



337THV-2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHER SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA



Département des sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire

Thème :

**Essai de transfert d'embryons frais et
congelés dans l'espèce bovine**

Présenté par : M^{lle} BECHIR BACHA KHADIDJA

M^{lle} MEKHTOUB LINDA

Le jury :

Président : Mr. FERROUK M	M C B	U .Blida
Promoteur : Mr Adel Djallel .	M A A	U.Blida.
Examineur : Mr AKLOUL K	Dr V	U.Blida.
Examineur : Mr DELALI R	Dr V	U.Blida.

2009 - 2010

Remerciements :

Nous remercions **Dieu** de nous avoir donné la santé et la volonté, pour accomplir ce modeste travail.

Nous adressons nos remerciements à notre promoteur **Djellal.A** chargé de cours à la faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques de Blida, pour avoir chapeauté nos travaux et pour ses encouragements.

Nous remercions sincèrement Dr FERROUK M de nous avoir honorés en acceptant de présider le jury.

Nous remercions sincèrement Dr AKLOUL K d'avoir bien voulu faire partie de ce jury et examiner le document.

Nous remercions sincèrement Dr DELLALI R d'avoir bien voulu faire partie de ce jury et examiner ce travail.

Nous remercions Zghaimi Hamza pour avoir mis à notre disposition sa ferme et son aide durant toute la période de réalisation de notre mémoire.

Nous remercions les étudiants de 5^{ème} année promotion 2010, et que soit associé à ces remerciements, l'ensemble du corps enseignant de faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques de Blida.

Nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie mon travail à :

- Mon grand père paternel que DIEU ait son âme sur son vaste paradis, qui n'a cessé de m'encourager dans mes études.
- Mon grand père maternel que DIEU lui accorde la santé et la longue vie.
- Mes grandes mères, mes tantes et mes oncles.
- Mon cher père qui m'a soutenu tout le long de ma vie et surtout pour mes études.
- Ma mère adorée que j'aime plus que tout le monde.
- Mon cher frère : Mohamed Abdellatif.
- Ma chère sœur Amina et son mari Hichem.
- Mes cousins et mes cousines surtout Hobi : Hiba, Khalil, Maissoune et la petite Fedoua.
- Mes amis de la Fac : Fouzi, Hachmi, Hamid, Hmed, Hamza, Marwan, Bilel, Fadhel, Abdou, Walid, Dr Fraoui et ne pas oublier Mohamed.
- Mes copines : Fadhila, Mimi, Wafa, Imène, Zola et surtout ; Sabrina, Hanane, Djoudjoua et Mimichti.
- Toutes les personnes qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études et à toute ma promotion 2010.
- Et surtout à toi mon amie LINDA et toute ta famille.

Bechir Bacha Khadidja

DEDICACES

Je dédie mon travail à :

Mon papa adoré qui ma soutenu tout au long de ma vie et surtout pour mes études, a ma maman que j'aime beaucoup qui ma donné tant d'amour

Mes chers frères Ramdane et Nassim

Mes chères sœurs : Kahina, Nouara, Mahjouba, Leila, Nadia, Mina, Dilya.

Mon neveu Fares et mes nièces : Melina, Lidya, et sérine.

A mes copines d'enfance : Nassima, Nesrine, Ghozlene surtout pas oublié Karim

A mes amis de fac : Mimi, Wafa, zola, Imene, Fouzi, Mohamed, Hachmi, Hmed, Merwan, Bilel, Hamid, Abdou, Fadhel et surtout Sabrina, Hanane, Djodjoa, mimi, Amina

Et à toutes les personnes qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études et à toutes ma promotion 2010

Et surtout à toi mon amie NOOR

Linda Mekhtoub

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

Résumés

Introduction

LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Physiologie et fonctionnement ovarien

1. Introduction.....	01
2. Folliculogenèse.....	01
2.1. Phase de multiplication.....	01
2.2. Phase de croissance.....	02
2.2.1. Le follicule primordial.....	02
2.2.2. Le follicule primaire.....	02
2.2.3. Le follicule secondaire.....	03
2.2.4. Le follicule tertiaire.....	03
2.2.5. Le follicule mur ou de De Graff.....	03
2.3. La phase de maturation.....	04
3. L'atrésie folliculaire.....	05
4. Dynamique de la croissance folliculaire.....	06
4.1. Recrutement.....	06
4.2. sélection.....	06

4.3. Dominance.....	06
5. Le cycle œstral chez la vache.....	07
5.1. Les différentes phases du cycle œstral chez la vache	07
5.1.1. Pro œstrus.....	07
5.1.2. Œstrus.....	08
5.1.3. Met œstrus.....	08
5.1.4. Di œstrus.....	08
6. Fécondation et développement embryonnaire.....	09
6.1. Fécondation.....	09
6.2. Développement embryonnaire précoce.....	09
6.2.1. premières divisions cellulaires.....	09
6.2.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation.....	10
6.2.3. L'implantation.....	11

Chapitre II : Superovulation et collecte d'embryons

1. Introduction.....	12
2. Superovulation.....	12
2.1. Le choix des donneuses.....	12
2.2. Traitements utilisés.....	13
2.2.1 Pregnant Mare Serum Gonadotrophin.....	13
2.2.2. Les extraits hypophysaires	13
3. La récolte d'embryons.....	14
3.1. Méthodes de récolte.....	14
3.1.1. Méthodes chirurgicales.....	14
3.1.2. Méthodes non chirurgicales.....	14

3.1.2.1. Sonde de Cassou (à trois voies).....	14
3.1.2.2. Sonde de Han (à deux voies).....	15
4. Evaluation des embryons après la récolte.....	15
• Classification des embryons.....	16

Chapitre III : Congélation et transfert embryonnaire

I. Cryoconservation.....	17
1. Les techniques de cryoconservation.....	17
A. La congélation conventionnelle.....	17
1) Principe.....	17
2) Les cryoprotecteurs.....	17
3) Conditionnement de l'embryon dans une paillette.....	17
4) Descente de température.....	18
5) Avantages et inconvénients de la technique de congélation lente.....	19
B. Vitrification et vitrification ultra rapide.....	19
1) Principe.....	19
2) Les cryoprotecteurs.....	20
3) Conditionnement de l'embryon : paillette, OPS et cryoloop.....	21
4) Descente de température.....	23
5) Avantages et inconvénients de la vitrification.....	23
II. Décongélation.....	25
III. Transfert embryonnaire.....	25

1. Introduction.....	25
2. Technique du transfert.....	26
3. Etapes du transfert.....	28
a. Superovulation.....	28
b. Collecte des embryons.....	28
c. L'appréciation de la qualité des embryons.....	28
d. Lavage et conservation des embryons.....	29
e. La mise en place des embryons.....	29
4. Intérêt du transfert embryonnaire.....	30

LA PARTIE EXPERIMENTALE

I. Introduction.....	31
II. Objectif.....	31
III. Matériel.....	31
1. Matériel biologique.....	31
• Les embryons.....	31
• Le choix des receveuses.....	32
2. Matériel de collecte, de transfert et de congélation des embryons.....	32
IV. Méthode.....	33
1. La récolte des embryons.....	33
2. La cryoconservation.....	34
3. La décongélation.....	35

4. Transfert.....	35
V. Les résultats.....	37
1. Les résultats de récolte.....	37
2. Résultats de recherche des embryons.....	39
3. Résultats après classification des embryons.....	43
4. Résultats du transfert.....	45
5. Résultats après décongélation.....	46
VI. Discussion	
VII. Conclusion	

Liste des figures

Partie bibliographique :

Figure 1 : coupe histologique d'ovaire et principaux types de follicules ovarien.....	5
Figure 2 : mise en paillette pour : congélation lente, vitrification, OPS.....	22
Figure 3 : technique cryoloop.....	23
Figure 4 : décente de température.....	24

Partie expérimental :

Figure 5 : les récoltes	38
Figure 6 : nombre des embryons récoltés.....	38
Figure 7 : nombre d'embryons transférables.....	39
Figure 8 : classification des embryon.....	40
Figure 9 : le devenir des embryons récoltés	44
Figure 10 : embryons congelés.....	44
Figure 11 : diagnostique de gestation.....	46

Liste des photos

Photo 1 : le biocongélateur.....	35
Photo 2 : sonde de transfert.....	36
Photo 3 : embryon non fécondé.....	41
Photo 4 : embryon dégénéré.....	42
Photo 5 :morula (classe 1).....	42
Photo 6 :jeune blastocyste.....	42

Liste des abréviations :

bFSH: bovine follicule stimulating hormone

cm: centimeter

FSH: follicule stimulating hormone

IGF: insulin growth hormone

LH: luteinizing hormone

Max: maximum

Min: minimum

Mis: meosis inductive substance

mm : millimètre

OPS: open pulled straw

Pfsh: porcine follicule stimulating hormone

PMSG: pregnant mare stimulating gonadotropin

ZP: zone pellucide

Résumé :

Les biotechnologies de la reproduction basées sur l'utilisation d'embryons bovins ont été développées à partir de l'année 1975.

La technique de transfert embryonnaire augmentant le nombre de produits des femelles d'élite par superovulation puis transfert à l'état frais des embryons chez des receveuses a été vite utilisée dans les programmes de sélection. Ceci a été suivi par la mise au point de technique de congélation.

Notre étude a été réalisée dans une ferme privée, dans le but bien précis : essayer d'appliquer le transfert en frais sur des receveuses ainsi que la congélation des embryons de bonne qualité.

Sur 53 embryons récoltés dont 16 utilisable, nous avons pu transférer 6 et congeler 9. Les transferts en frais ont donné lieu à deux gestations mais il s'est avéré après décongélation que les embryons conservés n'étaient plus viables après décongélation ce qui peut être expliqué par l'utilisation de milieux inadéquats ainsi que le délai de conservation à température ambiante.

Mots clés : biotechnologie, transfert embryonnaire, congélation, gestation, décongélation.

Abstract:

The biotechnologies of reproduction based on the use of bovine embryos were developed from year 1975.

The technology of embryonic augmented transfer the number of products of the females by superovulation then transfer in the cool state of embryos at the ticket collectors was quickly used in programs of selection. This was followed by the completing of technology of freezing.

Our study was accomplished in a private farm, in very definite purpose: try to apply the transfer in freshly to ticket collectors as well as freezing of the good quality embryos.

On 53 harvested embryos among which 16 useful, we could transfer 6 and freeze 9. Transfers in freshly one given rise to two gestations but it afterwards proved to be defrosting that the kept embryos was not viable any more after defrosting what can be explained by the use of circles inadequate as well as the delay of conservation at room temperature.

Biotechnologies, transfer embryos, gestation, defrosting.

ملخص:

تطور إستعمال أجنة البقر في مجال بيوتكنولوجيا الإنتاج وذلك منذ عام 1975م.

إن تقنية نقل الأجنة لرفع نسبة تكاثر الإناث باستعمال عملية إنتاج أكثر من بيضة، بعدها نقل الأجنة في حالة نضج عند مستقبلات إستعملة بطريقة سريعة في برنامج الإختيار وهذا يتبع بإستعمال طريقة التجميد.

دراستنا تمت في مزرعة خاصة بهدف محدد:

محاولة نقل الأجنة في حالة نضج على مستقبلات وكذلك تجميد الأجنة ذات النوع الجيد. على 53 جنين متحصل عليه، 16 مستعملة، إستطعنا نقل 6 أجنة وتجميد 9.

بنقل الأجنة في حالة نضج تحصلنا على حملين، لكن تبين أنه بعد إزالة التجميد لم يتبق أي جنين حي، ربما يعود هذا لإستعمال وسائط غير صالحة وأيضا وقت التجميد في درجة حرارة المحيط.

بيوتكنولوجيا نقل الاجنه. حمل. ازاله التجميد

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale :

Le transfert embryonnaire est une biotechnologie développée au cours des trois dernières décennies après le succès de l'insémination artificielle dans le but d'améliorer les performances de production tant sur le plan sanitaire que zootechnique.

Le premier essai couronné de succès de prélèvement d'un embryon suivi de son transfert dans une lapine fut réalisé par HEAPE en 1891 (voir Betteridge KJ An historical look at embryo transfert J.REPORD.FERT. 1981, 62,1). C'est en 1951 que naquit le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse (WILMUT et al. 1951). Le premier veau né après transfert d'un embryon congelé puis décongelé naquit en 1973 (WILLMUT et ROWSON 1973). Il portait le nom de Frosty II. Frosty I étant né suite à une fécondation réalisée au moyen de sperme congelé.

A partir de la fin des années 1980, les techniques de production d'embryons *in vitro* ont été maîtrisées dans l'espèce bovine (Goto et al, 1988 ; Aoyagi et al, 1989 ; Marquant Leguienne et al, 1989) et ont permis d'envisager le développement de nouvelles applications, initialement basées sur l'utilisation d'ovocytes collectés sur les ovaires d'animaux abattus, puis chez l'animal vivant (technique d'*Ovum Pick Up* par voie transvaginale ; Pieterse et al, 1988, 1991). De nombreuses améliorations ont été apportées à ces techniques au cours des années 1990 à 2000. Le clonage embryonnaire puis somatique a été réalisé dans de nombreuses espèces et son intérêt pour les programmes de sélection discuté (Colleau et al, 1998 ; Colleau et al, 2004). Compte tenu des rendements actuels, l'intérêt de ces méthodes par rapport au transfert embryonnaire apparaît plus ou moins important suivant la nature des schémas de sélection (Van Arendonk et Bijma, 2003 ; Tissier et al, 2004) et leur utilisation est encore très variable en fonction des pays ou des organismes de sélection.

Chez les espèces d'intérêt zootechnique et en particulier chez les bovins, l'obtention des taux de gestation les plus élevés possible après transplantation d'embryons est une condition essentielle pour le développement pratique et l'utilisation commerciale de cette méthode de reproduction.

Ce modeste travail vise la maîtrise de la technique de transfert d'embryons bovins ainsi que les différentes étapes de la congélation dans les conditions du terrain en

exploitation privée, puis en fonction des résultats comparer les résultats des deux techniques (transfert en frais et après congélation).

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Physiologie et fonctionnement ovarien

1. Introduction :

L'ovaire des mammifères contient un stock important d'ovocytes qui sont formés au cours de la vie fœtale (Driancourt et Al, 1991), cependant, il ne reste qu'environ 200 000 ovocytes à la naissance et de ceux-ci ; un maximum de 300 se rendent à un stade préovulatoire (Erickson, 1966).

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

2. Folliculogenèse :

2.1. Phase de multiplication:

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

Pendant la gestation une réserve de deux (02) millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase 1 ; elles se transforment en ovocytes 1.

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

2.2. Phase de croissance :

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

Cette phase se caractérise par des modifications qui concernent tout 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, constituent les follicules prénataux, puis les stades tertiaires et de De Graaf représentant les follicules antraux (Hulshof et al, 1994).

2.2.1. Le follicule primordial :

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

Cette population de follicule, qui est à son maximum pendant la vie foétale, représente la réserve d'ovocytes pour la vie reproductive de la vache (Driancourt et al, 1991).

2.2.2. Le follicule primaire :

Ce caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et par l'agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques, c'est durant cette période que l'ovocyte synthétise ; et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse ; la zone pellucide est constituée de trois zones ; zone pellucide 1, ZP 2, ZP 3, cette dernière est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (Yanagimachi, 1994).

2.2.3. Le follicule secondaire :

L'ovocyte ici atteint son volume maximal, il s'est entouré d'un pellucide bien différenciée et de deux ou trois couches de cellules cubiques formant la granulosa ; l'ensemble est limité extérieurement par la membrane basale qui s'est transformée en membrane de Sklavjanski constituée de collagène de type IV, de fibronéctine, de laminine et de protéohéparane sulfate.

2.2.4. Le follicule tertiaire :

Il est dit cavitaire ou antral en raison de l'apparition au sein des cellules de petites cavités résultant de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de la sécrétion des cellules de granulosa, ces cavités finissent par confluer pour former l'antrum, le développement progressif de l'antrum entraîne la séparation des cellules de la granulosa en cellules de cumulus oophorus qui vont se différencier en corona radiata, couche cellulaire entourant directement l'ovocyte. Ces cellules de la corona et de cumulus présentent de nombreuses zones jonctionnelles (GAP jonction), qui constituent autant de moyen de communication entre l'ovocyte et la cavité folliculaire.

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

2.2.5. Le follicule mur ou follicule de De Graaf :

Représente la phase terminale du développement folliculaire, cette phase ne concerne qu'un follicule sur mille entré en croissance, le follicule mur se caractérise par une taille maximale de 25 mm (Saumande, 1991) ; par un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse, gonflé de liquide, le follicule affleure en surface de l'ovaire, l'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de corona radiata et du cumulus oophorus, les thèques internes et externes sont bien

différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne qui est une glande à part entière.

La thèque externe est de nature fibreuse, une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et la membrane basale, chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0,13 mm atteigne la taille préovulatoire (Lussier et al, 1987).

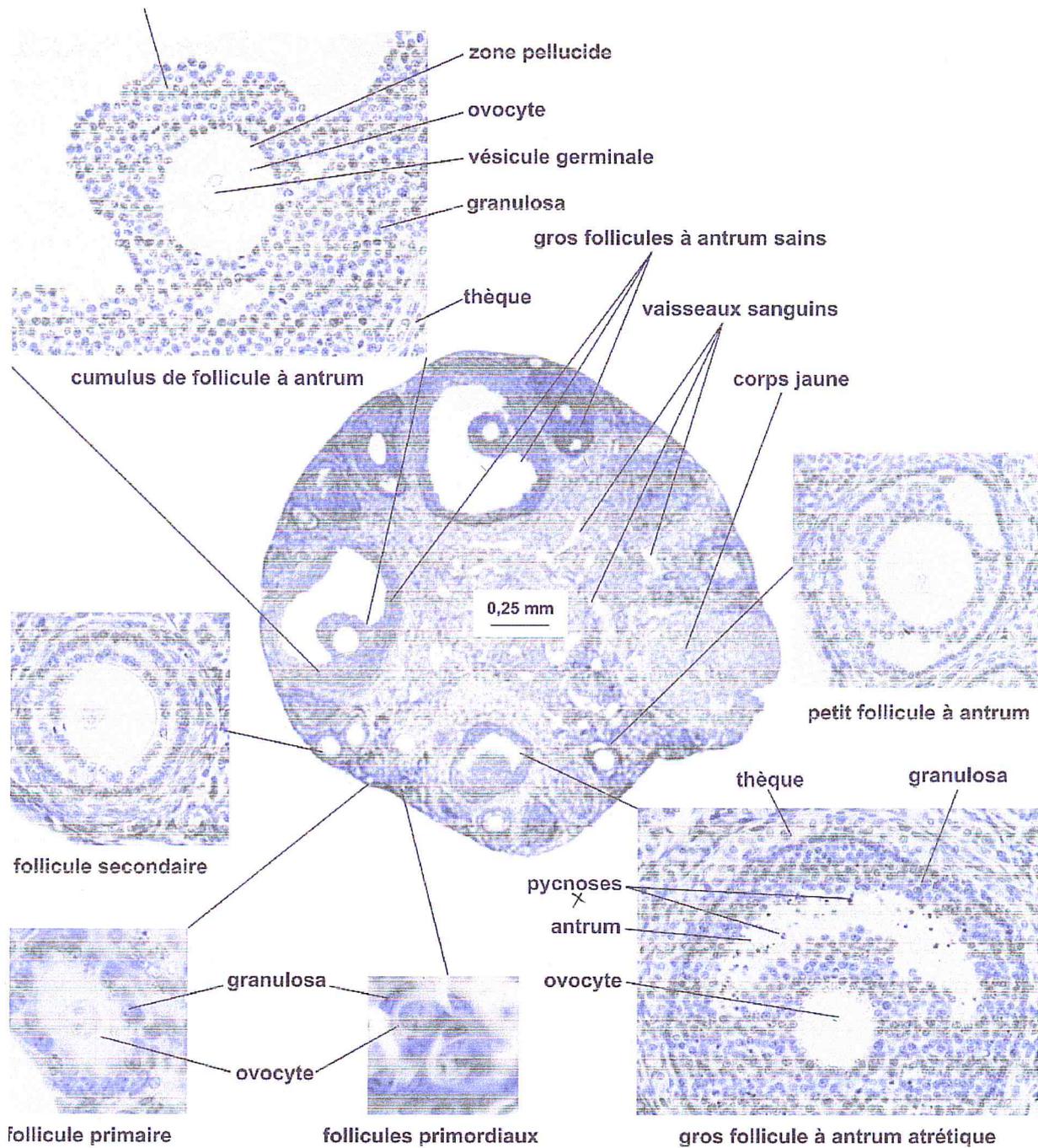
2.3. La phase de maturation :

Cette phase représente l'ensemble des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte, ces différentes modifications lui donne l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, lorsque l'ovocyte a atteint 80% de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa maturation nucléaire, c'est-à-dire la reprise de la méiose, celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire, l'ovocyte I se transforme en ovocyte II lors du cycle sexuel. La reprise de la division méiotique n'a 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 décharge ovulante permet non seulement à l'ovocyte de reprendre sa méiose, mais également de réaliser sa maturation cytoplasmique, préalable essentielle au succès de la fécondation (Hanzen et al, 2000).

Le cytoplasme synthétise une protéine, ovopéroxydase pour préparer 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).

Figure 1 : Coupe histologique d'ovaire et principaux types de follicules ovariens



3. L'atréisie folliculaire :

C'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).

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

4. Dynamique de la croissance folliculaire :

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

4.1. Recrutement :

C'est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicule 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 atrésiques. Le recrutement est un phénomène aléatoire, provoqué par l'augmentation transitoire du taux circulant de FSH (Follicule Stimulating Hormone) (Driancourt et al, 1991).

4.2. Sélection :

C'est l'émergence des follicules ovulatoires parmi les follicules recrutés. Cette sélection est secondaire à la réduction de FSH qui a initié le recrutement. En effet, le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'œstradiol, mais également d'inhibine qui par rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, diminue la production de FSH. A l'exception des follicules sélectionnés capables de se développer en présence de faible taux de FSH, les autres follicules recrutés entrent en atrésie (Driancourt et al, 1991).

4.3. Dominance :

Elle fait suite à la sélection. Elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire. Le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression

de follicules en croissance, ou d'inhiber la croissance d'autres follicules, et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié. La dominance correspond au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide de volume des follicules ovulatoires. 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 diminue, c'est-à-dire s'il y a lutéolyse, alors que le follicule dominant de la deuxième vague est en phase de croissance, il ovule. Si, à l'inverse, la progestéronémie se maintient à un niveau élevé après que le follicule dominant ait atteint sa taille maximale, il commence à régresser, et une autre vague de croissance apparaît (Drion et al, 1996).

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

5. Le cycle œstral chez la vache :

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

5.1. Les différentes phases du cycle œstral chez la vache :

5.1.1. Pro œstrus :

Au stade de pro œstrus, un ou plusieurs follicules ovariens sont en voies de maturation sous l'influence de la FSH et la LH, l'action de cette dernière devient

progressivement prédominante et il en résulte une production de plus en plus grande d'hormone folliculaire par la granulosa (œstrogène), elle dure en moyenne 3 jours chez les ruminants. Pendant le pro œstrus les glandes utérines prolifèrent et le volume de l'utérus augmente (Kolb, 1975).

Le pro œstrus est synchrone du déclin d'activité du corps jaune ; il débute vers le 17^{ème} jour et il est nettement précisé au 19^{ème} jour avec l'ascension du taux plasmatique des œstrogènes (Derivaux et Ectors, 1980).

5.1.2. Œstrus :

Période de maturation et éclatement du follicule, ponte ovarienne, acceptation du male (Fontaine, 1995). L'œstrus est de courte durée, en moyenne de 14 à 15 heures et l'ovulation qui est spontanée, survient environ 14 heures après la fin des chaleurs (INRAP, 1988).

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

5.1.3. Met œstrus :

Correspond à l'installation du corps jaune et va du jour 1 au jour 6 du cycle (INRAP, 1988).

Le devenir du corps jaune est conditionné par celui de l'ovule ; si celui-ci est fécondé, le corps jaune reste actif et empêche la maturation du nouveau follicule. Si la fécondation n'a pas eu lieu, le corps jaune régresse (Kolb, 1975).

5.1.4. Di œstrus :

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

6. Fécondation et développement embryonnaire :

6.1. Fécondation :

Elle résulte de l'union d'un gamète male, le spermatozoïde et d'un gamète femelle, l'ovule. Chez la vache, cette fécondation s'accomplirait près de la jonction isthmo-ampoulaire de l'oviducte peu de temps après l'ovulation (environ 2 heures) (Hunter, 1985). Après la fécondation, l'embryon se dépouille des dernières cellules de la corona radiata l'entourant mais conserve intacte sa zone pellucide (ZP) (Crozet, 1984).

La ZP est une structure perméable, acellulaire et translucide entourant déjà l'ovocyte dans la cavité folliculaire. La présence de la ZP jusqu'au stade morula compacte serait essentielle au développement normal de l'embryon, elle permettrait la cohésion des blastomères et jouerait un rôle de protection et de maintien de l'homéostasie de l'espace périvitellin (Trounson et Moore, 1974).

Elle joue aussi un rôle important dans le contrôle de la polyspermie (Wolf, 1981). Chez la plupart des mammifères, si la rencontre n'a pas lieu endéans les heures qui suivent leur libération, les gamètes dégénèrent.

6.2. Développement embryonnaire précoce :

C'est la période qui précède la nidation et la fixation du blastocyte sur la paroi de l'endomètre. L'œuf fécondé apparaît comme une grosse cellule à 2 noyaux, pronucléus male et pronucléus femelle, ils fusionnent rapidement en 1 noyau unique qui ne va pas tarder à se diviser en 2, 4, 8, 16 cellules toujours entourées de la ZP (Derivaux et Ectors, 1980). Cette masse cellulaire qui n'a fait que diviser le cytoplasme de l'ovule sans augmenter de volume, ressemble, au microscope, à une petite mure morula en latin. Ce stade est atteint au bout de 3 à 4 jours tandis que l'œuf descend lentement l'oviducte vers l'utérus, poussé par les mouvements ciliaires et les contractions. Il atteindra au bout de 4 à 5 jours chez la vache.

6.2.1. Premières divisions cellulaires :

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

fécondation (Gondolfi et al, 1993). La deuxième division (stade 4 cellules) est légèrement asynchrone et se traduit par l'existence d'un stade intermédiaire de 3 cellules pendant 1 à 2 heures, jusqu'au stade 8 cellules, les divisions sont égales, mais s'effectuent sans régularité (Scriban, 1999). A partir du stade 16-32 cellules, des contacts s'établissent entre les blastomères, des jonctions sont de plus en plus étroites, l'embryon devient une morula compactée à 32 cellules.

On distingue plus alors nettement les blastomères, chaque blastomère présente un axe de polarité qui dépend des contacts et des communications intercellulaires et acquiert de la morua de 80 à 100 cellules chez la vache : c'est le début de la formation du blastocyte (j6) avec sa cavité, le blastocoèle. C'est aussi le moment où se forme le trophoctoderme à partir des cellules polaires (externe) qui assurent un transport actif de liquide, alors que la masse cellulaire interne ou futur embryon à partir des cellules apolaires (interne).

6.2.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation :

Après ces premières divisions à l'intérieur de la zone pellucide, celle-ci s'amincit puis disparaît et l'œuf continue à multiplier ses cellules. Bientôt les cellules, jusque là toutes semblables vont se différencier et s'organiser en quelques cellules plus volumineuses se groupant en une petite masse (bouton embryonnaire), et autres cellules, plus petites, se placent à la périphérie formant une couche appelée trophoblaste, l'ensemble est appelé blastocyte.

L'éclosion c'est-à-dire la sortie du blastocyte hors de sa pellucide vers le 9ème_10ème jour suivant la fécondation, ne résulte pas d'une lyse enzymatique, des membranes pellucides intactes peuvent être retrouvées dans l'utérus, mais de la formation d'un point de perforation.

Ce processus à une durée moyenne de 12 heures. Diverses modalités ont été décrites : la phase d'expansion est continue et suivie de l'éclosion, elle peut être discontinue et être entrecoupée de quelques phases de contractions se terminant ou non par une éclosion normale. Vers le 11ème_12ème jour de gestation, le blastocyte se compose de 100 cellules, environ 25% d'entre elles seulement constituant le bouton embryonnaire recouvert jusqu'à ce moment par le trophoctoderme. De la forme sphérique, le blastocyte prend

progressivement un aspect ovoïde avant d'entamer vers le 12^{ème} au 14^{ème} jour sa phase d'élongation.

6.2.3. L'implantation :

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

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

Les premiers contacts tissulaires entre le trophoblaste et la surface utérine s'observeraient selon les auteurs entre 11^{ème} jour et 20^{ème}_30^{ème} jour qu'un processus d'adhésion entre les structures maternelles et embryonnaires se mettrait en place (King et al, 1982).

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

Chapitre II : Superovulation et collecte d'embryon

1. Introduction :

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

La stimulation ovarienne par les hormones hypophysaires permet d'obtenir une augmentation de la quantité de follicule préovulatoire et, par suite, une augmentation du nombre d'ovulation.

Cette technique est surtout utilisée pour obtenir d'avantages d'embryons lors des transferts embryonnaires.

Le principe est de court-circuiter les phénomènes de sélection et de dominance et d'amener jusqu'à l'ovulation les follicules, qui privés de FSH (Follicule Stimulating Hormone) et de LH (Luteinising Hormone), auraient subi le phénomène d'atrésie. La superovulation est réalisée soit à partir d'hormones chorioniques (PMSG, Pregnant Mare Stimulating Gonadotropin), soit d'origine hypophysaire (FSH) (Hanzen,2009).

2. Superovulation :

2.1. Le choix des donneuses :

Généralement, on choisit une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse. Il convient d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité.

L'animal superovulé aura autant que faire se peut accoucher normalement, n'aura pas présenté de complications puerpérales ou du post-partum telles qu'une rétention placentaire, une infection utérine, une fièvre vitulaire ou de l'acétonémie.

Il aura manifesté deux ou trois chaleurs à intervalles réguliers.

A l'exploration manuelle, le col et les cornes utérines seront de diamètre normal ; un corps jaune sera présent sur l'ovaire.

L'examen vaginal au moyen d'un spéculum éliminera la possibilité d'une infection utérine ou d'un urovagin.

Les traitements antiparasitaires et vaccination auront été effectués 30 jours au moins avant le traitement de superovulation (Hanzens, 2009).

2.2. Traitement utilisé :

2.2.1. Pregnant Mare Serum Gonadotrophin :

La PMSG extraite du sérum de jument gravide entre le 42^{ème} et le 100^{ème} jour de gestation possède une activité biologique correspondant à un mélange de 2/3 de FSH et 1/3 de LH. Elle est injectée par voie IM à une dose comprise entre 2.000 et 3.000 UI. La réponse au traitement augmente avec la dose injectée. De même, on observe une augmentation de risque d'anovulation et d'embryons de moins bonne qualité avec la dose administrée (Hanzen, 2009).

La PMSG a une demi-vie particulièrement longue (120 heures) imputable à sa richesse en acide sialique (13%) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale.

Il est indispensable de lui adjoindre l'injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG (obtenu sur moutons) au moment des chaleurs. Ces anticorps vont inhiber l'action de la PMSG et éviter la formation de follicules kystiques.

La répétition des injections de PMSG à 1 voire 2 mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné la réaction antigénique possible (Hanzen, 2009)

2.2.2. Les extraits hypophysaires :

Les extraits hypophysaires (d'origine porcine le plus souvent, pFSH, mais aussi bovine, bFSH, ou ovine) possédant une demi-vie plus courte que la PMSG, en fonction de leur teneur en acide sialique (5% pour la pFSH). Ils doivent faire l'objet d'injections répétées, leur concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et ne sont plus décelables 12 heures après l'injection. Contrairement à la PMSG leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps (Hanzen, 2009).

Les doses de pFSH sont comprises entre 32 et 50UA (Unité Armour) administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bi-journalières (matin et soir) pendant 4 jours. La dose 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA est de la vache viandeuse. Les FSH sont présentées sous formes lyophilisées et reconditionnées avant l'emploi au moyen de sérum physiologique. Une fois les dilutions réalisées, les flacons préparés sont congelés. La FSH décongelée se conserve sans dommage au réfrigérateur (4°C) pendant le traitement. Une fois décongelée, la solution ne peut pas être recongelée (Henzen, 2009).

3. La récolte d'embryons :

3.1. Méthodes de récolte :

3.1.1. Méthodes chirurgicales :

Initialement, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous anesthésie générale le plus souvent au niveau de la ligne blanche en avant du pis. Une fois l'utérus extériorisé, une incision d'un cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter à deux voies (sonde de type Folley). Le ballonnet était ensuite gonflé. Le liquide de récolte était injecté au moyen d'une seringue et d'une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet. Après récolte, le ballonnet était dégonflé, l'utérus suturé et on procédait de la même manière pour l'autre corne utérine. Cette technique offrait l'avantage d'un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80%), de pouvoir juger de la réponse ovarienne au traitement de superovulation. Elle fut pratiquement abandonnée étant donné l'infrastructure de mise en place requise mais aussi la difficulté de répéter souvent l'intervention sur le même animal (Henzen, 2009).

3.1.2. Méthodes non chirurgicales :

3.1.2.1. Sonde de Cassou (à trois voies) :

Elle assure un circuit continu du milieu de collecte. Une voie permet de gonfler le ballonnet. Une autre permet d'injecter le liquide de récolte et la troisième assure la récupération du liquide injecté dans la corne. Cette sonde se compose d'un corps rigide de 56 cm de long et de 6 mm de diamètre. Il est muni d'un bouchon d'échantéité postérieur de 160 cm et de diamètre de 3 mm. Il est muni à son extrémité d'une bille métallique destinée

à en faciliter la progression dans la corne utérine. Il présente à son extrémité proximale des graduations qui permettent de juger du degré de pénétration dans la corne utérine. Il est percé dans sa partie terminale d'orifices (Henzen, 2009).

3.1.2.2. Sonde de Han (à deux voies) :

Elle est à deux voies ;(modèle Allemand). Une voie permet de gonfler le ballonnet, tandis que la seconde permet d'injecter et de récupérer en alternance le liquide de récolte des embryons. La sonde a une longueur de 70cm et un diamètre de 6 à 7 mm. Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre un peu rigide et faciliter ainsi sa mise en place dans l'utérus (Hanzen, 2009).

4. Evaluation des embryons après la récolte :

L'évaluation morphologique fait classiquement référence à celle proposée par Eldsen en 1978. En pratique 8 éléments d'observation peuvent être retenus. Ils concernent la membrane pellucide (1.sphéricité ; 2.épaisseur ; 3.aspect fissuré ou non) ; le blastocyte en général (4.régularité de son aspect général ; 5.degrés d'identification de ses différentes structures à savoir le trophoblaste, le bouton embryonnaire et la cavité blastocoelique) et les cellules blastocytaires (6.aspect des contours cellulaires et degré de variation de taille entre les cellules ; 7.présence de cellules détachées dans l'espace vitellin ; 8.présence de vacuoles dans les cellules ou de granulation à leur surface) (Hanzen, 2009).

• Classification des embryons :

L'évaluation de la qualité des embryons se fait par l'intermédiaire de la taille, de la couleur, du nombre et de la capacité des cellules, de la taille de l'espace périvitellin, du nombre de cellules dégénérées, et du nombre et de la taille des vésicules. L'IETS donne une définition précise de quatre qualités différentes. (ROBERTSON et NELSON, 1994).

Les embryons sont observés au grossissement 200 pour évaluer leur qualité. On distingue quatre classes de qualité embryonnaire :

Excellent (qualité 1) :

Embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique avec des cellules de couleur et texture comparable, blastomères polygonaux au stade morula

Bon (qualité 1) :

Embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace périvitellin.

Moyen (qualité 2) :

Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours ou présentant des défauts précis tels que des cellules échappées dans l'espace périvitellin, des blastomères de taille variable, quelques cellules dégénérées, et quelques vésicules et un aspect plus clair ou plus sombre que normal.

Médiocre (qualité 3) :

Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes et des vésicules grosses et nombreuses, mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît normale.

Mort ou dégénéré (qualité 4) :

Arrêt de développement à un stade précoce avec des cellules dégénérées (INRA-UNCEIA, 1990).

CHAPITRE III : Congélation et transfert embryonnaire

I. La cryoconservation :

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

1. Les techniques de cryoconservation :

A. La congélation conventionnelle lente :

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

1) Principe :

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

2) Les cryoprotecteurs :

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

L'incorporation du cryoprotecteur peut se faire en une ou plusieurs étapes.

3) Conditionnement de l'embryon dans une paillette :

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

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

ampoules de verre, moins conductrices de la chaleur et le ratio volume/surface inférieur. L'utilisation de la paillette donne de meilleurs résultats dans la congélation de jeunes embryons (Slade et al, 1985).

Ces propriétés favorisent des échanges de température plus rapide et ce, aussi bien à la congélation qu'à la décongélation. Cela implique alors de manipuler très rapidement les paillettes. Les inscriptions de la paillette doivent aussi être facilement lisibles une fois qu'elles sont plongées dans l'azote liquide à -196°C pour éviter de sortir les paillettes à chaque fois que l'on veut lire ce qu'il y a écrit dessus. Pour cela, des visotubes ou des codes de couleur utilisés. Lors de la mise en paillette de l'embryon, il faut :

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

La présence des bulles d'air est primordiale car elles délimitent la région de la paillette dans laquelle se situe l'embryon. Emprisonné entre ces bulles d'air, l'embryon ne peut être entraîné vers l'une ou l'autre des extrémités ou il risquerait de se coller au bouchon et d'être perdu (Voire figure 2a).

4) Descente de température :

La paillette est ensuite déposée dans une boîte conservée à température ambiante qui sera placée dans le congélateur programmable.

Les cryoprotecteurs sont ajoutés à la température ambiante, c'est donc à partir de 20, 25°C que débute le refroidissement.

Dans un premier temps, les paillettes sont réfrigérées jusqu'à $-6, -7^{\circ}\text{C}$ à la vitesse de 1 à 3°C/min. C'est à ces températures que la cristallisation est enduite en appliquant une barre

métallique préalablement refroidie dans l'azote liquide ou grâce à un système incorporé dans le congélateur.

Après l'induction de la cristallisation, la vitesse de la descente de température est ralentie à moins de 1°C/ min jusqu'à -30, 40°C.

C'est à ce moment que la déshydratation des cellules embryonnaires se produit. Il faut ensuite mettre fin à la déshydratation en augmentant la vitesse de refroidissement. Pour cela, la paillette est plongée dans l'azote liquide (Voire figure 4).

5) Avantages et inconvénients de la technique de congélation lente :

• Avantages :

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

Les cryoprotecteurs sont utilisés à des concentrations relativement peu toxiques.

• Inconvénients :

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

C'est la technique classiquement utilisée sur le terrain pour la congélation des embryons bovins, caprins et ovins in vivo (Guignot, 2003).

B. Vitrification et vitrification ultra rapide :

1) Principe :

La vitrification est une technique qui permet d'éviter au maximum la formation des cristaux de glace au cours de refroidissement en transformant la phase liquide du cytoplasme en phase solide amorphe.

Le milieu a alors une forte viscosité et il faut appliquer une vitesse de refroidissement et de réchauffement très rapide (-2500°C/min).

Ceci implique l'utilisation de cryoprotecteurs à de très fortes concentrations.

La technique de vitrification ultra rapide repose comme son nom l'indique sur des vitesses de refroidissement encore plus rapide, de l'ordre de 20 000°C/min. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié et à la faible épaisseur des parois de paillettes dans lesquelles sont montés les embryons : des paillettes étirées (Open Pulled Straw d'où le nom de la technique : OPS). Cette technique a permis de conserver l'embryon de porc (Berthelot et al, 2000). Un autre système, la «cryoloop», permet également d'atteindre des vitesses de refroidissement très rapides (Guignot, 2003).

2) Les cryoprotecteurs :

Comme dans la congélation lente, les embryons sont mis en présence du cryoprotecteur par étapes de concentrations croissantes. Les concentrations employées sont très élevées, entre 16 et 18% pour les techniques de vitrification ultra rapide et jusqu'à 40% pour la technique de vitrification classique dans les protocoles de (Hochi et al 1994 et 1995). Ces fortes concentrations sont toxiques pour l'embryon, il faut donc réduire au maximum le temps de contact entre l'embryon et le cryoprotecteur.

Sont surtout employés l'éthylène glycol et le DMSO en association avec du sucrose et/ou du ficoll, cryoprotecteurs extracellulaires.

Les cryoprotecteurs sont ajoutés en deux étapes :

- une première de quelques minutes avec des concentrations «relativement basse» de cryoprotecteur.
- une seconde de l'ordre de 30 s avec des concentrations très élevées «toxique» pour l'embryon et l'ajout de cryoprotecteurs extracellulaires.

3) Conditionnement de l'embryon : paillette, OPS et cryoloop :

- **Vitrification classique :**

Dans la technique de vitrification classique, les embryons sont conditionnés dans les mêmes paillettes que celles employées pour la technique de congélation lente avec de part et d'autre de l'embryon, des bulles d'air et des colonnes de sucre (Voire figure 2b).

- **Technique OPS :**

Dans cette technique, la montée des embryons dans la paillette étirée se fait par capillarité. A la fin des bains de cryoprotecteurs, l'embryon est déposé dans une goutte de 2 μ L.

Quand la paillette touche la goutte, le liquide contenant les embryons monte. La paillette est ensuite immédiatement placée horizontalement dans l'azote liquide (Voire figure 2c)

.Figure 2 : mise en paillette pour la congélation lente, vitrification, OPS

Fig 1.a Congélation lente (paillette de 0,25 mL)

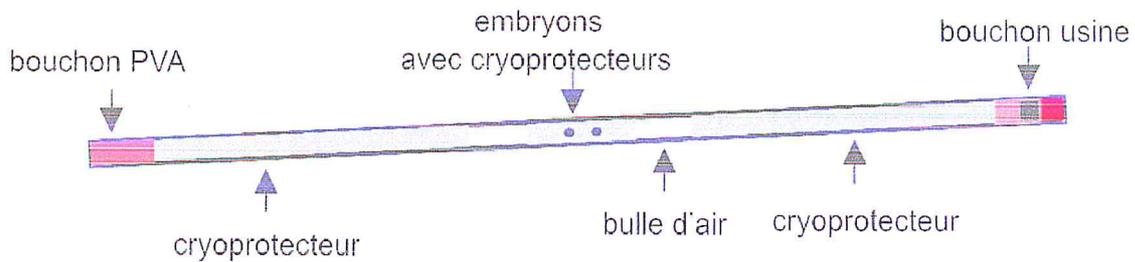


Fig 1.b Vitrification (paillette de 0.25 mL) ou Congélation lente avec transfert direct

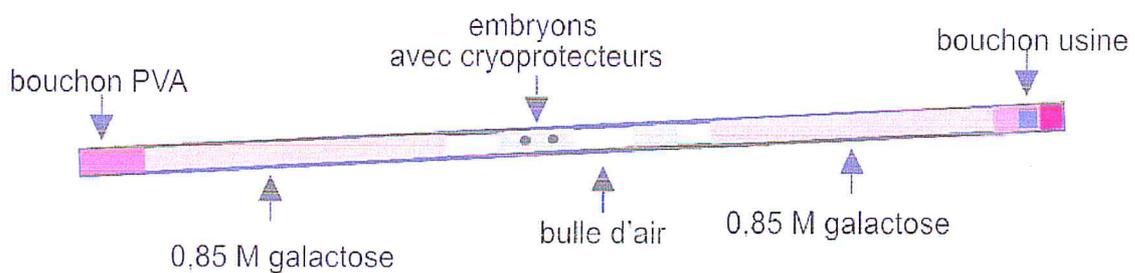
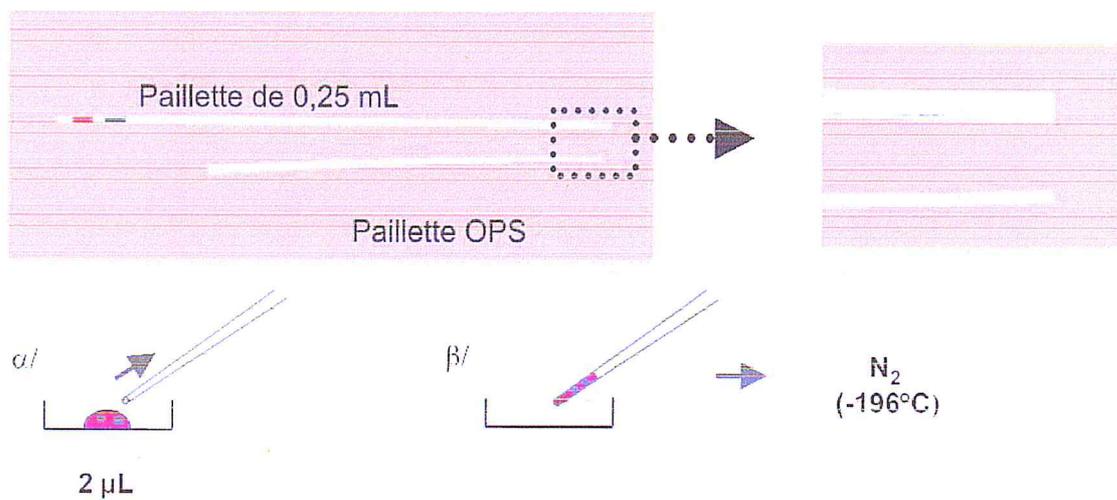


Fig 1.c OPS (paillette de 0,25 mL)



PVA : Polyvinylalcool ; OPS : open pulled straw ; N₂ : azote liquide.

α : Une goutte de 2µl de cryoprotecteurs avec les embryons est déposée au fond d'une boîte.

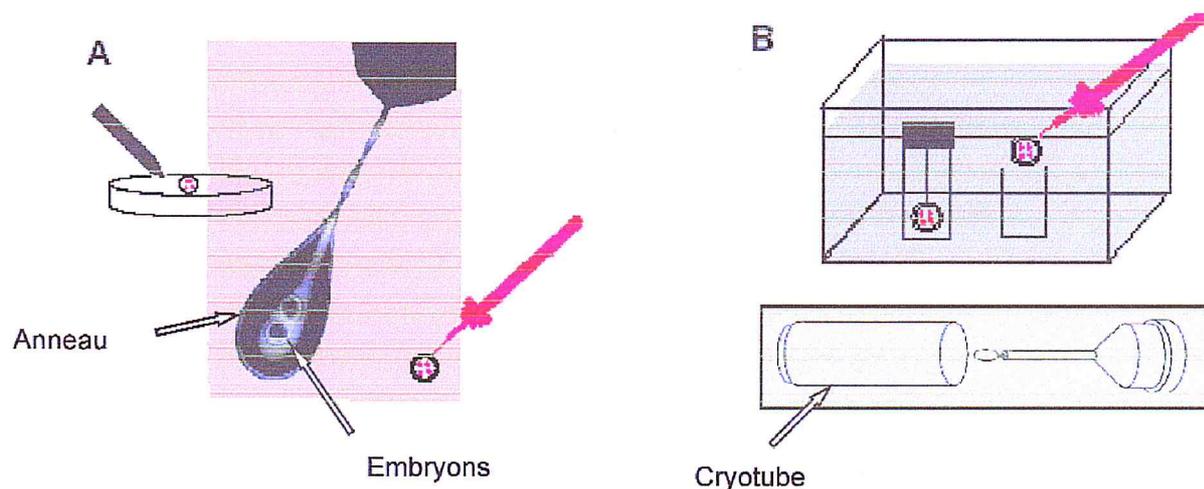
β : La goutte monte par capillarité au bout de la paillette, puis celle-ci est directement plongée dans l'azote liquide.

• **Technique cryoloop :**

La cryoloop est au départ un petit anneau de nylon utilisé pour la vitrification des protéines.

Elle a été adaptée à la cryoconservation des embryons et des ovocytes (Lane et al, 1999).

Pendant que l'embryon est dans le mélange de cryoprotecteurs de la première étape, l'anneau est trempé dans celui de la deuxième étape et il se forme un film de cryoprotecteurs à l'intérieur de l'anneau. Il est ensuite appliqué sur l'embryon qui «se colle» au film. Le tout est ensuite immédiatement plongé dans un cryotube préalablement refroidi dans l'azote liquide puis plongé dans l'azote liquide (Oberstein et al, 2001) (Voire figure3).



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

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

Figure 3 : technique cryoloop

4) Descente de température :

La descente en température est linéaire et très rapide dans les techniques de vitrification (Voire figure 4).

5) Avantages et inconvénients de la vitrification :

- **Avantages :**

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

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

- **inconvenients :**

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

Cette méthode est encore au stade expérimental pour les embryons porcins et équin. Chez les embryons bovins, caprins et ovins, la congélation lente est entrée dans la pratique, et donne des résultats très satisfaisant sur le terrain et similaire à la vitrification (Guignot, 2003).

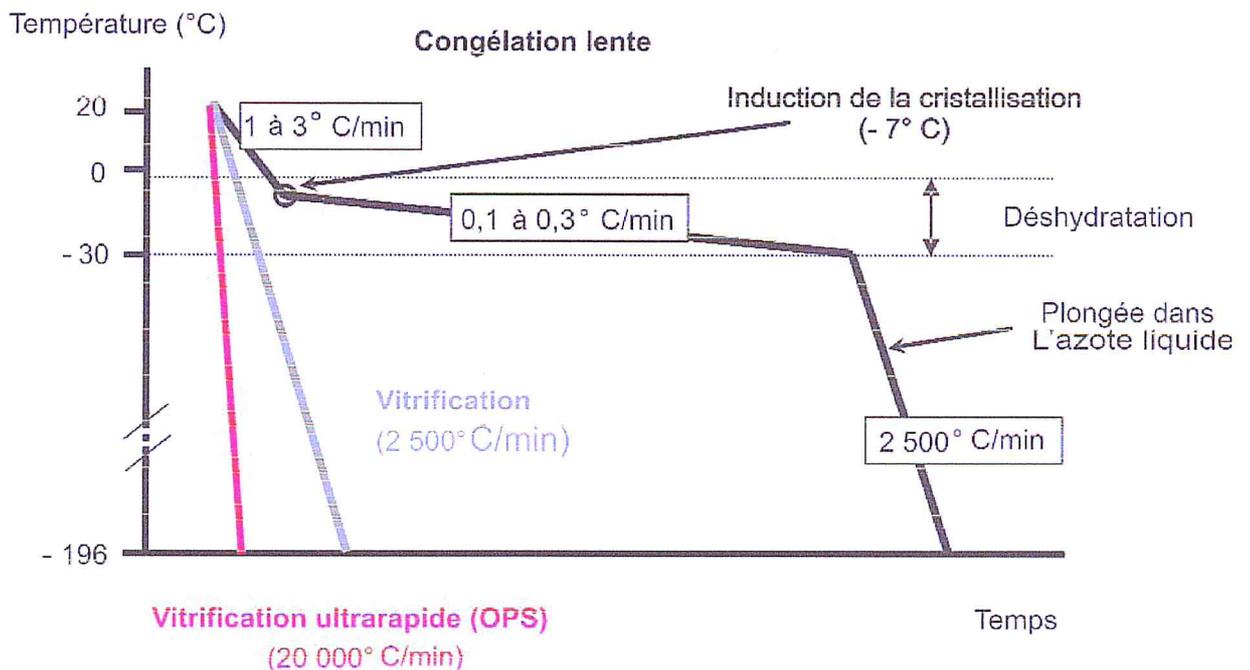


Figure 4 : descente de température.

II. La décongélation :

Il en existe deux types qualifiés de décongélation : Décongélation lente et décongélation rapide. Dans l'un et l'autre cas l'objectif est de soustraire l'embryon à l'action de l'agent cryoprotecteur utilisé pour la congélation et de le réhydrater.

Dans la décongélation lente (or multistep thawing) le contenu de la paillette est passé dans trois bains (5 minutes par bain) renfermant des concentrations décroissantes de glycérol (6,6 % ; 3,3% et 0%) et constantes de sucrose (0,3 M), le quatrième bain ne renfermant que du PBS et assure la réhydratation de l'embryon. Cette méthode requiert du temps (1 à 2 heures) et un minimum d'équipement de laboratoire. Elle peut requérir également un microscope pour observer la qualité de l'embryon décongelé.

Dans la décongélation rapide (or one-step thawing) la paillette est décongelée à la température ambiante (20°C). Cette décongélation rapide implique cependant l'utilisation lors du montage de la paillette et donc de sa congélation l'utilisation de sucrose. Pour ce faire, l'embryon est équilibré pendant une vingtaine de minutes dans une solution de glycérol 1,36 M et de sucrose 0,25M. Lors du montage de la paillette, on aspire successivement le sucrose 0,5 M (4cm), une bulle d'air, le mélange glycérol 1,36M et sucrose 0,25M renfermant l'embryon (1cm), une bulle d'air et le sucrose 0,5M (6cm).

La décongélation de la paillette assure le mélange des solutions et donc soustrait l'embryon au glycérol, la réhydratation de l'embryon étant assuré lors de sa mise en place dans l'utérus. Cette méthode offre de réels avantages sur le terrain puisqu'elle dispense le praticien d'avoir du matériel de laboratoire, le transfert ressemblant dans ce cas à une insémination classique (Hanzen-Ch, 2008-2009).

III. Transfert embryonnaire :

1. Introduction :

Le transfert d'embryons chez les bovins constitue un des moyens les plus rapides pour améliorer le potentiel génétique de production du troupeau.

En plus de la multiplication rapide des animaux de haute valeur génétique et de la réduction de l'intervalle entre générations (pression de sélection).

Cette technique, aujourd'hui couramment pratiquée, permet un gain de temps non négligeable dans la diffusion de la génétique. Quelques années plus tard, elle a été adaptée avec succès à l'espèce équine, en connexion avec l'INRA. De nombreux propriétaires ne voulant pas, par exemple, interrompre la carrière sportive de leur jument ont recours à cette technique et passent alors par des juments receveuses.

Après un quart de siècle d'existence, le transfert embryonnaire concerne aujourd'hui de nombreuses espèces parmi lesquelles le buffle, le chameau, le mouton, la chèvre, le porc, le lapin et d'autres (INRA).

2. Technique du transfert :

Le premier veau issu de transfert embryonnaire est né en 1951. Le transfert d'embryon a d'abord été mis au point par transposition des méthodes chirurgicales proposées par la recherche vétérinaire (Rowson *et al.*, 1969) et cette méthode a été utilisée en station, puis en ferme, jusqu'en 1980-1981. Cependant, cette technique étant lourde et contraignante, des travaux ont été menés à partir de 1975 à l'INRA afin de mettre au point une méthode entièrement non chirurgicale.

Cette technique dite cervicale, consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus par voie vaginale (Renard *et al.*, 1977), a été à l'origine du réel développement du TE. Les taux de gestation ont connu une augmentation spectaculaire dès les premières années d'utilisation (tableau 1). Dès 1981, des taux de gestation de l'ordre de 50 % ont en effet été obtenus en ferme, seulement inférieurs de 10 % à ceux obtenus par transfert chirurgical (Heyman, 1982 ; Nibart, 1982). Cette méthode, facile à mettre en œuvre, a largement contribué au développement de la transplantation embryonnaire, mais, depuis sa mise au point, les résultats ont finalement peu évolué et restent proches de 55 %. Cependant, depuis 1995, l'évolution de l'organisation des collectes et des transferts d'embryons (nombre de donneuses et de receveuses) et l'utilisation croissante de la congélation n'ont pas été favorables à l'amélioration des résultats après transfert des embryons à l'état frais. En effet il est noté un accroissement du nombre moyen de donneuses traitées pour être collectées le même jour et une diminution de la qualité moyenne des embryons transférés à l'état frais. Les embryons de meilleure qualité étant sélectionnés pour la congélation (Bourgoin *et al.* 2004)

Tableau 1 : évolution des taux de gestation après transfert d'embryons à l'état frais ou congelé.

Année	1975-1980	1979-1981	1990-2002	2000-2003
Technique	CHIR	CERV	Ethyène Gly	CERV-FERME
Embryons frais	37 % => 65 % (160) S 54,6 % (279) S	32 % (1391) F 20 % => 50 %	59,8 % (1727) 53,3 (4410) 55-61 % 68,3 % (9023)	55,8 % (5064)
Référence	Nibart, 1982	Nibart, 1982	Otter, 1994 Heyman, 1982 Lopes <i>et al</i> , 2001 Hasler 2001	UNCEIA, 2003 Ponsart <i>et al</i> , 2000
Embryons Congelés	35,2 % (85) S	32 % (1391) F 51,2 % (39) S	50,5 % (1236) 55,4 % (869) 48,1 %- 58,6 % (488) 56,1 (3616) 58,4 % (5297) 45,4 % (88)	49,1 % (4440TD)
Référence	Renard, 1982	Nibart, 1982 Renard, 1982	Nibart et Humblot 1997 Ponsart <i>et al</i> , 2000 Hasler 2001 Ponsart <i>et al</i> , 2000	UNCEIA 2003

S : Transfert réalisés en Station, F : Transferts réalisés en ferme, TD : Transfert direct,

Gly : Glycol

3. Etapes du transfert : « 5 étapes »

a. Superovulation :

Elle est induite grâce à l'injection 2 fois par jour pendant 4 jours de préparations contenant des hormones gonadotropes, FSH essentiellement, issues d'extraits purifiés d'hypophyses de porc et dont l'innocuité a été contrôlée.

En moyenne, le nombre d'ovulations observées après de tels traitements FSH est de l'ordre de 12, mais il y a une très grande variation individuelle qu'il est encore impossible de prévoir (écart de 0 à 50 ovulations). Près d'un cinquième des femelles n'auront pas une quantité d'ovulations suffisante pour espérer obtenir un veau (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

b. Collecte des embryons :

Elle s'effectue au 7^{ème} jour environ après insémination de la femelle donneuse. 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 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 (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

c. L'appréciation de la qualité des embryons :

Elle est indispensable pour juger des espérances de la fertilité et s'assurer des qualités sanitaires requises. Les embryons sont placés sous une loupe et leur qualité est estimée selon leur aspect morphologique en fonction du délai d'insémination et en fonction de l'intégrité de la membrane pellucide qui entoure l'embryon.

Il existe une grille internationale de notation, réalisée par l'IETS (International Embryo Transfer Society), codant la qualité des embryons de 1 (excellent, bon) à 4 (dégénérés ou ovocytes non fécondés) (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

d. Lavage et conservation des embryons :

Le lavage des embryons dans 10 bains successifs de solution tamponnée est obligatoire. Il garantit ainsi aux éleveurs des embryons exempts de germes pathogènes.

Ces embryons lavés sont ensuite conservés à température ambiante pendant un court délai avant leur transfert, ou conservés à température de réfrigération (+2°C, max une journée) ou dans l'azote liquide à -196°C. Dans ce dernier cas, l'embryon est conservé dans un milieu contenant un cryoprotecteur.

Depuis 1995, on utilise une méthode de congélation à base d'éthylène glycol comme cryoprotecteur, permettant le transfert direct de l'embryon en receveuse après décongélation.

Cette méthode, actuellement la plus répandue, ne nécessite pas la manipulation des embryons. Le transfert direct peut être réalisé par des techniciens spécialisés, des inséminateurs par exemple (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

e. La mise en place des embryons :

Les embryons sont remis en place individuellement dans l'utérus d'une femelle dite receveuse dont on a maîtrisé la plus souvent le cycle sexuel de façon à être parfaitement synchrone avec celui de la donneuse.

Le transfert se fait le plus fréquemment par la voie dite cervicale ou naturelle, en introduisant le pistolet de transfert par le col de l'utérus. Il peut être aussi réalisé par voie chirurgicale, par un vétérinaire d'une équipe de transfert agréée (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

4. Intérêt du transfert embryonnaire : « double intérêt »

- **Sur le plan génétique :**

Le transfert embryonnaire est étroitement associé à la filière de la sélection bovine, puisque en France près de 95% des taureaux laitiers actuellement mis en testage sont issus de transfert d'embryons. La technique contribue à augmenter plus de 70% la prolificité des femelles qui répondent le mieux au traitement.

Elle permet également de réduire notablement l'intervalle de génération puisque les collectes précoces sont possibles sur des génisses de 15 mois.

Ces deux facteurs contribuent à augmenter le progrès génétique de 20 à 30% pour un critère comme la production laitière (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

- **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 de vérifier que toutes les procédures garantissant la qualité sanitaire des embryons sont respectées (Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)).

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

I. Introduction :

La congélation des embryons a permis des échanges nationaux et mondiaux de matériel génétique, à conserver la diversité génétique des races domestiques et à gérer de façon plus économique des receveuses (**INRA, prod. Anim. 1998**).

Les premiers essais de transfert d'embryons après congélation par les méthodes classiques (congélation lente, utilisation du glycérol ou du DMSO comme cryoprotecteur, dilution en plusieurs étapes) réalisés avant 1980 ont permis d'obtenir dans un premier temps des taux de gestations généralement de l'ordre de 30 à 40%. La dilution du cryoprotecteur en une seule étape dans une solution de sucrose au moment des opérations de décongélation (**Renard, 1982**) a représenté au début des années 1980 un apport décisif permettant en outre le conditionnement des embryons congelés en paillettes et une mise en place par voie cervicale s'apparentant à celle de l'insémination artificielle.

II. Objectif :

L'objectif de notre travail consiste à utiliser des embryons produits en ferme pour la réalisation d'un transfert en frais, dans un premier temps puis de congeler les meilleurs embryons en fonction de la disponibilité des receveuses en vue d'un transfert ultérieur.

III. Matériel :

1. Matériel biologique :

L'étude a été effectuée dans la ferme de **Mr. EZZRAIMI MOHAMED** qui se situe dans la cité **SIDI YAHIA, CHIFFA**, wilaya de **BLIDA**, elle regroupe 100 vaches laitières en lactation, 50 en tarissement, 60 génisses et 20 vèles, notre travail à durée une année (2009-2010).

• Les embryons:

Les embryons utilisés ont été choisis en fonction de leur qualité, nous n'avons retenu que ceux de classe 1 et 2. Ces embryons sont au nombre de 53 (toutes classes confondues) et ont été obtenus en majorité dans le cadre d'un autre travail de PFE (**EZZERAIMI et KHALADI 2010**).

- **Le choix des receveuses :**

Les receveuses sont au nombre de 6 représentées par des génisses et des primipares, leurs notes corporelles varient entre 3 et 3,5; indemnes de toutes maladies infectieuses (brucellose, tuberculose, IBR...) et infections gynécologiques.

2. Matériel de collecte, de transfert et de congélation des embryons :

- Une sonde souple avec mandrin métallique (**sonde de type Folley**), la sonde est à double voies, une voie pour gonfler le ballonnet située à 5cm de l'extrémité et d'une voie d'injection et de la récupération du liquide de lavage des cornes utérines.
- Chemises sanitaires pour protéger la sonde.
- PBS (Phosphates Buffered Saline) sous forme de liquide, représenté sur des boites de 500 ml, fourni par la société IMV.
- Milieu de conservation des embryons, PBS enrichi avec 4% de BSA, d'antibiotiques et antifongiques.
- Un milieu de congélation.
- Seringues de 50ml qui servent à administrer et récupérer le liquide de lavage de la corne.
- 02 bouteilles stériles d'un litre qui permettent de contenir le liquide de lavage, chaque corne récoltée est versée dans une bouteille.
- Un dilateur cervical.
- Un désinfectant sous le nom de biocide, pour désinfecter le matériel.
- Alcool chirurgicale.
- Anesthésique locale, Xylocaine à 2%.
- Boites de pétries carrées et rondes quadrillées, pour la recherche des embryons.
- Microscope inversé pour la mise en évidence des embryons.
- Une paille montée sur une seringue à insuline qui permet la manipulation des embryons.
- Un biocongélateur programmable.
- Deux pinces hémostatiques, une pour boucher la voie du gonflement du ballonnet et l'autre pour fixer le gant du fouiller rectal à la blouse au niveau de l'épaule.

- Le bistouri pour le rasage des poils.
- Porte bistouri.
- Seringues de 10ml qui servent à gonfler le ballonnet et injecter la Xylocaine et la prostaglandine après la récolte.
- La colle polyvinyle pour souder la paillette contenant l'embryon.
- L'azote liquide pour la congélation des embryons.
- Marqueurs pour marquage des paillettes.
- Echographe.

IV. Méthode :

1 .La récolte des embryons :

La récolte des embryons se fait le 07^{ème} jour après insémination artificielle, en suivant ces étapes :

- ❖ On fait une exploration rectale pour compter le nombre de corps jaune au niveau des deux ovaires.
- ❖ On administre 5ml d'anesthésie épidurale basse avec la Xylocaine 2% entre le 1^{er} et le 2^{ème} espace intercoccygien.
- ❖ On désinfecte la région vulvaire avec le biocide ; on couvre la sonde de récolte avec une chemise sanitaire.
- ❖ On introduit la sonde par voie vaginale, une fois on arrive à l'entrée du col, on tire la chemise sanitaire puis on continue vers une des cornes.
- ❖ A 5cm après l'entrée de la corne, on fait gonfler le ballonnet pour assurer le maintien de la sonde contre le col de l'utérus et l'étanchéité du système.
- ❖ On administre 15ml d'air et on bouche la voie d'injection d'air par une pince hémostatique.
- ❖ On envoie le PBS avec des doses croissantes : deux fois 20ml, 30ml, 40ml et 50ml ; en dernier lieu une fois 20ml avec 30ml d'air.
- ❖ Toutes les injections sont récupérées dans une bouteille stérile d'un litre.
- ❖ On refait la même opération pour la deuxième corne et on récupère les injections dans une autre bouteille.
- ❖ On dégonfle le ballonnet et on tire la sonde.

- ❖ Comme dernière étape, on administre la prostaglandine et de l'antibiotique intra utérine.

Pour la recherche des embryons, on laisse les bouteilles un temps pour que les embryons décante. Après, on aspire 150ml du surnageant par un fin tuyau et on le récupère dans un bêcher. Ensuite, on met le culot dans les boites de pétrie quadrillées et l'embryon est recherché a la loupe binoculaire (grossissement de la loupe binoculaire réglé sur x10 ou x12). Une fois on trouve un embryon, on l'aspire avec une paillette montée sur une seringue à insuline et on le met dans un milieu de conservation. On garde juste les embryons du 1^{ère} et 2^{ème} classe et on élimine ceux de la 3^{ème} classe, dégénérés et les non fécondés.

2 .La cryoconservation :

Les embryons congelés sont ceux de 1^{ère} et 2^{ème} classe ; car dans ce travail, on considère ces deux classes comme transférables.

Après avoir sélectionné les embryons, on les regroupe dans une boite de pétrie qui contient un milieu de congélation (Ethylène glycol).

Par ailleurs, on place chaque embryons dans une paillette montée sur une seringue d'insuline ; en aspirant : une petite quantité de milieu de conservation, de l'air ; ensuite l'embryon dans son milieu de congélation, puis de l'air; et enfin une autre fois le milieu de conservation et on ferme la paillette avec une **colle polyvinyle**.

Il faut remplir le biocongélateur avec l'azote liquide, et régler à -7°C jusqu'à stabilisation. Après, on dépose les paillettes dans le biocongélateur pendant 5min à -7°C.

Pour la cristallisation; on prend la pince métallique prévu a cet effet et plongé dans l'azote, en touchant les deux extrémités de la paillette (sans toucher l'embryon); puis on laisse se stabiliser pendant 10min à -7°C. Ensuite, on presse le bouton « Post seeding » et on laisse la température baisser jusqu'à -35°C à raison de 0.3°C/min. Une fois la température escomptée atteinte (-23 °C); on plonge les paillettes dans l'azote liquide.

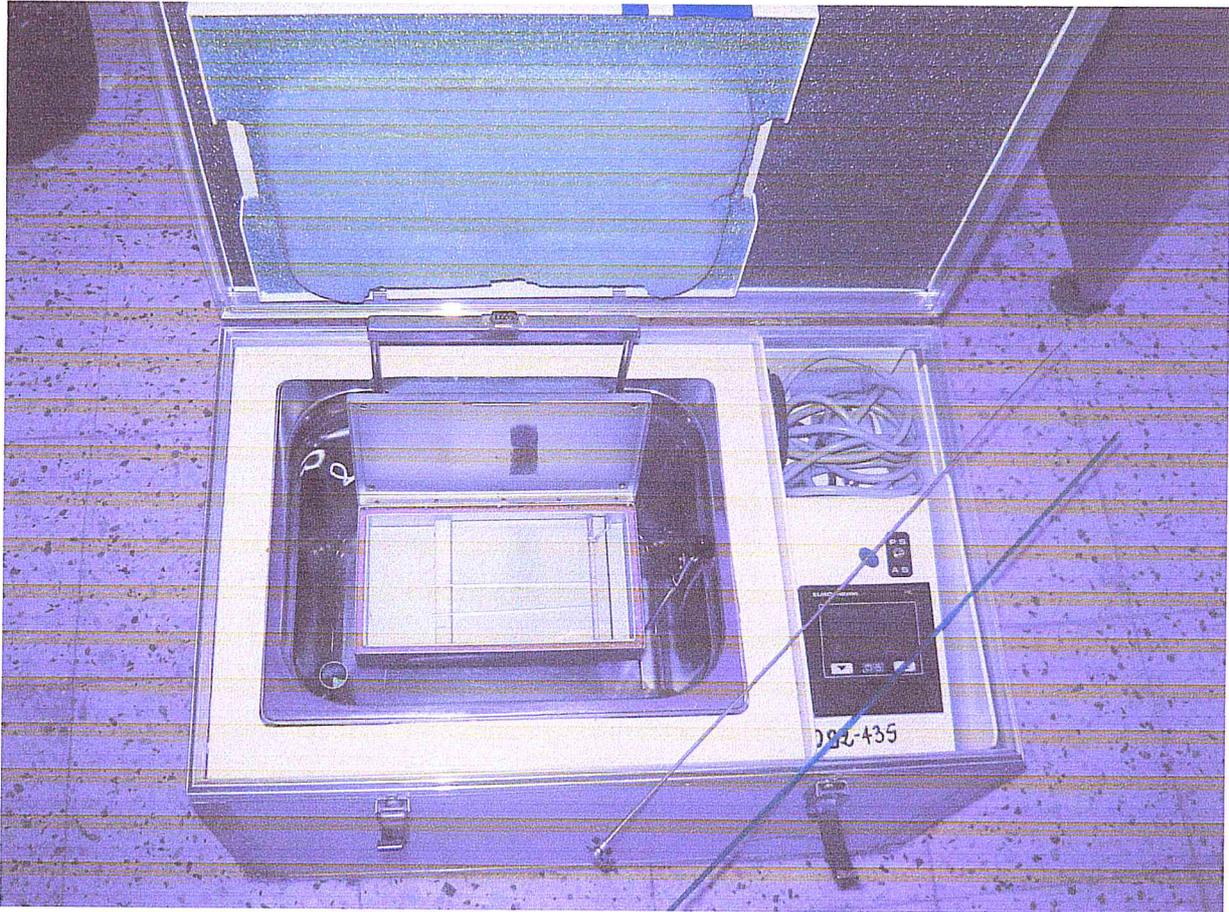


Photo 1 : le biocongélateur.

3. La décongélation :

On prend les paillettes et on les plonge une par une dans l'eau tiède à 35°C pendant 25 à 35 sec. Il faut vérifier la présence de l'embryon dans chacune de ces paillettes ainsi que leur état.

4. Transfert :

Après préparation des receveuses, sur chaleurs naturelles ou par hormones; on met la paillette dans un pistolet de transfert et on la dépose dans la moitié de la corne dont l'ovulation s'est effectuée.

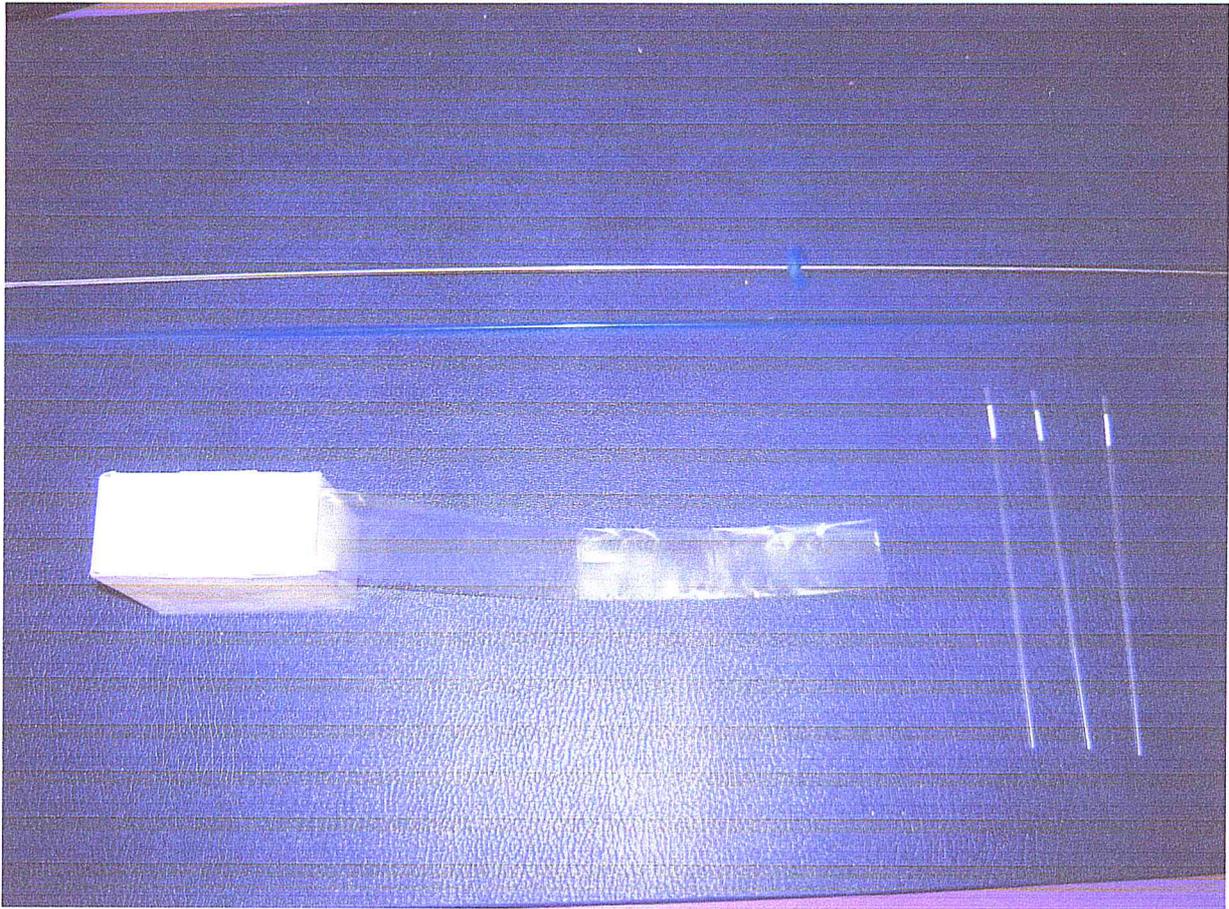


Photo 2 : sonde de transfert.

V. Les résultats :**1. Les résultats de récolte :**

On a arrivé à faire 11 récoltes pendant notre étude expérimentale et on a obtenu 53 embryons dont 14 sont transférables.(on a perdu 2 embryons lors de la manipulation)

Tableau 2 : Les récoltes et les embryons obtenus pendant l'étude.

Numéro de vache	Nombre de récolte	Nombre total d'embryons récoltés	Nombre d'embryons transférables
Vache 1	03	19	02
Vache 2	02	21	08
Vache 3	03	05	03
Vache 4	03	08	03
Total	11	53	16

On a obtenu en moyenne 2,75 récoltes par vache et 4,81 embryons par récolte dont 1,45 embryon transférable par récolte.

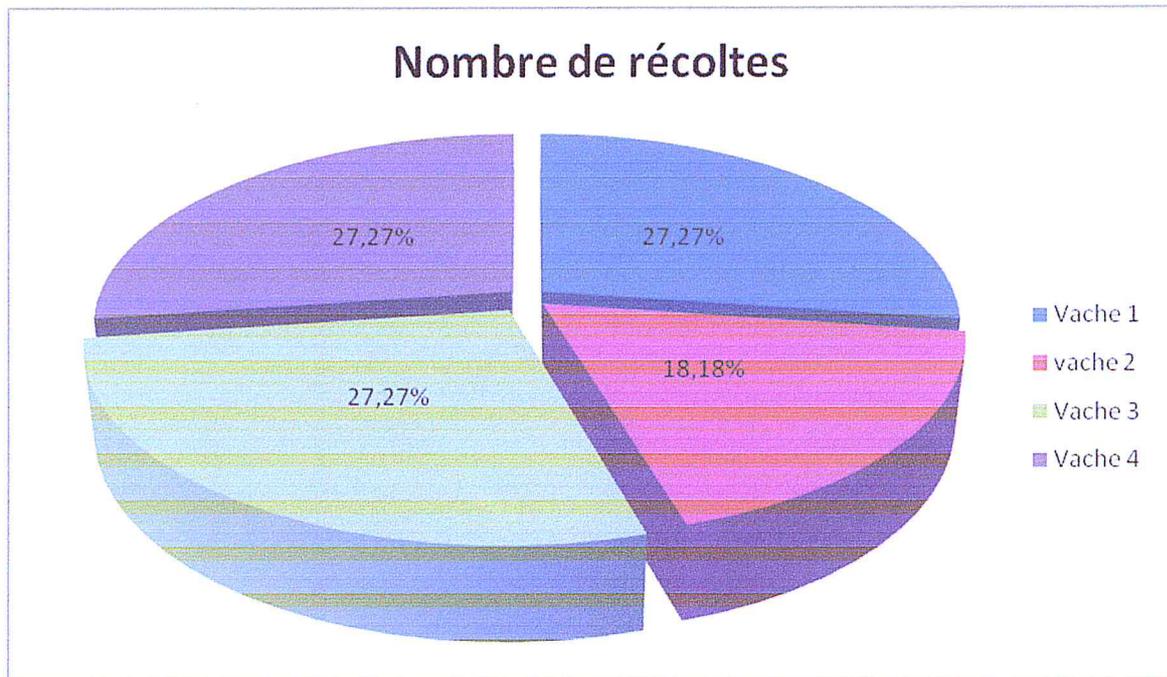


Figure 5 : Les récoltes

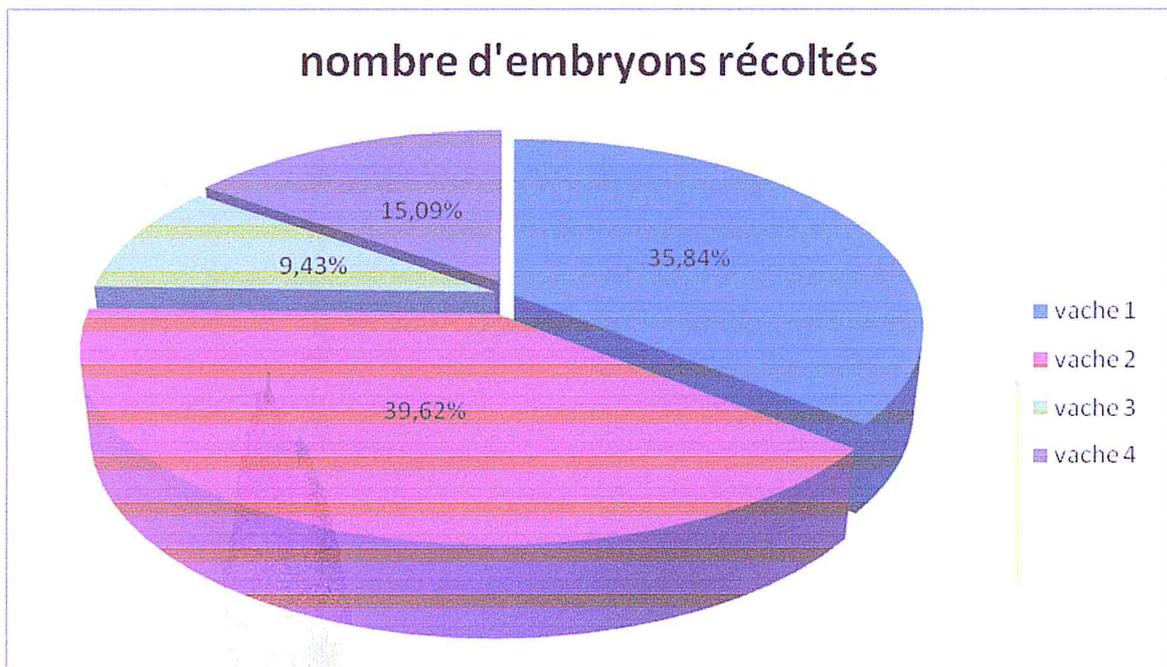


Figure 6 : Nombre des embryons récoltés

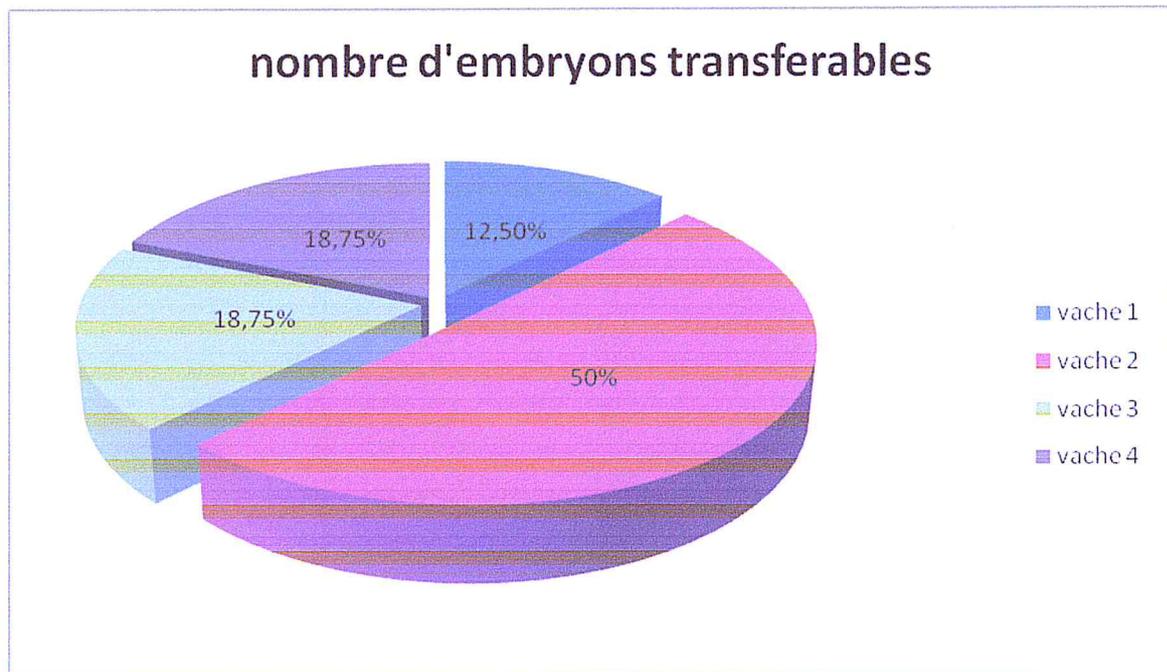


Figure 7 : nombre d'embryons transférables

2. Résultats de recherche des embryons :

La recherche des embryons se fait sous microscope binoculaire inversé et suivie par leur classification.

Tableau 3 : appréciation de la qualité des embryons.

Classe des embryons	Nombre	Pourcentage
Classe 1	02	04%
Classe 2	12	23%
Classe 3	10	19%
Dégénéré	21	39%
Non fécondé	08	15%
Total	53	100%

Après classification des embryons ; sur les 53 embryons, on a eu 27% embryons transférables (classe 1 et 2).

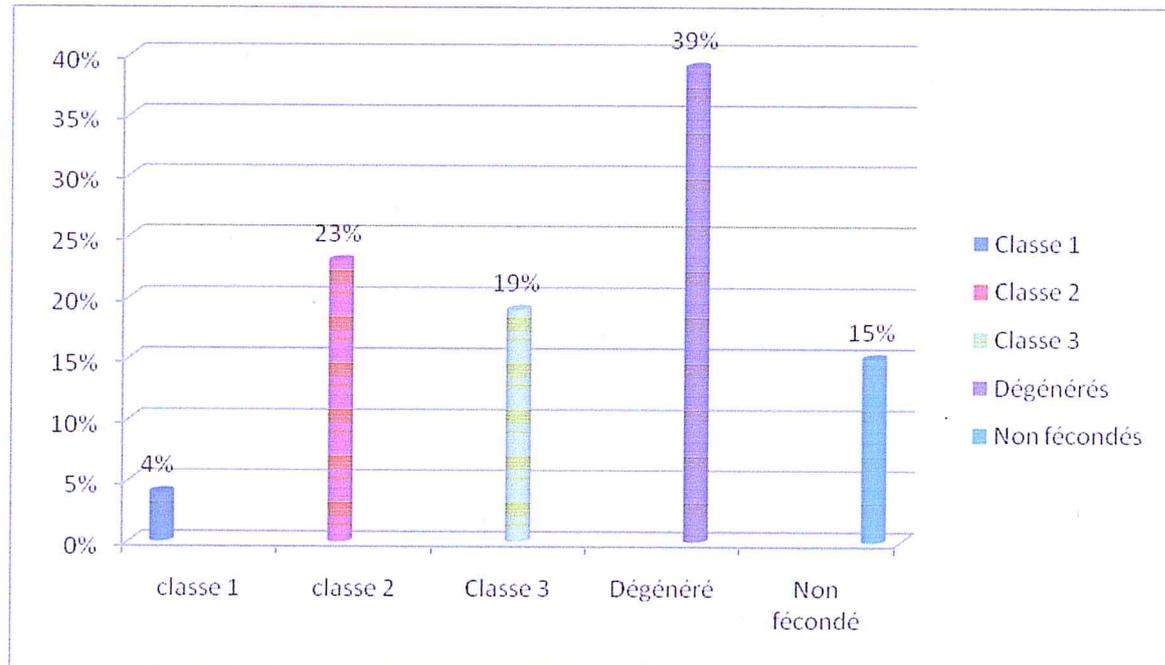


Figure 8 : Classification des embryons

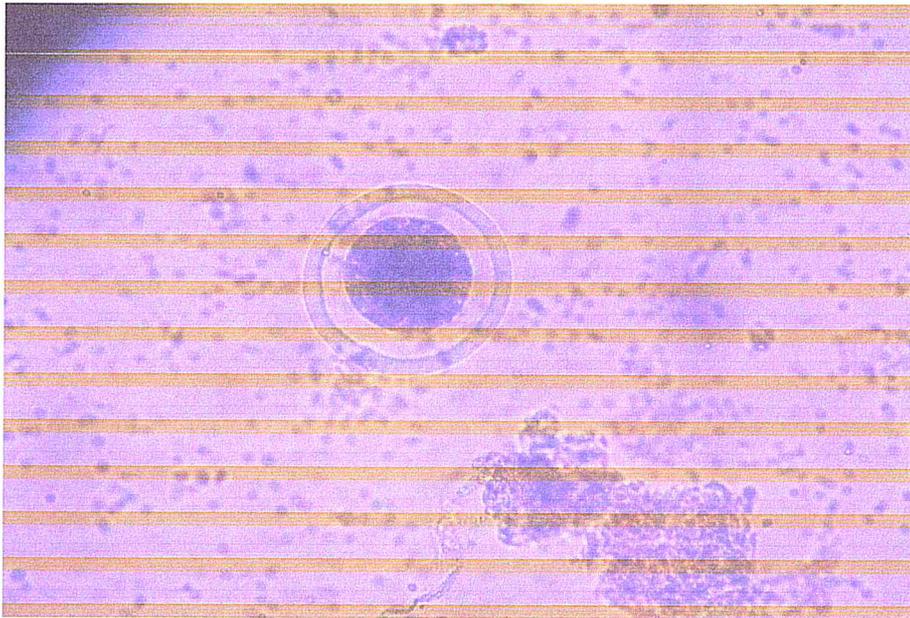


Photo 3 : embryon non fécondé

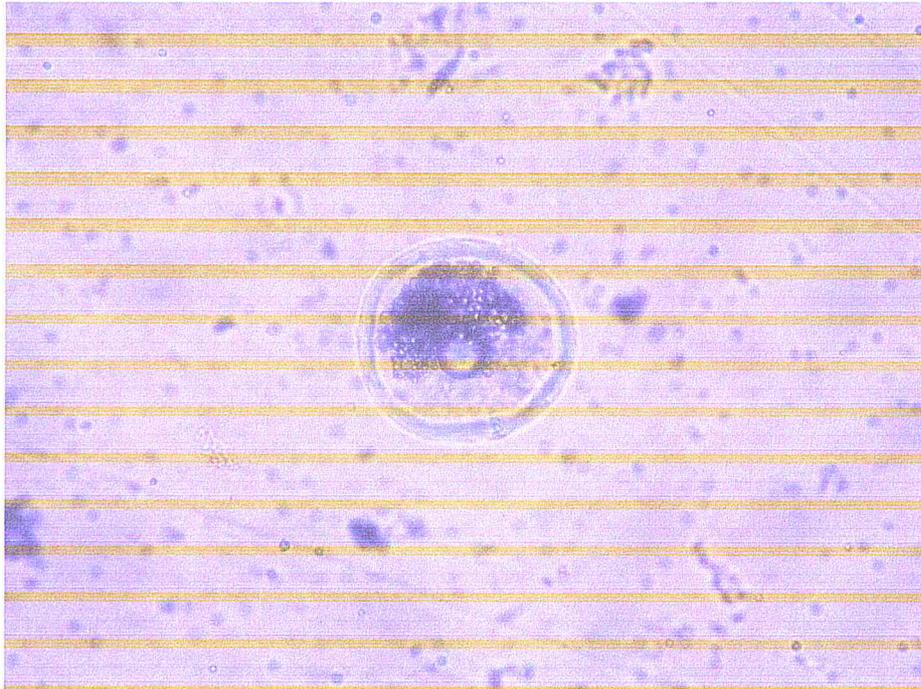


Photo 4 : embryon dégénéré

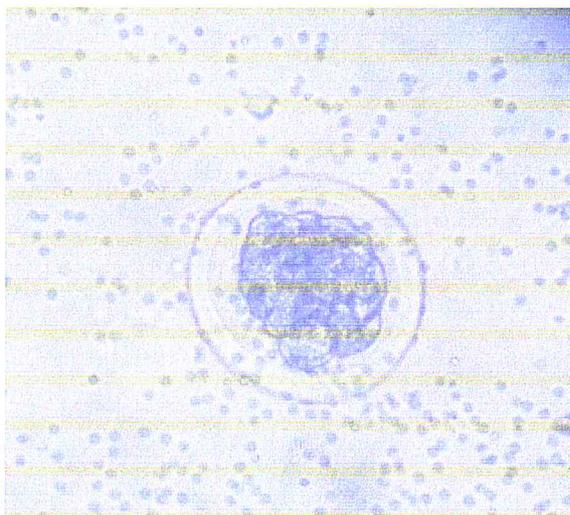


Photo 5 : Morula (classe 1)

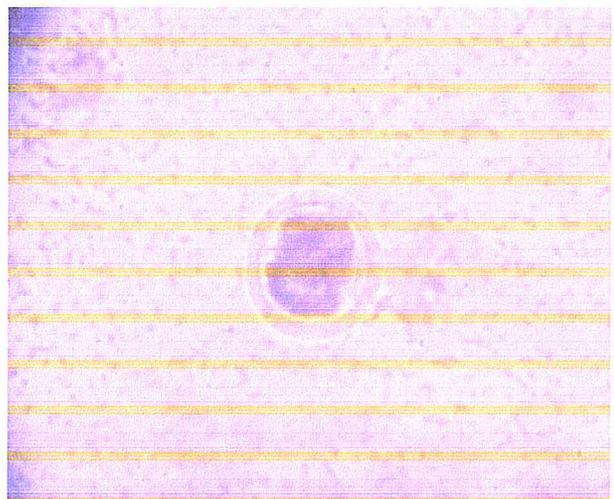


Photo 6 : Jeune Blastocyste

3. Résultats après classification des embryons :

On a pris en considération les embryons de classe 1 et 2 comme embryons transférables, et les autres classes d'embryons comme non transférables.

Tableau 4 : Embryons obtenus

Numéro de vache	Nombre d'embryons		
	Transférable(s)		Non transférables
	Transféré(s)	Congelé(s)	
Vache 1	0	2	17
Vache 2	3	5	13
Vache 3	1	1	4
Vache 4	1	1	5
Total	5	9	39
	14		

Sur les 14 embryons transférables, on a congelé 9 embryons et transféré 5 en frais.

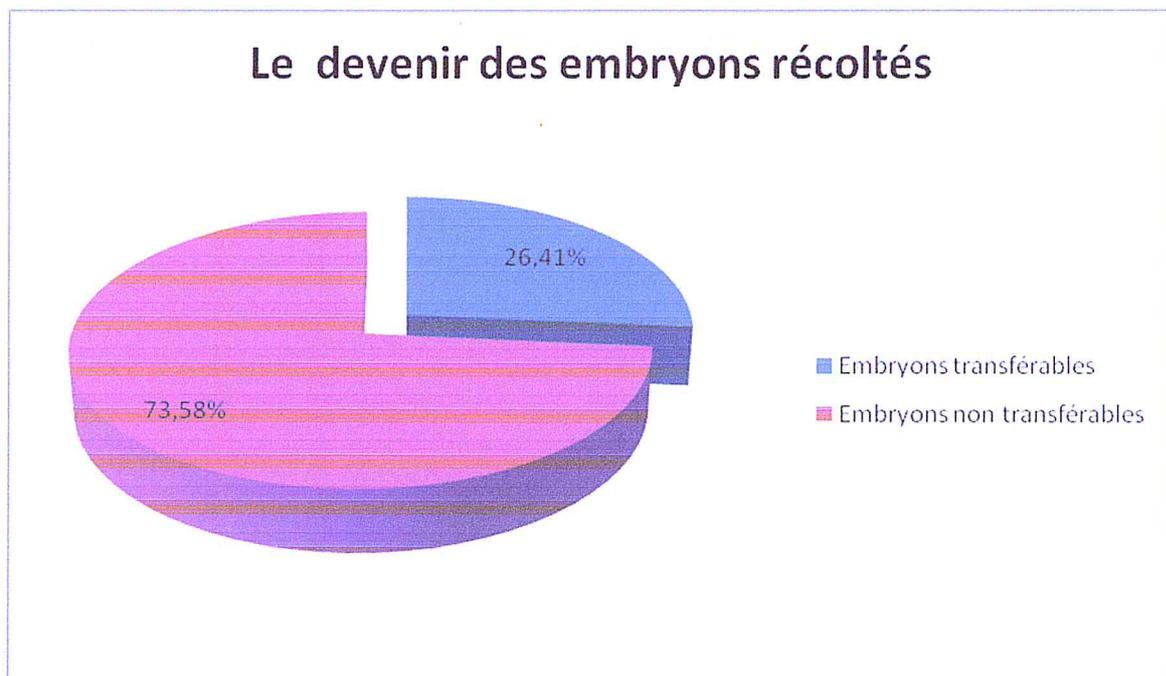


Figure 9 : Le devenir des embryons récoltés

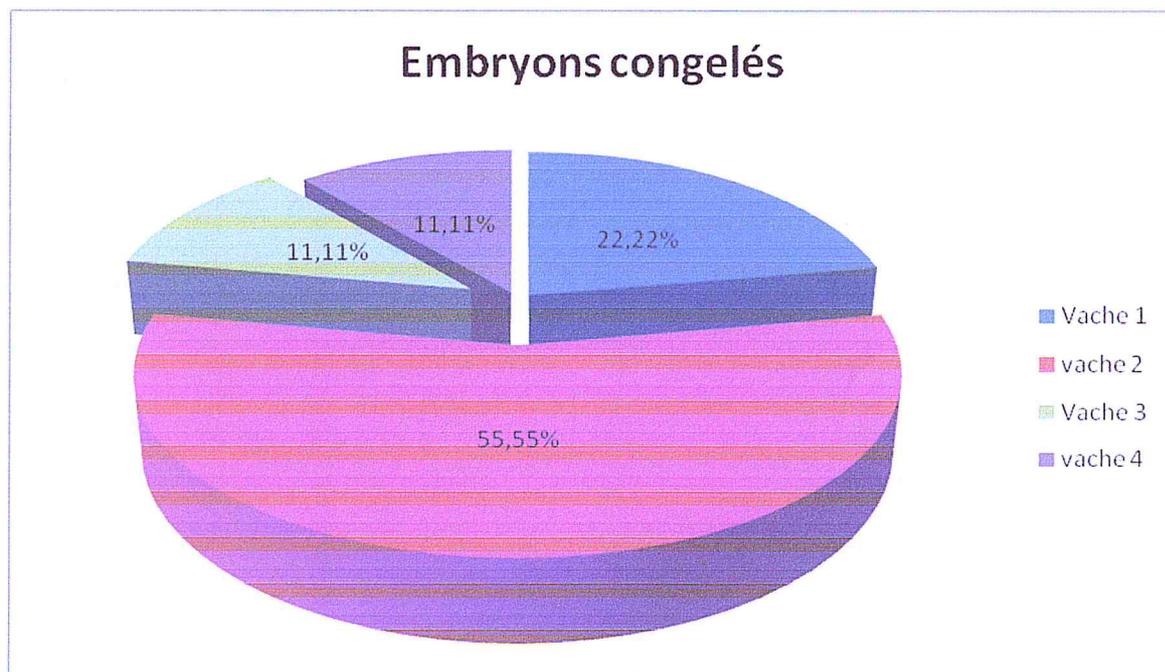


Figure 10 : Embryons congelés

4. Résultats du transfert :

Les embryons transférés sont : deux embryons de classe 1 et quatre embryons de classe 2. Le diagnostic de gestation a été effectué par échographe au 56^{ème} jour après le transfert.

Tableau 5 : Transfert et diagnostic de gestation

Vaches receveuses	Classe d'embryons transférés	Diagnostic de gestation Par échographe à j 56
01	Classe 1	+
02	Classe 1	-
03	Classe 2	+
04	Classe 2	-
05	Classe 2	-
06	Classe 2	-

Le taux de gestation en frais est de 33,33%.

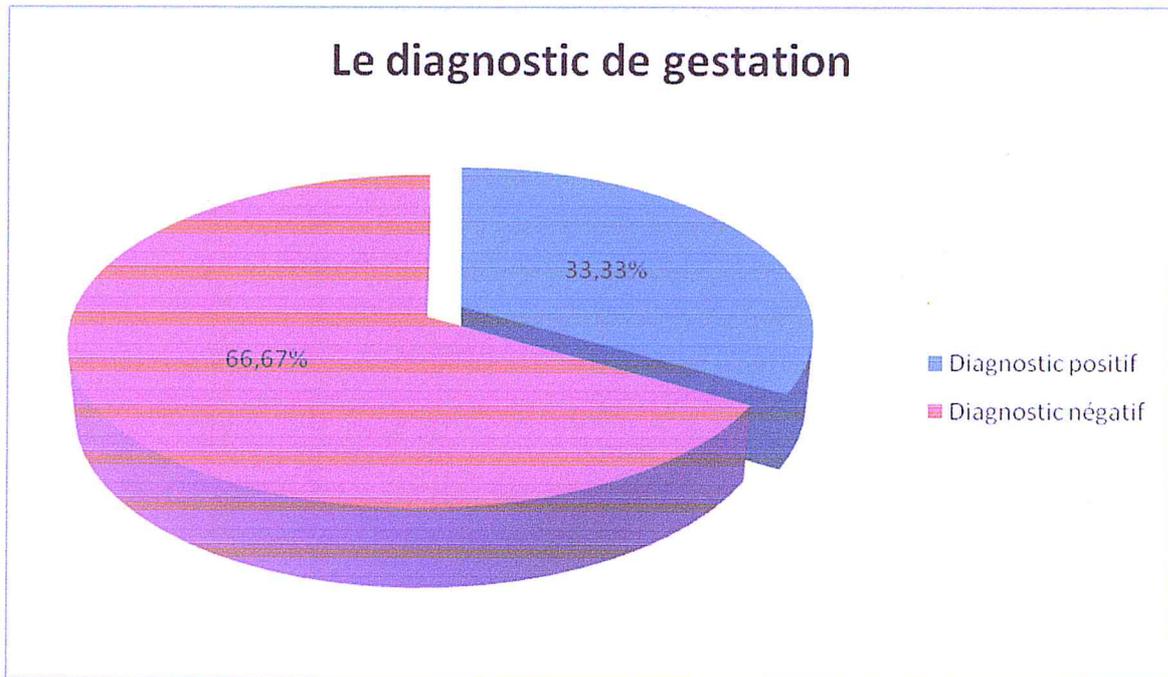


Figure 11 : Le diagnostic de gestation

5. résultats après décongélation :

Sur les 09 embryons congelés aucun n'a pu être transféré car après décongélation nous avons remarqué qu'aucun d'eux n'était viable. Les embryons décongelés ont présenté des déformations de leur zone pellucide ainsi qu'une désorganisation et parfois un éclatement des blastomères.

Discussion :

Il est important de signaler que ce travail est réalisé pour la première fois en Algérie en ferme privée après les travaux réalisés en station (Adel 2003 ; Ferrouk et all 2004).

Pendant notre travail, nous avons eu un nombre total de 53 embryons et une moyenne de 4,81 embryons par récolte et 16 embryons transférables avec une moyenne de 1,45 embryon transférables/vache ce résultat est inférieure à celui cité par après Nibart, 1982, Ponsart et al., 2003 (source AETE) qui est passer de 5,4 embryon/collecte en 1981 à 9,7 embryons par collecte en 2002 et de 3,4 embryons viables/collecte en 1981 à 5,6 en 2002. Ce résultat est probablement du aux conditions d'élevage et à une alimentation déséquilibrée en effet Negro et al., 1997 ont montré aussi l'effet d'environnement dans les élevages et l'alimentation comme un effet défavorable sur la réponse des donneuses. En général la répétition des traitements se traduits par une diminution de la production d'embryons, l'augmentation du rang de collecte à pour effet une baisse significative du nombre d'embryons transférables et une augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés et du nombre d'embryons dégénérés (Nibart et Humblot, 1997).

Pour les classes d'embryons on a trouvé différentes classes, les classes 1 et 2 à 4% et 23% respectivement, les dégénérés à 39% et les non fécondés à 15% ; dans notre travail on a considérés les deux premières classes comme transférables à 27% alors que Ponsart, 2000, le taux des embryons viables est de 57% en 2002.

Concernant les transferts en frais nous avons obtenu un taux de gestation de 33,33% c'est il est proche des résultats obtenu par Nibart en 1982 qui a eu un taux de 32%, mais loin des résultats obtenu au cours de travaux plus récents comme les résultats de Otter en 1994 qui a eu un taux de 59,8% et le taux 68,3% obtenu par Hasler en 2001. Ce faible taux peut être expliqué par les déséquilibres alimentaires en faveur d'une alimentation riche en concentré.

Après décongélation des 9 embryons on a constaté qu'aucun d'entre eux n'était viable, cette détérioration a peut être été causé par l'allongement du délai entre la récolte et la congélation en effet le temps de recherche les embryons sous microscope et la mise en paillette à pris plusieurs heures, ce temps d'attente est dû au manque de moyens mis à

notre disposition. L'altération des embryons peut être aussi due au fait que nous n'avons pas pu réaliser le lavage des embryons tel qu'il a été recommandé par l'AETE (10 bains successifs dans une solution tamponnée afin de garantir des embryons exempts de germes pathogènes).

CONCLUSION

Conclusion :

Le transfert embryonnaire reste la biotechnologie de l'embryon la plus utilisée dans les schémas de sélection. Au cours de notre travail nous avons pu réaliser dans les conditions du terrain des transferts en frais, malgré le faible nombre les résultats restent encourageants puisque nous avons pu obtenir deux gestations. La congélation présente encore quelques lacunes, principalement en ce qui concerne les milieux utilisés. Ce travail est essentiel pour la maîtrise des différentes étapes du transfert embryonnaire et de leur application sur le terrain notamment la congélation qui nous permet en plus de la conservation des embryons les échanges commerciaux locaux et internationaux.

RECOMMENDATIONS

Recommandation :

Après avoir réalisé notre travail nous avons noté quelques lacunes qu'il faudrait combler dans les travaux avenir nous recommandons ainsi les points suivants :

- Refaire le même travail sur un cheptel plus important.
- Mettre à la disposition des chercheurs le matériel adéquat
- Fournir les milieux de conservation et de congélation adéquats.
- Insister sur la préparation des donneuses et des receveuses.
- Organiser des cycles de formation pour les éleveurs pour la maîtrise de la conduite d'élevage et d'alimentation.
- Vulgarisation de la technique auprès des éleveurs afin d'en faire une pratique courante dans l'élevage bovin.

Références bibliographique :

- AETE: Association Européenne de Transfert Embryonnaire, 2006.
- Amstrong DT .1993. Recent advances in superovulation of cattle .theriogenology 39:7-24
- Betteridge, K.J. and Fléhan ,J.E/ (1988).the anatomy and physiology of reimplantation embryo. Theriogenology.29, 155-187.
- Bourgoin G., Quinton H., Rohou A. *et al.* 2004. *Reprod., Fert. and Dev.*,16,207.
- Crozet, N..Ultrastructural aspects of in vivo Fertilization in the cow .Gamete Res..(1984)10, 241-251.
- Derivaux .J et Ectors .F ,1980 _Physiologie de la gestation et obstetrique vétérinaire : Les éditions du point vétérinaire :pp :76 .
- Driancourt M.A . Et Fry Roc1992.Effect of superovulation with Pfsh or PMSG ou growth and maturation of ovulatory follicules in sheep. *Anim .Reprod .su .27:279-292.*
- Driancourt M.A, Gogeon A,D Rouge, Thobault C (1991). La fonction ovarienne .la reproduction chez les mammifères et l'homme .E. Marketing. Paris, France. Ministère de la Recherche et de la technologie @IST : 273-298.
- Drion P.V.,Beckers J.F., Ectors F.J.,Henzen C., Houtain J.Y., Lonergan P. (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogenèse et atresie. *Le point vétérinaire.28,numéro spécial, 881-891.*
- Erickson B. M,1966 .Developpement end radio-response of the prenatal bovine ovary. *J.reprod. Fert., 10,97-105.In:Drion et al, 2000. Anim.2000. Anim. Méd .144:385-404.*
- Fontaine, 1995. VADE_MECUM du vétérinaire .XV éditions.
- Gandolfi, Brevini, T.A.L,Modina, S , Bianchi, R and Passoni, L.(1993). Role of the oviduct during early embryogenesis. *Repro .Dom. Anim. 28,189-192.*
- Gordon (1994). *Laboratory production off cattle embryos* Wailingford. University Press.

-Guignot, F. (2003) Le point sur la cryoconservation des embryons. *dans Biotechnologies de la Reproduction :quoi de neuf, Association pour l'Etude de la Reproduction Animale, Maison-Alfort, France. 77-88.*

-Guthrie HD, Grims RW, Cooper BS, JM Hammond (1995):Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *Journal of Animal science*73:2834-2844.

-Hasler J., 2001. *Theriogenology*, 56,1401-1415.

-Henzen Ch, Lourtie O,Drion P.V.2000 .Le développement folliculaire chez la vache . Aspect morphologique et cynétique. *Anim . Méd. Vét .2000, 144,223-235.*

-Henzen Ch, La production d'embryon in vivo dans l'espèce bovine (2008-2009).

-Heyman Y., 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 105-111.

-Hochi, S., Fujimoto, T. et Oguri, N. (1995) Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 113-117.

-Hulshof S.C.J. Figueredo J.R.,Beckers J.F., Bevers MM, Ven Den Hurk R.1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries, *Vet. Quartely*, 16, 78-80.

-Hunter, R.H.F., Experimental studies of sperm transport in sheep, cows and pigs *Vet. Rec. , (1985) 116, 118.*

-INRAP, 1988. Institut national de recherche agronomique et production.

-INRA, Jouy_en _Josas : laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire. Domaine de Vilvert, 78352 Jouy_en _Josas cedex.

-INRA, Unité Expérimentale de Bressonvilliers 91630 Leudeville.

-INRA_Tours : Laboratoire de physiologie de la reproduction des mammifères domestiques 37380 Nouzilly.

-Kolb, 1975. Physiologie des mammifères domestiques.

- Lane, M., Bavister, B.D., Lyons, E.A. et Forest, K.T. (1999) Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature* 17, 1234-1236.
- Lopes RF., Forell F., Oliveira AT., Rodrigues JL., 2001. *Theriogenolog*, 56, 1383-1392.

- Lussier JG ;Motton P, Duffour JJ : Growth rates of follicules in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987.81: 301-307.

- Nibart M., 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 113-119.

- Nibart, M., Humblot, P., 1997a. In COMBARNOUS Y., VOLLAND-NAIL P. (Editors), Les gonadotropines. INRA Editions ed., Paris. 377-394.

- Oberstein, N., O'Donovan, M.K., Bruemmer, J.E., Seidel, G.E., Jr., Carnevale, E.M. et Squires, E.L. (2001) Cryopreservation of equine embryos by Open Pulled straw, Cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 55, 607-613.

- Otter T., 1994. In Merieux Editions, 10ème Réunion A.E.T.E., Lyon, 228.

- Ponsart, C., Delcroix, P., Rohou, A., Jupin L., Humblot P., 2000. In Merieux Editions, 16ème réunion AETE. 192.

- Renard J.-P., Heyman Y., Dumesnil du Buisson F., 1977. *Theriogenology*, 7, 189-194.

- Rowson L., Moor R.M., Lawson R.A.S., 1969. *J. Reprod. Fert.*, 18, 517-523.

- Russe I (1983): Oogenesis in cade and sheep. *Bibliotheca Anatomica* 24:77-92.

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

- Scriban R. 1999. *Biothéchnologie* 5^e éditions, P 629-761.

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

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

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

-Trounson ;A.O Moor ;N.W the similar and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J.Reprod.fert.*(1974)41,97-105-

-UNCEIA Département R&D, maison Alfort 2003 :l'insémination utilisée en France

-Wandi S.A Fortier M.A. ;siurard M.A .;-1992.differential response to gonadotropins and prostaglandins E2 in ovarian tissue during prenat and post natal development-Bid-Reprod ;46;1034-1041 1

-Westergaard L.Callesen H.hyttel P;1985-Meiosis inducing substance(MIS)in bovine preovulatory follicles. *Zuchthygiene*

-Wilmot I;Rozson L.E.A;1973-experiment on the low-temperature preservation of cow embryos.*vet-rec*;1973;92;686-690.

-Wolf D.P; the mammalian eggs block to polyspermy.In-fertilization and embryonic development invitro; mastroiani, L. Biggers, B.G, Plenum Press, New York, 183-197.1981.

-Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E. Neill Jd (Eds). *The physiology of production*. Second edition. Raven Press. Ltd, New York, 1994, 189-317. IN: Henzen Ch, Loutrie O, drion P.V. 2000. Le développement folliculaire chez la vache: 1. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vet.* 2000. 144,233-235.