambridge, 14-15 september 1991: 63-77.

LOONEY C.R, BOUTLE B.W, ARCHIBALD L.F ET GODKE, R.A (1981). Comparaison of once doily FSH and twice doily FSH injections for superovulation in beef cattle. *Theriogenologie* 15,13-22. *Padjadjarn*(Bahan Ajar) P.45.

LUCAS-HANN, A. and NIEMANN, H. (1991). In vitro survival of fresh and frozen/thawed bovine demi-embryos *theriogenology* 36: 619-627.

LUSSIER J, MATTON P, DUFOUR J.J ET GROWTH. Rates of follicles in the growth and functions of the ovary in heifers. *Jol. Reprod.*, (1994), 50, 1136-1144.

MIALOT JP, CONSTANT F, CHASTANT-MAILLARD S, PONTER AA ET GRIMARD B. Lacroissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications - Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie, Paris, Novembre 2001 : 163-168.

MOUSTAFA L.A, HAHN J ET ROSELIUS R (1978). Versuche zur Geschlechtsbestimmung am Tag 6 und 7 alten Rinderembryonen. *Berl. Münch, tierärztl. Wschr.*, 91, 236-238.

NAKAMURAT, TAKIO K ET ETO Y. Activin binding protein from rat ovary is follistatin *science*, (1990), 247. 836-838.

PALMITER R.D, BRINSTER R.L, HAMMER R.E, TRUMBAUER M.E, ROSENFELDM G, BIRNBERG H.C ET EVANS R.M (1982). Dramatic growth of mice that develop from egg microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature (Lond.)*, 300, 611-615.

POPESCU C P ET CRIBIU E.P (1982). L'étude cytogénétique de l'embryon bovin. *Proc. Int. Cong. Embryo Transfer in Mammals*, Annecy, France. (Sous presse).

REBORTSON.I ET R.E NELSON (1998). Certification and identification of the embryo. *Manual of the International Embryo transfer Society*. 103-134.

SANTOS J.E.P, CERRY R.L.A ET SARTORI R (2008). Nutritional management of the donor cow *theriogenologie* 69;1:88-97.

SCILLO, K.K. (1992). Effects of dietary energy on control luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70, 1271-1282.

SEIDEL G.E ET SEIDEL S.M (1981). The embryo transfer industry. In : « *New Technologies in Animal Breeding* ». Eds. B.G. Brackett, G.E. Seidel and S.M. Seidel. Academic Press, London-New York, 41 - 80.

SINGH, TYAGI S ET MANDAL D.K (2004). Age related changes in body size and gonadal development of growing Frieswal bulls. *Indian J. Anim. Sci.* 74 (1): 31-34.



- SUUANO M ET SHINOGI T (1999).** Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinyl pyrrolidone. *anim.reprod.science*.55,175-181.
- SUZUKI T, YAMAMOTO M, OEM ET TAKAGI M (1994).** Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone. *Vet. Record*. 135, 41-42.
- TELFORD N.A, WATSON ET G.A.SCHULTZ G.A (1990).** Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development ; a comparison of several species *Molecular Reproduction and development* 26 :90-100.
- TUCKER E.M, MOORE R.M ET ROWSON L.E.A (1974).** Tetraparental sheep chimaeras induced by blastomere transplantation. *Immunology*, 26, 613 – 621.
- WEBB R, CAMPBELL B.K, GARVERICK H.A, GONG J.G, GUTIERREZ C.G ET ARMSTRONG D.G.** Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection - *J Reprod Fertil Suppl*, 1999 ; 54 : 33-48.
- WESTERGAARD L, CALLESEN H, HYTTEL P.** Meiosis inducing substances (MIS) in bovine preovulatory follicles. *Zuchthygiene*, (1985). 20,217-221.
- WILLADSEN S.M ET FEHILLY C.B (1983).** The developmental potential and regulatory capacity of blastomeres from 2-, 4 - and 8-cell sheep embryos. In :« *Fertilization of the Human Egg In Vitro* ». Ed. H.M. Beier and H.R. Lindner. Springer Verlag, Berlin-New York, 353-357.
- WILLIAMSON N.B, MORRIS R.S, BLOOD D.C ET CANNON N.M (1972).** A study of oestrus behaviour and oestrus detection methods in a large commercial dairy herd. *Vet. Record* July (p.50-62).
- WOODRUFF T, LYON R.J ET HANZEN S.E.** Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis-*Endocrinology* (1990), 127, 3196-3205.
- YAMAMOTO M, KAWAGUCHI M, OEM, TAKAGI M ET SUZUKI T (1995).** Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinyl pyrrolidone for superovulation in cows. *J.Reprod.Dev.*41.93-96.