



053THV-2

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement et de la recherche scientifique

Université de Saâd Dahleb- Blida
Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques
Département des sciences vétérinaires

Projet de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de docteur en médecine vétérinaire

THEME



Présenté par :

BOUGAR HAFSA

Devant le jury composé de :

GUETARNI. D
ADEL. D
YAHIMI. A
FERROUK. M
GHARBI. I

Professeur à l'Université de BLIDA
MAT à l'Université de BLIDA
MAT à l'Université de BLIDA
CC à l'Université de BLIDA.
MAT à l'Université de BLIDA.

Président du jury
Examineur
Examineur
Promoteur
Co-promoteur

Année universitaire : 2005-2006

Dédicace

- A ma mère pour ses conseils et sa patience.
- A mon père pour son encouragement et son soutien moral.
- A mon mari Omar qui ma vraiment aider dans ce travail par sa confiance, son encouragement et sa disponibilité ainsi qu'à sa mère et ses sœurs.
- A ma chère grand-mère.
- A mes frère ; Abd allah, Oussama, Mohamed, Abd el Malek et Bilal.
- A mes sœurs Sara, Hadjer et sa fille Rihab.
- A mes oncles, cousins et cousines.
- A mes amis Faiza, Nadia, Salima, Safia, Asma, Mokran, Imane.
- A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin sans exception.

Dédicace

- A ma mère pour ses conseils et sa patience.
- A mon père pour son encouragement et son soutien moral.
- A mon mari Omar qui ma vraiment aider dans ce travail par sa confiance, son encouragement et sa disponibilité ainsi qu'à sa mère et ses sœurs.
- A ma chère grand-mère.
- A mes frère ; Abd allah, Oussama, Mohamed, Abd el Malek et Bilal.
- A mes sœurs Sara, Hadjer et sa fille Rihab.
- A mes oncles, cousins et cousines.
- A mes amis Faiza, Nadia, Salima, Safia, Asma, Mokran, Imane.
- A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin sans exception.

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu, le bon dieu qui ma donné la force à élaborer ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mr le docteur: Gharbi qui m'a guidé et encouragé tout au long de la réalisation de ce travail

A Mr le docteur FERROUK pour l'encadrement, sa gratitude et ses conseils.

A Mr le docteur ADEL pour son assistance et ses encouragements.
A Mr le docteur YAHIMI qui nous a fait l'honneur par sa présence.

A Mr le professeur GUETARNI qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

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

f. ouati

Résumé :

Parmi les bovins locaux, le type Cheurfa est une entité génétique appréciable de part sa rusticité, son caractère mixte, son adaptation aux conditions climatiques et son aptitude à valoriser les aliments médiocres. L'amélioration des aptitudes reproductives par la production d'embryons in vivo s'inscrit parfaitement dans la multiplication et la conservation des races autochtones par la constitution de banque d'embryons.

L'objectif du présent travail est de tester la réponse du bovin local Cheurfa à un traitement de superovulation à base de pFSH entre J₁₀ et le J₁₃ du cycle oestral par rapport aux chaleurs de référence. 40mg UA de pFSH (LH / FSH à 40%), répartis sur 4 jours, sont administrés à raison de 2 injections à 12 heures d'intervalle. Une injection de prostaglandine de synthèse "Prosolvine" a été réalisée au 3^{ème} jour du traitement. Deux inséminations ont été effectuées à 12 heures d'intervalle sur chaleurs observées. A J₇, la récolte des embryons a été réalisée.

Sur quatre essais réalisés, le nombre moyen de corps jaunes obtenu par vache est de 7.5. Le nombre moyen d'embryons récoltés par vache est de 5 avec un nombre d'embryons transférables de 2,33 par vache, soit un taux de viabilité de 46,66%. 5 embryons, parmi les embryons obtenus, ont été transférés à l'état frais sur des receveuses de race améliorée. Le taux de gestation obtenu de 60% a donné naissance à deux veaux et une velle de type Cheurfa.

En conclusion, la vache Cheurfa a répondu au traitement de superovulation et le rendement obtenu, quoique faible comparativement à celui du bovin amélioré, est proche de certaines races autochtones.

Mots clés : Superovulation, embryon, transfert, bovin, local.

ملخص

من بين الأبقار المحلية، يعد نوع شرفة كائنا جينيا معتبرا بسبب جلدته، ازدواجية منتوجه، تأقلمه مع مختلف الظروف المناخية و قدرته على تئمين الأغذية الرديئة. إن تحسين القدرات الإنتاجية عن طريق إنتاج أجنة يندرج تماما في إطار تكاثر السلالات الأهلية و حمايتها بواسطة تكوين بنك للأجنة.

يهدف هذا العمل الي اختبار مدى تفاعل الأبقار المحلية من نوع شرفة بعد إخضاعها لعملية مضاعفة إنتاج البويضات بإستعمال 40 ملغ FSH (FSH/LH 40%) موزعة على 4 أيام ، بمعدل حقنتين كل 12 ساعة ما بين اليوم 10 و 13 من الدورة الودقية بالنسبة للشبق .

في اليوم الثالث من العملية أعطيت للبقرة حقنة من الموثية الإصطناعي "Prosolvin"، كما أخضعت لعملي تعشير بفارق 12 ساعة بينهما، الملاحظ في يوم السابع تم جني الأجنة.

على أربع محاولات منجزة ، كان متوسط عدد الأجسام الصفراء المتحصل عليها من البقرة الواحدة 7.5 و متوسط عدد الأجنة 5 مع عدد من الأجنة القابلة للتحويل يقدر ب 2.33 على البقرة الواحدة، ما يساوي نسبة القابلية للحياة تبلغ 46,66%.

5 أجنة من الأجنة المتحصل عليها تم تحويلها و هي طازجة لتحمل من طرف بقرات من نوعية مطورة.

نسبة الحمل المتحصل عليها هي 60% مع ميلاد عجلين و عجلة من نوع شرفة.

نستج، أن بقرة شرفة تفاعلت مع العملية المتمثلة في مضاعفة إنتاج البويضات، كما أن المردود المتحصل عليه كان ضعيفا مقارنة مع مردود الأبقار المطورة و كان قريبا من مردود بعض السلالات المحلية الأهلية.

الكلمات المفتاحية: مضاعفة الإنتاج، البويضات، الأجنة، نقل، الأبقار المحلية.

TABLES DES MATIERES

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Résumé.....	III
Tables des matières.....	IV
Liste des abréviations.....	V
Tableaux et figures de la partie bibliographique.....	VI
Tableaux et figures de la partie expérimentale.....	VII
Liste des photos.....	VIII

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Partie bibliographique

Chapitre I : Fonctionnement ovarien, fécondation et maîtrise des cycles sexuels

I. Rappels physiologiques sur le fonctionnement ovarien.....	2
✕ I.1 Introduction.....	2
✕ I.2. La folliculogénèse.....	2
I.2.1. L'histologie du follicule.....	2
✕ I.1.2. Les différentes phases de la croissance folliculaire	3
✕ I.1.2.1. La phase de multiplication	3
✕ I.1.2.2. Phase de croissance.....	3
I.1.2.2.1. Follicules primordiaux.....	3
I.1.2.2.2. Follicules primaires.....	4
I.1.2.2.3. Follicules secondaires	4
I.1.2.2.4. Follicules tertiaires.....	4
I.2.2.2.5. Follicule mûr.....	5
✕ I.2.2.3 Phase de maturation.....	6
✕ I.3. L'atrésie folliculaire.....	7

I.4. Dynamique de la croissance folliculaire.....	9
✱ I.4.1. Notion de vagues folliculaires.....	9
✱ I.4.2. Mécanisme régulateur du nombre de vagues folliculaires.....	10
✱ I.4.3.. Notion de recrutement, sélection et dominance.....	10
I.4.3.1. La notion de recrutement.....	10
I.4.3.2. - La notion de sélection.....	11
I.4.3.3. La notion de dominance.....	11
I.5. Régulation hormonale de la folliculogénèse.....	12
✱ I.5.1. Phase gonadotrope indépendante.....	12
✱ I.5.2. Phase gonadotrope dépendante.....	13
✱ II. Caractéristiques du cycle oestral.....	13
II.1. Introduction.....	13
✱ II.2. Mécanisme endocrinien du cycle sexuel.....	14
✱ II.3. Le cycle oestrien.....	15
✱ II.4. Le cycle utérin.....	16
III. Maîtrise des cycles sexuels chez la vache.....	16
III.1. Introduction.....	16
III.2. Méthode de synchronisation de l'oestrus.....	17
III.2.1. Méthode basée sur la progestérone seule ou sur ses dérivés.....	17
III.2.1.1. Nature des progèstagènes.....	17
III.2.1.2. Méthodologie d'utilisation des progèstagènes.....	17
III.2.1.2.1. Les implants.....	17
III.2.1.2.2. PRID (progestérone relasing Inter- vaginal Device).....	18
III.2.1.2.3. CIDR (controled internal Drog Release device).....	18
III.2.2. Méthodes d'utilisation de la PGF2 α seule ou ses analogues.....	18
III.2.2.1.Principe de base.....	18
III.2.3. Association thérapeutique, traitement combiné dans le contrôle d'oestrus...18	
III.2.3.1. Association œstrogène / progestérone / eCG :.....	18
III.2.3.2. Association progestérone prostaglandine.....	20
III.2.3.3. Association progestagène-GnRH-prostaglandine.....	20
III.2.3.4. Association GnRH / PGF2 α	21
III.2.4. Gonadolibérines.....	21

IV. La fécondation et le développement embryonnaire.....	22
IV.1. La fécondation.....	22
IV.2. Développement embryonnaire durant stade libre.....	23
IV.2.1. Les premiers stades de l'embryon.....	24
IV.2.2. La Totipotence embryonnaire.....	25
IV.2.3. La compaction embryonnaire.....	25
IV.2.4. Les facteurs de reconnaissance d'une gestation.....	26
Chapite II : Superovulation et transfert embryonnaire.....	27
I.Introduction.....	27
II. La superovulation.....	72
II.1.Les hormones utilisables.....	28.
II.1.1.Choixdel'hormone de Superovulation.....	28
II.1.2.L'utilisationdelaPMSG.....	28
II.1.3. Follicule stimulating hormone FSH.....	30
II.1.3.1.Effet du rapport LH/FSH.....	30
II.1.3.2.Protocole d'utilisation de la FSH.....	31
1. Dose.....	31
2. Rythme des injections.....	31
II.1.4.Moment de la super ovulation durant le cycle oestral.....	33
II.1.5.Effet du follicule dominant sur les résultats de super ovulation.....	33
II.1.6. Synchronisation des vagues folliculaires.....	33
III. Insémination artificielle, récolte et classification des embryons.....	34
III.1. Insémination artificielle.....	34
III.2. Récolte des embryons.....	34
III.3. Examen et classification des embryons.....	35
IV. Congélation des embryons.....	42
IV.1. Techniques de congélation.....	43
IV.1. 1. Congélation Lente.....	43
IV.1.1. 1. Les cryoprotecteurs.....	43
IV.1.1.2. Conditionnement de l'embryon dans une paillette.....	43
IV.1.1.3. Descente de température.....	44

IV.1.2. Vitrification et vitrification ultra rapide.....	44
IV.1.2. 1. Les cryoprotecteurs.....	45
IV. 1. 2. 2. Conditionnement de l'embryon : paillette, OPS et cryoloop.....	45
A. vitrification classique.....	45
B. Technique OPS.....	46
C. Technique cryoloop.....	46
IV . 1. 2. 3. Descente de la température.....	47
IV . 2. Décongélation.....	47
V. Transfert embryonnaire.....	47
V.1. Méthodes du transfert d'embryons.....	48
V.1.1. La technique chirurgicale du transfert embryonnaire.....	48
V.1.2. La technique non chirurgicale.....	48
V.2. Facteurs de variation des résultats du transfert.....	48
V.2.1. Traitement de superovulation.....	49
V.2.1.1. Hormone de superovulation (FSH ou PMSG).....	49
V.2.1.1.1. Traitement par FSH.....	50
V.2.1.1.2. Traitement par PMSG.....	51
V.2.1.1.3. Influence du type de préparations.....	52
V.2.1.1.4. Influence des méthodes d'administration.....	54
V.2.1.1.5. Influence du dosage de l'hormone de superovulation.....	55
V.2.1.2. Intervalle vêlage-traitement de superovulation.....	55
V.2.1.3. Répétition des traitements de superovulation.....	56
V.2.2. Facteurs extrinsèques à la donneuse.....	57
V.2.2.1. Taureau.....	57
V.2.2.2 Les conditions atmosphériques et le climat.....	57
V.2.2.3. Alimentation.....	58
V.2.2.4. Stress et maladies intercurrentes.....	59
V.2.3. Facteurs intrinsèques à la donneuse.....	59

V.2.3.1. Race.....	59
V.2.3.2. Age et parité.....	60
V.2.3.3. Génétique.....	61
V.2.3.4. La lactation et le niveau de production laitière.....	61

Partie expérimentale

Objectif.....	62
----------------------	-----------

Matériel et méthodes

I- Matériel.....	63
I.1 Animaux.....	63
I.2. Matériel et produits de récolte et de transfert.....	63
I.3. Matériel d'insémination.....	64
I.4. Hormones de synchronisation des chaleurs.....	65
I.5. Hormones de superovulation.....	65
II. Méthodes.....	65
II. 1. Protocole du traitement de synchronisation.....	65
II.2. Protocole du traitement de superovulation.....	66
II.3. Contrôle de la réponse au traitement de superovulation.....	67
II.4. Récolte d'embryons.....	67
II.5. Classement et conditionnement des embryons.....	68
II.6. Congélation des embryons.....	69
II.7. Transfert d'embryons.....	70
II.8. Diagnostic de gestation.....	71

Résultats et discussion

I- Résultat.....	72
I. 1-Synchronisation des chaleurs des receveuses.....	72
I.2-Réponse au traitement de superovulation.....	72
I.3. Résultats de récolte.....	75
I.4. Résultats de transfert.....	78
I.5. Résultat de congélation.....	80
II. Discussion.....	81

II.1. Evaluation de la réponse au traitement de superovulation.....	81
II.2. Collecte d'embryons.....	82
II.3. Taux de gestation.....	82
Conclusion.....	83
Références bibliographiques	

LISTE DES ABREVIATIONS

ARN : acide-ribonucleique
CAP : La chlormadinone.
CJ : corps jaune
C : corona radiata
D : Emb dégénéré
DE : diamètre externe
DHPA : La dihydrogestérone acétophénide.
DMSO : diméthylsulfoxyde
eCG : equine chorionic gonadotrophin
E2 : oestradiol-17 β
Emb : embryon
FGA : Acétal de fluorogestone.
FSH : follicle stimulating hormone
G : graulosa
GnRH: gonadotropin releasing hormone
H : heure
IA: insémination artificielle
IM : intra musculaire
IV : intra veineuse
J : jour
LH : luteinising hormone
MGA : L'acétate de mélangestrol.
Mg : milligramme
Ml : Millilitre
Mm: millimètre
MOET: Multiple ovulation and embryo transfer
N°: Numéro
Nbr: Nombre
NF : Emb non fécondé
 μ m : micromètre
OPS : open pulled straw
PBS : phosphate buffered saline

PG : prostaglandine

PMSG: pregnant mare serum gonadotropin

P4 : progestérone

S : second

TE (ET) : transfert embryonnaire

UI : unité internationale

ZP : zone pellucide

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableaux et figures de la partie bibliographique

Liste des figures :

Figure 1 : Follicule mûr de De-Graaf.....	5
Figure 2 : Les différentes étapes de la folliculogénèse	7
Figure 3 : L'atrésie folliculaire au niveau cellulaire.....	8
Figure 4 : Le phénomène de l'atrésie folliculaire	9
Figure 5 : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire	14
Figure 6 : Protocoles de synchronisation à base de progestagène	20
Figure 7 : Protocoles de synchronisation associant GnRH et prostaglandine F2 α	21
Figure 8 : Correspondance de l'état d'évolution de l'embryon avec son âge	25
Figure 9 : Schéma du traitement de la PMSG sur chaleurs naturelles	29
Figure 10 : Schéma du traitement de la PMSG sur chaleurs maîtrisées.....	29
Figure 11 : Protocole de superovulation al FSH sur chaleurs naturelles et sur cycle maîtrisé	32
Figure 12 : A : ovocyte non fécondé 5j après l'oestrus. B : même ovocyte non fécondé. C : zone pellucide vide après rupture, 5j après oestrus. D : ovocyte non fécondé 6j après l'oestrus.....	40
Figure 13 : A : ovocyte avec des cellules folliculaires adhérents. B : ovocyte folliculaire après retrait des cellules folliculaires. C : ovule à une cellule 5j après oestrus. D : ovocyte non fécondé 3j après l'oestrus.....	40
Figure 14 : A : ovocyte dégénéré 5 j après l'oestrus. B : Ovocyte non fécondé avec 2 fragments cytoplasmiques. C : ovocyte non fécondé fragmenté 5 j après l'oestrus. D : ovule désintégrée probablement non fécondés.....	40
Figure 15 : A : embryon à 2 cellules récolté 4,5j après l'oestrus. B : embryon à 2 cellules dégénérés récolté 5j après l'oestrus, cytoplasme clair sur un blastomère. C : embryon à 4 cellules récolté 2,5j après l'oestrus. D : embryon à 2 cellules récolté 5j après l'oestrus avec un cytoplasme claire.....	40

Figure 16 : **A** : morula non compacte récolté 3j après l'oestrus probablement dégénéré.
B : morula non compacte récolté 3j après l'oestrus Avec un cytoplasme sombre.
C : embryon avec un retard de développement et Dégénéré, récolté 6j après oestrus.
D : embryon dégénéré récolté 7j après l'oestrus.....41

Figure 17 : **A** : embryon à 8 cellules récolté 3j après l'oestrus. **B** : embryon à 8 cellule récolté 3j après l'oestrus. **C** : embryon de 12 à 14 cellules récolté 4j après l'oestrus. **D** : embryon de 12 à 14 cellules avec un retard sévère de développement récolté 6j après l'oestrus.....41

Figure 18 : **A** : jeune blastocyste expansé, récolté 7j après l'oestrus **B** : même jeune blastocyste. **C** : blastocyste expansé récolté 7,5j après l'oestrus (Zone pellucide fine).
D : blastocyste en éclosion récolté 9j après l'oestrus41

Figure 19 : **A** : jeune morula compacte récolté 7j après l'oestrus. **B** : morula compacte récolté 7j après oestrus avec des cellules de bonnes qualité. **C** : morula compacte récolté 7,5j après l'oestrus avec des cellules de mauvaise qualité. **D** : morula avec quelques cellules dégénérées.....41

Figure 20 : **A** : morula compacte de bonne qualité avec quelques cellules dégénérées récoltées 6,5j après l'oestrus. **B** : ovule non fécondée récoltée 7j après l'oestrus Peut être facilement confondue avec un morula Après microdissection. **C** : probablement un ovule non fécondé non dégénéré **D** : probablement un ovule non fécondé non dégénéré Peut être facilement confondue avec un morula.....42

Figure 21 : **A** : morula compacte de bonne qualité avec probablement une cellule anormale située en haut et à droite, récolté 6j après l'oestrus **B** : ovocyte non fécondé peut être facilement confondue avec un morula). **C** : blastocyste récolté 7,5j après l'oestrus. **D** : ovocyte non fécondé avec la présence d'une vésicule large, peut être facilement confondue Avec un blastocyste, récolté 5j après l'oestrus.....42

Figure 22 : Schéma d'une paillette, embryon en place lors de congélation lente44

Figure 23 : Schéma d'une paillette lors de vitrification classique45

Figure 24 : Montée par capillarité dans la paillette OPS.....46

Figure 25 : Cryoloop contenant deux embryons.46

Figure 26 : Courbe de descente de température lors de vitrification ultrarapide47

Figure 27 : Répartition des vaches (en pourcentage) en fonction du nombre d'ovulations par vache, obtenues après différents traitements de superovulation50

Figure 28 : Effet de la dose de FSH utilisée lors de superovulation sur le nombre d'embryonstotaux et transférables récoltés51

Figure 29 : Effets de l'administration ou non d'anti-PMSG 6 ou 18 heures après le pic de LH sur le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons transférables.....52

Figure 30 : Réponse au traitement de superovulation avec Folltropin® (-F) ou Pluset®

(-P) en injection simple (S-) ou multiple (M-).....	53
Figure 31 : Réponse au traitement de superovulation avec Folltropin® (-F) ou Pluset®	
(-P) en injection unique (S-) ou multiple (M-).....	54
Figure 32 : Résultats de collectes chez 4 races bovines différentes (Angus (Ang), Charolaise).....	60
Figure 33 : Influence de l'âge sur la réponse au traitement de superovulation pour 633 collectes chez des vaches laitières.....	60

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Chronologie du développement de l'embryon bovin.....	24
Tableau n°2 : Effet du rapport LH/Fsh sur la production d'embryons	31
Tableau n°3 : Diamètre externe (DE) et épaisseur de la pellucide (EP) d'embryons bovins en fonction du stade de développement embryonnaire	35
Tableau n°4 : Le stade de développement embryonnaire normal en fonction du jour de l'oestrus	36
Tableau n°5 : Les taux de gestation des embryons classés dans quatre groupes basé sur la morphologie	38
Tableau n°6 : Classification des embryons selon leur qualité	39
Tableau n°7 : Pourcentage de variance corrigée pour les différents effets sur la réponse à la superovulation.....	49
Tableau n°8 : Production d'embryons obtenue par répétition des traitements sur des donneuses permanentes Holstein x FFPN	56
Tableau n°9 : Influence du niveau de production laitière sur la production d'embryons.....	61

Tableaux et figures de la partie expérimentale

Liste des figures

Figure 1 : Traitement d'induction de synchronisation des chaleurs de donneuses et receveuses.....	66
Figure 2 : Protocole de traitement de superovulation	67
Figure 3 : Schéma de montage de l'embryon en paillette pour un transfert en frais ...	68
Figure 4 : Schéma de montage de l'embryon en paillette pour une congélation	69
Figure 5 : Schéma de congélation lente des embryons	70

Liste des tableaux

Tableau n° 1 : Délai d'apparition des chaleurs des receveuses (Heures).....	72
Tableau n° 2 : Intervalle PG-début d'oestrus des donneuses (Heures).....	73
Tableau n° 3 : Nombre de corps jaunes estimé par vache.....	74
Tableau n° 4 : Classification des embryons récoltés par vache.....	75
Tableau n° 5 : Résultat de récolte par catégorie d'embryon.....	78

Liste des photos

Photo n° 1 : Chevauchement de la vache Cheurfa en oestrus.....	73
Photo n° 2 : Chevauchement de la vache Cheurfa en oestrus.....	74
Photo n° 3 : Image échographique d'un ovaire superovulé avec présence des corps jaunes le jour de récolte (après lavage, ×100).....	75
Photo n° 4 : Ensemble d'embryons récoltés (après lavage, ×100).....	76
Photo n° 5 : Jeune blastocyste de classe 1 (après lavage, ×100).....	76
Photo n° 6 : Ovocyte de classe 4 (après lavage, ×100).....	76
Photo n° 7 : Morula dans le milieu de récolte (après lavage, ×100).....	77
Photo n° 8 : Morula de classe 2 (après lavage, ×100).....	77
Photo n° 9 : Receveuse pie rouge avec son veau Cheurfa.....	79
Photo n° 10 : Receveuse pie noire avec son veau Cheurfa.....	79
Photo n° 11 : Les trois veaux Cheurfa issus par transfert embryonnaire.....	79

Introduction générale

Introduction générale

Toutes les populations bovines autochtones en Algérie sont regroupées sous la dénomination de «Race brune de l'atlas» avec un effectif total estimé en 1997 à 700 000 têtes sur un effectif total de 1300 000 (Abdelguerfi, 2003).

Cette race locale a donné naissance à des «rameaux» en fonction de sa localisation telles que la Cheurfa, la guelmoise, la sétifienne, la tlemecénienne, marqué par l'influence du milieu propre à chaque région.

Depuis les années 1990, les croisements de la race locale avec des races étrangères se sont répandus, et il est difficile de trouver des animaux qui représentent le type pur de la population bovine locale. C'est ainsi qu'une multitude de croisement a été réalisée par le passé et d'autres se font encore par certains éleveurs.

Parmi les bovins locaux, le type Cheurfa est une entité génétique appréciable de part sa rusticité, de son caractère mixte mais peu productive et de son adaptation aux conditions locales difficiles. Son effectif est faible et ne représente que 8% des effectifs bovins de l'Est du pays et 5% de l'effectif total (ITEBO, 1997).

Ces éléments nous ont conduit ces dernières années avec la collaboration de l'ITELV et le CNIAAG à accorder une attention particulière à ce type de bovin local au niveau de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb de Blida pour la connaissance de ces aptitudes reproductives et sa conservation. La production d'embryons in vivo s'inscrit parfaitement dans la préservation des races autochtones par la constitution d'une banque d'embryons.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Fonctionnement ovarien, fécondation et maîtrise des cycles sexuels

I. RAPPELS PHYSIOLOGIQUES SUR LE FONCTIONNEMENT OVARIEN

I.1. Introduction :

Les ovaires sont des petits organes siège de production d'ovocyte. Le phénomène de folliculogénèse a été décrit la 1^{ère} fois en 17^{ème} siècle par l'anatomiste Halandis Menier De Graaf, qualifié par des modifications histologiques et hormonales importantes. Organes paires, de forme ovoïde situés en position latérale de la cavité pelvienne, sont des gonades spécifiques du sexe femelle, c'est-à-dire le lieu de tous les processus de reproduction.

I.2. La folliculogénèse :

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis où ils sort de la réserve jusqu'à l'ovulation ou plus fréquemment jusqu'à l'atrésie (Greenwald, 1972).

I.2.1 L'histologie du follicule :

Chaque follicule ovarien fournit un microenvironnement permettant la croissance et la maturation d'un ovocyte (Gordon, 1996). De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve les cellules de la thèque externe et interne, de la granulosa et les cellules du cumulus entourant l'ovocyte (Stevens et Louve, 1997). Le follicule est constitué de deux types cellulaires, soit les cellules de la thèque, qui sont des cellules de type fibroblastique et se divisent en deux couches cellulaires, la thèque externe et la thèque interne.

La thèque externe est compacte et traversée de vaisseaux sanguins et n'a pas de fonction sécrétoire.

Au contraire, les cellules de la thèque interne sécrètent des stéroïdes (progestérone, androgènes et œstrogènes) grâce à un important réticulum endoplasmique lisse et des mitochondries à crêtes tubulaires.

Une lame basale contenant du collagène, de la fibronectine, de la laminine et des protéoglycans, sépare les feuillettes des cellules de la thèque et de la granulosa. Les cellules de la granulosa ne sont pas irriguées par les vaisseaux sanguins et sont de type épithélial pseudostratifié. Les cellules du cumulus oophorus sont des cellules de type granulosa entourant l'ovocyte qui se sont différenciées et constituent une sous-population.

Les cellules du cumulus servent à nourrir l'ovocyte. La couche de cellules du cumulus (la couche la plus interne) qui est en étroit contact avec l'ovocyte, via des extensions cytoplasmiques se projetant à travers la zone pellucide, forme la corona radiata.

La corona radiata communique avec l'ovocyte et les cellules du cumulus via des pores appelés jonctions communicantes " Gap junction " (De Loos et al, 1991). Les

cellules du cumulus sont de plus impliquées dans la modulation d'inhibiteurs de la maturation ovocytaire (Greenwald, 1972).

I.2.2. Les différentes phases de la croissance folliculaire :

I.2.2.1 La phase de multiplication :

Chez la vache vers la sixième semaine de gestation, les cellules germinales primordiales sont encore appelées cellules souches d'origine extra-embryonnaire localisées au niveau de la paroi de la vésicule vitelline.

Les cellules germinales souches commencent à se multiplier entre le 60^{ème} et le 170^{ème} jour de la gestation (Wald et al, 1992).

Pendant la gestation se forme un stock de 2 millions d'ovogonies, qui une fois la phase mitotique terminée entament une division méiotique qui se trouve bloquées en prophase I.

Le contact des ovogonies avec les cellules d'origine mésonephrotique est indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires (Byskov, 1979).

A cette période l'ovocyte I est entouré par quelques cellules endothéliiformes et une membrane basale (future membrane de Slavjanski) formant les follicules primordiaux (réservoirs des cellules germinales) qui se développent mais quelques unes seulement arriveront à maturité.

I.2.2.2 Phase de croissance :

Cette phase comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et l'ovulation, elle concerne que 10 % du stock folliculaire.

Cette phase est caractérisée par les modifications concernant tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme. Le développement folliculaire est continu et comprend les stades suivants : follicule primordial, primaire et secondaire constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaires et de De-Graaf représentant les follicules antraux (Monniaux et al ; 1983).

I.2.2.2.1.Follicules primordiaux:

Le follicule primordial de forme ellipsoïde, contient l'ovocyte (ovule immature).Le diamètre des follicules primordiaux est d'environ 40 à 50 µm et contient un ovocyte immature de moins de 30 µm de diamètre. Ces follicules contiennent tous des ovocytes incapables de reprendre leur méiose (Hanzen, 2000). L'apparition des follicules primordiaux dans l'ovaire a lieu durant l'embryogenèse.

Ce type de follicule se caractérise par un ovocyte entouré par une seule couche de cellules épithéliales aplaties : Les cellules de la pré-granulosa (Byskov et al 1979).

La présence des cellules de la granulosa serait nécessaire pour que l'ovocyte puisse survivre et croître (Byskov et al, 1979)

Le facteur responsable du blocage de l'ovocyte à ce stade est un polypeptide produit par la granulosa du follicule primaire et secondaire l'OMI (Ovocyte Meiosis Inhibitors) (Sirard et al, 1989).

I.2.2.2.2.Follicules primaires:

Les groupes de follicules primordiaux commencent à se développer pour devenir follicule primaire. Ce phénomène se produit indépendamment des hormones gonadotrophines et ne semble pas être soumis au contrôle ovarien (Peters et al, 1975).

Cette phase est caractérisée par l'augmentation de l'ovocyte par l'arrangement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise et sécrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse, de nature polysaccharide. La zone pellucide qui se forme dans l'espace folliculo-ovocyttaire, elle est constituée par 95% de trois glycoprotéines ; ZP1, ZP2, ZP3 ; et seule la glycoprotéine ZP3 est reconnue par les spermatozoïdes et déclenche la réaction acrosomique. La ZP2 intervient lors de la fécondation ; et le composant le moins abondant ZP1 assure la stabilité de la zone pellucide jusqu'au stade blastocyttaire (Yana Gimachi, 1994) . Le diamètre de follicule primaire est compris entre 60 et 80 μ et celui de l'ovocyte qu'il renferme entre 30 et 40 μ m.

I.2.2.2.3.Follicules secondaires:

La prolifération de cellules folliculaires et leur organisation en couches successives résulte en la formation secondaire dans lequel l'ovocyte occupe toujours une position centrale.

A ce moment, la membrane basale entourant les cellules folliculaires se transforme en membrane dite SLAVJANSKI (collagène de type IV, fibronectine, l'amine et protéohéparine sulfate), les thèques se différencient, en même temps qu'apparaît la zone pellucide (Heller et al. 1981).

Les follicules primaires et secondaires constituent le stock des follicules au repos et représentent 95 % de la population folliculaire ovarienne, ils se répartissent dans les couches plus périphériques du stroma ovarien.

I.2.2.2.4 Follicules tertiaires :

Les follicules secondaires deviendront tertiaires lorsqu'il y aura formation d'une cavité à l'intérieur du follicule connue sous le nom d'antra (ou antrum). Cette cavité est remplie de liquide folliculaire contenant de l'exsudat du plasma sanguin et des produits sécrétés par les cellules folliculaires. Le stade tertiaire correspond à la phase de recrutement folliculaire.

Le développement progressif de l'antrum entraîne la séparation des cellules de la granulosa en cellules du cumulus oophorus. Celle-ci se différencie en corona radiata,

couche cellulaire entourant directement l'ovocyte. Ces cellules du cumulus et de la corona présentent de nombreuses zones fonctionnelles (Gap Junction) qui constituent des moyens constants, compris entre 25 et 50 %. Il dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules qui s'atrophient (Armstrong, 1993). A ce stade et chez tous les mammifères, le follicule cavitaire s'entoure en dehors de la membrane de Slavjanski, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riches en ARN et en enzymes nécessaires à la stéroïdiogénèse et par la thèque externe formée d'un tassement de tissu conjonctif du stroma ovarien.

I.2.2.2.5. Follicule mûr :

Représente la phase terminale du développement, qui ne couvre en fait qu'un sur mille follicules entrant en croissance (Saumande, 1991).

Chez la vache ce follicule atteint une taille maximale de 25 mm. Il est formé du nombre le plus élevé de cellules folliculeuses qui ont une activité mitotique minimale. L'ovocyte est toujours entouré par les cellules de la corona radiata et du cumulus oophorus. La cavité folliculaire est gonflée par le liquide folliculaire, les deux thèques sont bien différenciées et la membrane de Slavjanski est bien visible.

A ce stade la thèque interne devient une glande à part entière et la thèque externe ne forme qu'une couche fibreuse.

Lorsque l'antrum est formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire à travers les cellules du cumulus et avec le sang à travers les cellules de la granulosa et la membrane basale (Cf figure 1).

La durée permettant la réalisation de toutes ses étapes excède de beaucoup la durée du cycle chez toutes les espèces (Monniaux et Monget, 1997). Chez la vache, il faut 42 jours pour permettre à un follicule de 0,13 mm d'arriver au stade pré-ovulatoire (Lussier et al, 1987).

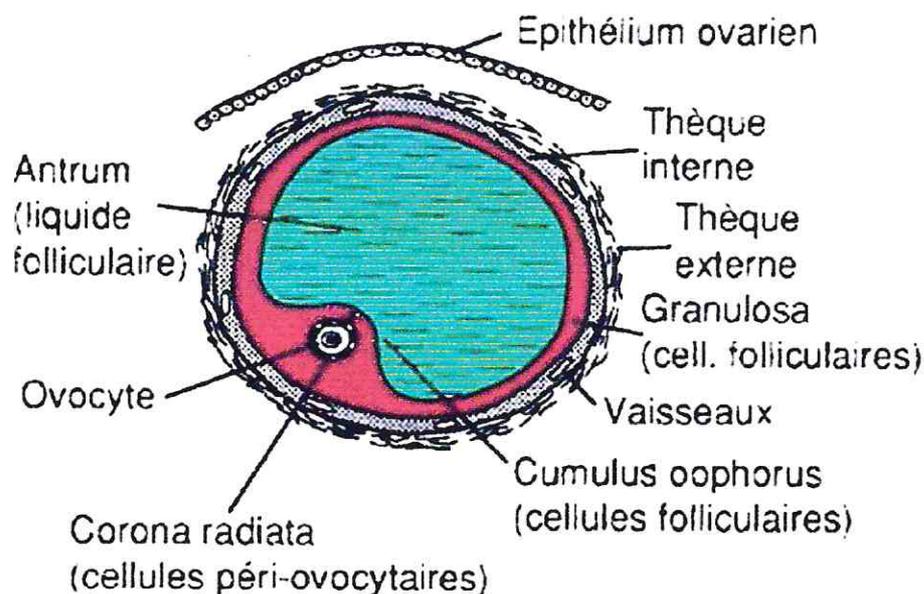


Figure 1 : Follicule mûr de Degraaf (Scriban, 1999)

I.2.2.3. Phase de maturation :

Elle concerne surtout l'ovocyte, elle est induite par le pic ovulatoire et implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte. La maturation nucléaire de l'ovocyte c'est-à-dire reprise de la méiose, correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes, finalement à l'émission du premier globule polaire. L'ovocyte I se transforme en ovocyte II lors du cycle sexuel, et la maturation nucléaire ne survient qu'après la décharge ovulante, elle prend fin juste avant l'ovulation.

Cette reprise de la méiose se fait soit sous l'un des facteurs inducteurs appelés MPF (méiotique promoting factor) ou encore MIS (méiotique inducing substance), ces facteurs atteindraient l'ovocyte notamment par l'intermédiaire de jonction cellulaire (GAP- jonction) dont le nombre augmente sous l'influence de l'œstradiol et de l'AMPc.

L'activation des récepteurs à la LH des cellules de la granuleuse induite lors de la décharge ovulatoire, permet de réaliser sa maturation cytoplasmique, préalable essentiel au succès de la fécondation (Hanzen et al. 2000).

- La maturation cytoplasmique de l'ovocyte se caractérise par l'augmentation du nombre de mitochondrie, par l'apparition d'un appareil de Golgi bien développé et par la migration des granules corticaux vers la périphérie de l'ovocyte, ces granules contiennent une ovopéroxydase qui lors de la fécondation a pour effet d'empêcher la pénétration de spermatozoïdes supplémentaires pour prévenir la polyspermie.
- La maturation membranaire comprend l'ensemble des processus permettant la reconnaissance spécifique de l'ovocyte par le spermatozoïde. La membrane pellucide synthétisée pendant la croissance ovocytaire joue un rôle important lors de la fertilisation, et ne laisse pénétrer dans l'ovocyte que le spermatozoïde fécondant, favorise et prépare la fusion spermatozoïde / ovule et protège l'ovocyte contre la polyspermie (Hanzen et al. , 2000).

La finalité biologique de la folliculogénèse est la production d'ovocyte fécondable lors de l'ovulation, c'est néanmoins un processus à haut risque puisque plus de 99,9 % des follicules qui entrent en croissance dégénèrent par atresie à un stade quelconque de leur développement à chaque cycle ovarien. Le follicule pré-ovulatoire constitue donc une structure d'exception, sélectionnée par un ensemble de régulations très strictes, la constance de ces régulations, de nature endocrine et locale permettant le développement jusqu'à terme d'un nombre déterminé de follicules en croissance dans un contexte générale de gaspillage des populations folliculaires présentes (Monniaux et Monget, 1997).(Cf figure 2)

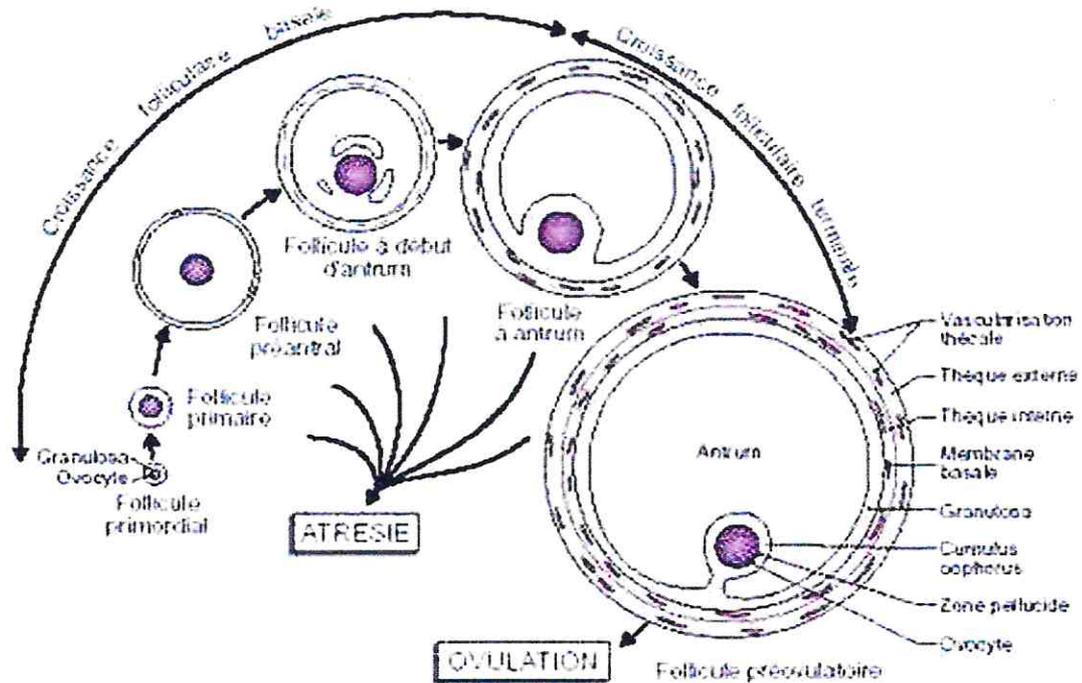


Figure 2 : Les différentes étapes de la folliculogénèse (Monniaux et al, 1999)

I.3. L'atrésie folliculaire :

L'atrésie est le phénomène dégénératif physiologique du follicule, qu'on peut observer sur la granulosa en premier lieu, et tous les follicules à antrum peuvent être concernés (Saumande, 1981).

L'atrésie encore appelée involution folliculaire, elle constitue le devenir de la majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères, elle joue donc indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation ; sa durée, ses causes et son mécanisme sont encore mal connus (Hanzen et al 2000). L'atrésie est un phénomène quantitativement important de la folliculogénèse, les follicules normaux diminuent avec la taille des follicules.

Parmi les follicules qui quittent le pool des primordiaux 1 sur 2000 atteignent le stade pré-ovulatoire, cela nous amène donc à considérer la dégénérescence atrétique comme le devenir normal d'un follicule qui quitte le pool des follicules primordiaux (Saumande, 1981).

Mais il ne faut pas confondre cette atrésie avec la dégénérescence qui atteint les follicules primordiaux avant la naissance. Elle s'applique à tous les follicules à antrum, mais n'atteint pas le stade irréversible. Cytologiquement, elle n'est identifiable que chez les follicules primaires, secondaires, tertiaires par la mise en évidence de pycnose (un grain de chromatine condensée) ou d'apoptose (corps apoptiques) dans les cellules de la granulosa ou par l'identification de processus dégénératifs (opacification) au niveau

de l'ovocyte (Dieleman et al., 1993), (Cf figure 3 et 4).

Biochimiquement, elle s'accompagne d'une augmentation des concentrations en enzymes lysosomiales et en glycosaminoglycans ainsi que d'une diminution des concentrations en œstradiol. La granuleuse disparaît progressivement et le cumulus se dissocie, l'ovocyte dégénéré reste la dernière cellule identifiable (Hanzen, 2000).

Sur le plan fonctionnel, la distinction entre les follicules atrétiques ou non peut être réalisé par la détermination du rapport de leurs concentrations en oestradiol / progestérone ou mieux encore, par le rapport de leurs concentrations en oestradiol / ocytocine (Irland et Roche, 1982).

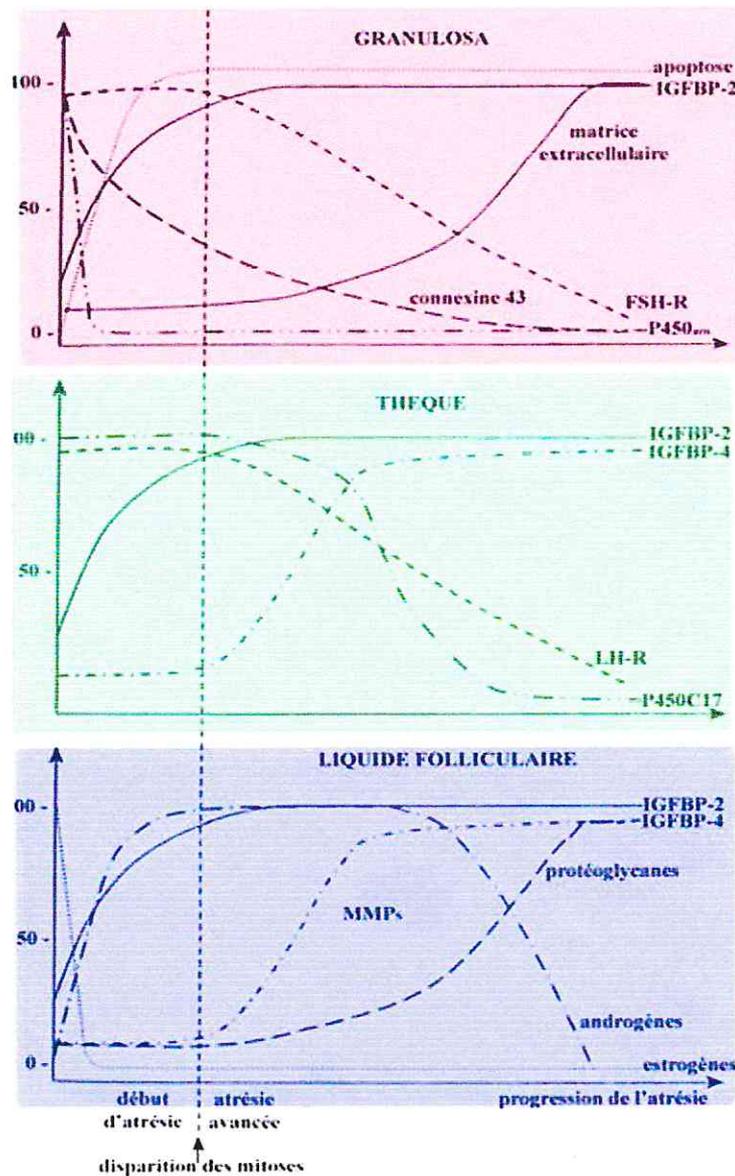


Figure 3: L'atrésie folliculaire au niveau cellulaire (Thibault et al, 2001)

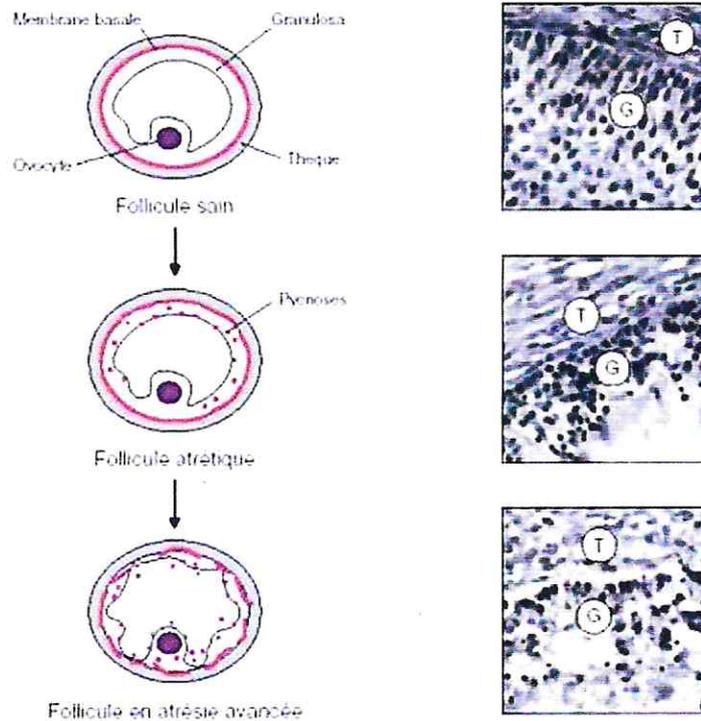


Figure 4 : Le phénomène de l'atrésie folliculaire (Monniaux et al, 1999)

I.4. Dynamique de la croissance folliculaire :

L'analyse des follicules *in vivo* par échographie chez la vache a fourni des éléments très importants sur la dynamique de la croissance folliculaire (Driancourt et al 1991 ; Hanzen et al, 2000). C'est ainsi qu'on a pu mettre en évidence que des follicules croissent en permanence au cours du cycle sexuel sous forme de vagues.

I.4.1. Notion de vagues folliculaires :

Ces dernières années, la mise au point et le recours de plus en plus intensif à l'échographie ont permis de décrire de manière plus précise la cinétique de la croissance folliculaire en confirmant la théorie de vagues selon laquelle le développement folliculaire apparaît non pas de manière aléatoire mais sous la forme de croissance et de régression synchrones de plusieurs follicules appelés vagues.

Chaque vague consiste l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ de plusieurs follicules, de diamètres égal ou supérieur à 5mm parmi lesquels, au bout de quelques jours apparaîtra un follicule dit dominant (Fortune et al. 1988).

Chez la vache les vagues folliculaires ne sont pas observées seulement pendant la période pré-ovulatoire comme chez certaines espèces (femme, ratte, truie) mais aussi durant la phase dioestrale du cycle (Fortune, 1994). Une à quatre vagues sont observées durant le cycle (Lucy et al, 1992 ; Mariana et Millier, 1977) ; cependant et habituellement il ne comporte que 2 à 3 vagues (Savoï et al, 1988). En cas d'émergence de trois vagues, elles débiteront aux jours 2, 9 et 16 du cycle oestral ; si celui-ci ne comporte que deux

,elles apparaissent aux jours 2 et 11 (Siroi et Fortune,1990). Ennurury (2000) rapporte des chiffres similaires concernant les cycles à deux vagues, mais concernant les cycles de trois vagues ; ces dernières débuteraient aux jours 2, 8 et 14 du cycle, il ajoute que les cycles à trois vagues sont plus fréquent chez les génisses et que ceux à deux vagues sont plus retrouvés chez les vaches adultes.

I.4.2. Mécanisme régulateur du nombre de vagues folliculaires :

Le déterminisme du nombre de vagues par cycle est à ce jour encore peu connu. Cependant des influences génétiques, nutritionnelles ou environnementales propres aux follicules sont impliquées dans ce phénomène (Fortune et al, 1991).

Diverses observations cliniques et expérimentales ont néanmoins identifié le rôle essentiel joué par les variations quantitatives et qualitatives de la progestérone au cours du cycle.

Sur le plan qualitatif, l'allongement de la phase lutéale par l'administration exogène de progestagène s'accompagne de l'apparition de 4 à 5 vagues de croissance folliculaire.

Sur le plan quantitatif une faible imprégnation progestéronique est obtenue par la mise en place lors de la phase pré-ovulatoire du cycle d'un implant (Taylor et al 1994).

Une double médiation des variations quand des variations quantitatives de la progestérone a été avancée :

- L'action peut être locale : certains auteurs ont en effet observé la présence d'un plus grand nombre de follicules sur l'ovaire ipsilatéral au corps jaunes (Fortune et al, 1983).
- L'action peut également être relayée par l'hormone LH : à la différence d'un état d'imprégnation progestéronique faible une progesteronémie élevée naturelle ou induite exerce une rétroaction négative sur la libération de l'hormone LH. Il en résulte une réduction de la synthèse d'œstradiol par le follicule dominant et par conséquent l'atrésie, ainsi au cours du cycle, si la progestérone diminue alors que le follicule dominant de la deuxième vague de la croissance folliculaire est en phase de croissance, ce dernier va ovuler et le cycle ne comportera que deux vagues (Taylor et al, 1991).

I.4.3. Notion de recrutement, sélection et dominance :

I.4.3.1 La notion de recrutement :

Le terme " recrutement " s'applique à tout follicule qui a dépassé le stade auquel habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiques (Fortune, 1994).

Il concerne donc tout un ensemble de follicule entamé dans un environnement d'influence gonadotrope que une maturation susceptible de les conduire à l'ovulation.

Ce n'est pas un phénomène isolé ou lié au hasard. Habituellement, il concerne

chez les ruminants 2 à 5 follicules de taille comprise entre 3 et 6 mm (Driancourt et al, 1991).

Le recrutement d'un nombre de follicules supérieur à celui nécessaire constituerait une garantie qu'au moins un follicule se trouve dans les conditions optimales de développement et de sensibilité à l'action de concentration minimale de FSH. Il a en effet été démontré que la destruction d'un follicule dominant au début ou en fin d'une vague de croissance folliculaire retardait dans le premier cas la régression des follicules de taille directement inférieure et entraînait dans le second cas un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante (Ko et al, 1991).

I.4.3.2. La notion de sélection :

La sélection fait référence au processus par lequel parmi les nombreux follicules en croissance, seuls certains arriveront au stade ovulatoire. Cette notion trouve sa confirmation dans la constance du nombre d'ovulation malgré la diversité quantitative et qualitative de la population folliculaire entre individus. L'atrésie joue un rôle essentiel dans cette sélection, au cours de la phase de la sélection, le follicule dominant croît de manière pendant plusieurs jours jusqu'à atteindre la taille de 9 mm environ (Siroi et Fortune, 1988).

Il a été observé que la sélection du follicule dominant se faisait 36 à 48 heures après le début du recrutement (Dao et al, 1997).

Elle est temporairement liée à l'expression par le follicule de l'ARN messager des récepteurs à l'hormone LH (Dao et al, 1997). Le premier follicule qui acquiert des récepteurs à l'hormone LH devient le follicule dominant car ses cellules de la granuleuse sont capables de répondre aux hormones LH et FSH (Bao et Garverick, 1998).

I.4.3.3. La notion de dominance :

La notion de domination a été particulièrement bien décrite dans l'espèce bovine. Elle est tout à la fois morphologique et fonctionnelle présente sur l'un ou l'autre ovaire. Elle est également fonctionnelle parce que le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression des follicules en croissance ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (Siroi et Fortune, 1990), et d'ovuler dans l'environnement hormonal approprié.

Une fois le follicule dominant a atteint un diamètre de 9 mm ; débutera alors sa dominance morphologique et fonctionnelle, c'est au cours de la phase de plateau (6 jours) (Ginther et al, 1989).

Lors des premières vagues de croissance folliculaire, le follicule dominant ne pourra ovuler que si la régression du corps jaune est induite par une injection des prostaglandines.

Si cette injection est réalisée après la fin de dominance fonctionnelle, le follicule morphologiquement dominant subira l'atrésie et une nouvelle phase de recrutement s'initiera (Driancourt et al, 1991).

L'intégration des notions de recrutement, sélection et dominance à celle de vagues de croissance folliculaire permet de répartir les follicules d'une même vague de croissance folliculaire en 4 classes (Lucy et al, 1991) :

- La première concerne les follicules récents : leur taille comprise entre 3 et 5 mm est inférieure à la taille minimale requise pour observer une ovulation (Malta et al, 1981) pendant les 2 premiers jours d'une vague, le nombre de ces follicules diminue tandis que celui des follicules de la classe 2 augmente.
- les follicules de deuxième classe : leur taille est comprise entre 6 et 10 mm leurs cellules granuleuses ne possèdent pas de récepteurs à l'hormone LH et peuvent potentiellement devenir le follicule ovulatoire (Ireland et Roche, 1982)
- les follicules de troisième classe : concerne le follicule dominant, sa taille est comprise entre 10 et 15 mm, sa granuleuse possède des récepteurs à l'hormone LH, il est virtuellement capable d'ovuler et sa présence s'accompagne au cours des jours suivants d'une diminution du nombre de follicules de la classe 2 et de follicules de la classe 1.
- La quatrième concerne le follicule pré-ovulatoire de taille supérieure à 15 mm qui persisterait (classe 4) sur l'ovaire pendant 5 à 7 jours avant d'ovuler ou l'atrésie (Hanzen et al, 2000).

I.5. Régulation hormonale de la folliculogénèse:

Deux phases sont à distinguer à ce sujet :

- La première est indépendante des gonadotrophines, elle est sous la dépendance de facteurs intra ovariens dont l'activine (Drion et al 1998), elle concerne chez la vache les follicules de taille inférieure à 15 mm.
- La deuxième phase dépend des gonadotropes (FSH et LH) ainsi que d'autres facteurs intra et extra ovariens.

I.5.1. Phase gonadotrope indépendante:

Dès la puberté, régulièrement et selon un rythme circadien un certain nombre de follicules quittent la réserve ovarienne pour ovuler ou, pour la plupart évoluer vers l'atrésie. Le nombre de follicules qui débutent leur croissance atteint un maximum chez la vache entre l'âge de 3 mois et 2 ans et décroît régulièrement par la suite. L'entrée en croissance est sous la dépendance de facteurs encore très mal connus, la mobilisation initiale a été imputée par Green Wald et Téranova (1989) à plusieurs facteurs dont la proximité des vaisseaux, des terminaisons nerveuses, du corps jaune ou des gros follicules.

Après la sortie du pool de réserve un certain nombre de facteurs permettent aux follicules d'arriver au stade primaire ; Bendell et Drington, (1990) évoquent une régulation paracrine assurée par des facteurs de croissance produits localement, certains interviendraient essentiellement dans la multiplication cellulaire comme la cybermine, PEGF (Jones et al, 1982), le FGF (Gospodariviez et Bridwell, 1977), le TGFB (Skinner, 1987).

D'autres se comporteraient comme agonistes des gonadotrophines dans la

stéroïdogénèse tel que les romatomedines (IGFI et IGFII) (Davoren et al, 1986). A ce stade du développement, on parle de phase gonadotrope indépendante car les hormones gonadotropes n'ont pas un rôle directe sur la croissance du follicule, l'administration d'agonistes de la GnRH, inhibant ainsi la libération de la FSH, n'empêche pas chez la vache certains follicules d'évoluer d'un diamètre de 6 à 7 mm. La FSH agirait, à ce stade du développement, plus sur les capacités de synthèse et de maturation des cellules de la granulosa que sur la croissance proprement dite d'après Driancourt et al (1991). Ce sont les facteurs de croissance produits localement qui jouent le plus grand rôle dans le développement folliculaire et dans la préparation à l'entrée dans la phase gonadotrope dépendante. Ainsi l'activine synthétisée par les cellules de la granuleuse, serait responsable de l'acquisition par les cellules de la granuleuse de récepteurs à la FSH et ce, à la différence de l'IGFI, en absence même de FSH. En présence de FSH, l'activine est capable de promouvoir la synthèse de l'oestradiol, l'acquisition de récepteurs à la LH et la production d'inhibine et de follistatine. Cette étape du développement folliculaire est qualifiée de folliculogénèse basale (Driancourt et al ;1991).

I.5.2. Phase gonadotrope dépendante :

Chez la vache lorsque le follicule a atteint une taille limite de 4 mm, commence la deuxième phase du développement folliculaire qu'est gonadotrope dépendante ou encore appelée folliculogénèse tonique (Driancourt et al, 1991). Après l'acquisition d'une thèque vascularisée qui autorise plus d'échange, la capacité de synthèse des stéroïdes augmente la multiplication s'accroît puis diminue lorsque le follicule atteint sa taille pré-ovulatoire. Ces différents phénomènes résultent de l'interaction entre hormones gonadotropes (FSH et LH) et les facteurs de croissance à action stimulatrice (IGFS, activine, TGF-Alpha) ou inhibitrice (IGFPBs, Follistatine, inhibine, interleukine-6, TNF -Alpha) (Monniaux et al, 1997). Ces substances peuvent avoir une action indirecte, en agissant par rétroaction négative sur l'hypophyse, ou directe sur l'ovaire en agissant d'une manière paracrine.

II. Caractéristiques du cycle oestral :

II.1. Introduction:

La vache est une espèce polyoestrienne de type continue avec une durée moyenne du cycle de 21 à 22 jours chez la vache multipare et de 20 jours chez la génisse. L'activité sexuelle débute à la puberté, quand l'animal a atteint 40 à 50% de son poids adulte, puis elle est marquée par cette activité cyclique.

C'est la période de maturité folliculaire au niveau de l'ovaire, suivie de l'ovulation, c'est l'oestrus qui dure de 6 à 30 heures, et se caractérise par des chevauchements de ses compagnés, l'acceptation passive de la monte par un taureau ou une vache, et par l'écoulement de mucus. L'ovulation ou ponte ovulaire a lieu 6 h à 14 h après la fin de l'oestrus et est suivie par la formation du corps jaune et l'installation d'un état pré-gravidique de l'utérus, correspondant à la période d'installation de la fonction lutéale.

II.2. Mécanisme endocrinien du cycle sexuel

Un dialogue hormonal très coordonné s'installe durant un cycle oestral, puisqu'au début d'un cycle, l'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (GnRH) qui stimule juste au dessous de lui la sécrétion par l'hypophyse de FSH et LH. Ces deux hormones se répandent par le sang dans l'organisme. Au niveau de l'ovaire, un follicule (ou plusieurs) se développe et sa thèque interne commence à sécréter l'oestradiol. Cette sécrétion d'oestradiol « prévient » l'hypothalamus qu'il doit intensifier sa sécrétion de GnRH (Drion et al, 2000), ce qu'il fait aussitôt : L'hypophyse à son tour renforce la production de FSH et LH, la FSH est ensuite inhibé par une substance appelée l'inhibine sécrétée par des follicules dominants chez la vache alors que la LH n'est pas influencée, et la thèque interne du follicule intensifie sa sécrétion d'oestradiol "Feedback positif". Il arrive au moment où ce renforcement mutuel (oestradiol GnRH-FSH et LH) aboutit à une telle augmentation du taux de FSH et LH (montée qui sur une courbe forme deux "pics") que l'ovulation se produit.

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

S'il y a fécondation. Le corps jaune est stimulé et devient corps jaune gestatif, et au bout d'un mois, c'est le placenta qui prend le relais des ovaires en sécrétant progestérone et oestrogènes (sauf pour la vache où sa sécrétion est insuffisante alors que le corps jaune qui reste actif jusqu'à la fin de la gestation chez cette espèce) (Peters et Ball, 1987), (Cf figure 5).

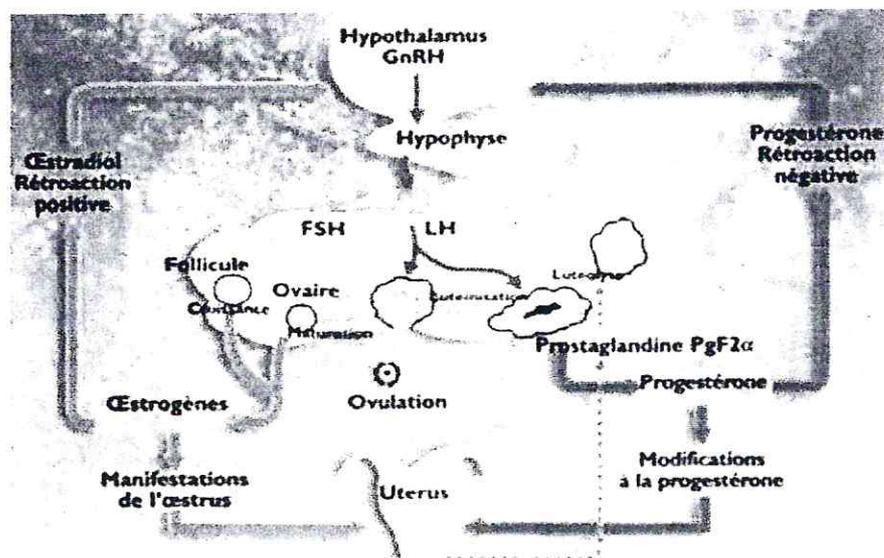


Figure 5 : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Peters et Ball, 1987)

II.3. Le cycle oestrien:

Le fonctionnement sexuel de la femelle est cyclique, exemple chez la vache, tout au long de l'année (la vache n'a pas de rythme saisonnier), l'appareil génital de la vache, les ovaires, les voies génitales, subissent des transformations au cours d'un cycle de 16 à 24 jours, en moyenne 20-21 jours. On distingue dans ce cycle quatre phases:

- **Le proœstrus:** correspond au développement sur l'ovaire d'un ou de plusieurs follicules, et à la sécrétion croissante d'œstrogène (surtout l'oestradiol). Le proœstrus dure en moyenne 3 jours.
- **L'oestrus:** (l'oestrus, du grec oistros, fureur, transport de désir, œstrogène signifie donc "qui provoque l'oestrus", c'est l'hormone qui stimule le désir sexuel), ou "chaleur", correspond à la maturation d'un follicule et à la sécrétion maximale d'oestrogènes. Les chaleurs de la vache dure en moyenne 18 heures, dont le déroulement peut être divisé en 3 phases :

a. phase de préparation :

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

b. phase de chaleurs vraies:

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

c. phase de fin de chaleurs:

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

Donc, on définit l'oestrus comme l'ensemble des modifications physiologiques accompagnants l'ovulation, alors que les chaleurs sont les manifestations extérieures de l'oestrus, manifestations visibles ou non par l'éleveur, selon les espèces, les chaleurs se manifestent différemment.

- **Le postœstrus:** débute par l'ovulation et se caractérise par la formation du corps jaune et la sécrétion croissante de progestérone, hormone qui "prépare la gestation", il dure en moyenne 8 jours.
- **Le dioestrus:** en cas de non gestation, on assiste à une régression du corps jaune, et

la chute de sécrétion de la progestérone ; il dure lui aussi environ 8 jours.

Enfin, en cas de gestation, l'embryon et le placenta peuvent sécréter des hormones à action LH, qui entretiendront la sécrétion de progestérone par le corps jaune. On dit que ces hormones sont lutéotropes. Chez certaines espèces, le placenta sécrète également des oestrogènes et de la progestérone, allant jusqu'à prendre le relais du corps jaune, c'est le cas chez la femme, mais également la brebis, et dans une moindre mesure chez les autres espèces.

II.4. Modification morphologique de l'utérus:

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

- ◆ **Le pro oestrus :** l'épithélium de l'endomètre s'épaissit, se vascularise, des vaisseaux sanguins minuscules s'y développent, et se garnit d'abondantes glandes tubulaires. Dans le col, largement entrouvert (1 cm de diamètre) un mucus particulier, le mucus cervical ou glaire cervical commence à se liquéfier.
- ◆ **L'oestrus:** l'utérus poursuit sa congestion, le col s'ouvre d'avantage (2cm environ) et le mucus cervical liquéfié apparaît à l'extérieur de la vulve de la vache en longs filaments. Pendant le pro oestrus et surtout l'oestrus, la paroi musculaire de l'utérus est parcourue de contractions qui deviennent maximales sitôt l'ovulation, ces contractions ont pour but de favoriser la remontée éventuelle des spermatozoïdes.
- ◆ **Le post oestrus:** l'action de la progestérone accentue les modifications utérines dues à l'oestradiol, la muqueuse de l'endomètre se développe au maximum. Enfin de période, les glandes tubulaires de l'utérus sécrètent un liquide blanchâtre, le lait utérin, dont la sécrétion s'intensifiera s'il y'a gestation, particulier aux ruminants, joue un rôle dans la nutrition du fœtus. Dans le col qui se ferme, le mucus cervical s'épaissit et ne coule plus. A mesure que la progestérone prédomine sur les oestrogènes, les contractions de l'utérus se calment et disparaissent en fin de période, condition nécessaire pour l'éventuelle nidation de l'embryon.
- ◆ **Le dioestrus :** enfin, la chute du taux de progestérone entraîne la régression de corps jaune mais sans rupture, cette chute de la sécrétion de progestérone par le corps jaune est accentuée en fin de cycle par une décharge de $\text{PGF}_2\alpha$ sécrété par l'utérus. Le col se ferme hermétiquement par un bouchon de mucus cervical épais, qui en cas de gestation, prend la consistance du caoutchouc

III. Maîtrise des cycles sexuels chez la vache

III.1. Introduction :

La maîtrise de la reproduction présente plusieurs avantages considérables. Elle permet de choisir la période de mise bas, de diminuer les périodes improductives, d'optimiser la taille de la portée et enfin d'accélérer le progrès génétique.

C'est également un outil de base indispensable à la mise au point de nouvelles

biotechnologies de l'embryon ou de conservation du patrimoine génétique. Le contrôle de la durée du cycle sexuel s'appuie sur deux principes :

- le contrôle de la croissance folliculaire
- le contrôle de la durée de vie du corps jaune ou de la phase d'imprégnation progestéronique.

De nombreuses hormones utilisées seules ou associées, permettent de synchroniser et parfois d'induire l'ovulation afin d'obtenir une fécondation en inséminant sur chaleur observée ou à l'aveugle à des moments bien précis après l'arrêt du traitement (Grimard et al, 2003).

III.2. Méthode de synchronisation de l'oestrus :

Les méthodes utilisées sont basées sur deux principes :

- Blocage du retour normal de l'oestrus et ovulation par l'utilisation de P_4 ou de ses dérivés.
- Raccourcissement de la phase lutéale par l'utilisation d'agent lutéolytique.

III.2.1. Méthode basée sur la progestérone seule ou sur ses dérivés (progèstagènes) :

III.2.1.1. Nature des progèstagènes :

Les progèstagènes possèdent des molécules de même structure chimique : noyau cyclopéridrophanthène. Plusieurs progèstagènes existent.

- ◆ L'acétate de mélangestrol (MGA).
- ◆ La chlormadinone (CAP).
- ◆ La dihydrogestérone acétophénide (DHPA).
- ◆ Le norgestomet.
- ◆ Acétal de fluorogestone (FGA).

III. 2.1.2. Méthodologie d'utilisation des progèstagènes :

III.2.1.2.1. Les implants :

Implant de silicone contenant 6 mg de Norgestomet (Synchro- Mate - B, ceva laboratories) ou 3 mg de Norgestomet (pour Cristar ; intervet). Au moment de la pose de l'implant une dose de 3 mg de Norgestomet et 5 mg de valérate d'oestradiol est administrée par voie IM (Gordon, 1996).

L'implant est inséré en sous cutané sur la face externe de l'oreille à l'aide d'un trocart, le retrait se fait 9 à 10 jours après.

III.2.1.2.2. PRID (progestérone relasing Inter- vaginal Device) :

Ce dispositif comportant une lame métallique de 30 cm de long, 3 cm de large, recouvert de silicone (élastomère) imprégné de 1,55g de progestérone, de plus, il dispose d'une capsule de gélatine contenant 10mg de benzoate d'oestradiol.

III.2.1.2.3. CIDR (controled internal Drug Release device):

Progestérone d'insertion (1,99), est un dispositif proposé pour la première fois par des équipes Néozlandaises ; la mise en place se fait au niveau de la cavité vaginale. Ce dispositif est facile mettre en place par rapport aux autres dispositifs (implant ou spiral).

Employé lors de la synchronisation d'oestrus chez des receveuses dans les programmes de transfert embryonnaire.

III.2.2. Méthodes d'utilisation de la PGF2 α seule ou ses analogues :

III.2.2.1. Principe de base :

L'action lutéolytique de la prostaglandine ne peut s'exercer qu'en présence d'un corps jaune (entre le 7^{ème} et le 8^{ème} jours du cycle). Sur le plan physiologique l'administration de prostaglandine en phase dioestrals s'accompagne des modifications suivantes dans 90 % des cas.

- Arrêt de synthèse de progestérone au bout de 02 heures ; progestéronemie basale au bout de 24 heures.
- Régression anatomique de corps jaune au bout de 2 à 3 jours et croissance du follicule.
- Augmentation d'oestradiol 3 jours après l'injection ; apparition d'oestrus 72 heures après.
- Libération pré-ovulatoire de LH au début de chaleur.
- Oestrus comportemental (8 - 18 heures).
- Ovulation 24 à 30 heures après le début de l'oestrus.

III.2.3. Association thérapeutique, traitement combiné dans le contrôle d'oestrus

III.2.3.1. Association œstrogène , progestérone , eCG :

Deux dispositifs diffusant les progestérones sont disponibles : l'implant Crestar, le spiral vaginal PRID, ces dispositifs sont mis en place pendant 9 - 12 jours. Le traitement est complété par l'administration d'un œstrogène (injection de 5 mg de valérate d'oestradiol par voie intramusculaire dans le cas du Crestar ; capsule contenant 10 mg de benzoate d'oestradiol associée au dispositif intra vaginal pour le PRID, et d'une surcharge de progestérone dans le cas de Crestar (3 mg de Norgestomet par voie IM) (figure 5).

L'association oestradiol plus progestérone agit à la fois sur la croissance et sur la durée de vie du corps jaune (Chupin et al, 1974).

L'association d'oestradiol plus progestérone en début de traitement exerce une rétroaction négative et diminue les concentrations circulantes de FSH (effet des œstrogènes) et LH (effet de progestérone) provoquant l'atrésie de follicule dominant. Ceci permet le redémarrage d'une nouvelle vague de croissance folliculaire 3 à 5 jours plus tard.

Après le retrait du dispositif, les ovulations sont mieux synchronisées et la fertilité est meilleure qu'en l'absence d'œstrogènes. Cette action sur la croissance folliculaire est plus importante avec les fortes concentrations plasmatiques atteintes par les injections d'œstrogènes (Chupin et Saumande, 1981).

L'administration chronique de progestérone permet d'augmenter le nombre de récepteurs à LH présents sur le follicule dominant et sa sensibilité au pic de la LH qui va précéder l'ovulation. Cette sensibilité à LH persiste sur le corps jaune après ovulation puisque l'imprégnation par la progestérone diminue la fréquence des phases lutéales courtes observées lors d'induction d'ovulation chez les vaches en œstrus avant traitement, (Riviera et al., 1998).

Enfin, les œstrogènes favorisent l'absorption vaginale de la progestérone, ce qui permet d'atteindre des concentrations élevées en début de traitement avec les spirales vaginales PRID sans injection supplémentaire de progestérone (Roche et Ireland, 1981) Une injection d'eCG (équine chorionic gonadotrophine, anciennement PMSG) est conseillée au moment du retrait du dispositif surtout si les vaches sont en œstrus avant le traitement (100 à 600 UI selon l'âge, le type génétique et la saison).

L'effet FSH, LH et de l'eCG va soutenir la croissance folliculaire terminale, la production endogène d'œstrogène et va favoriser l'ovulation (Chupin et al, 1977). L'association œstrogène-progestérone-eCG est alors susceptible d'induire l'ovulation chez les animaux non cyclés avant traitement, l'injection d'eCG n'est pas indispensable si les animaux sont cyclés avant les traitements comme c'est le cas la plupart des temps chez les génisses et les vaches laitières. Après le traitement de synchronisation, 85 % environ des vaches qui expriment des chaleurs le font entre 36 et 60 H. Il est alors possible d'inséminer en aveugle une fois 56 h après retrait ou deux fois 48 h et 72 h après le retrait chez les génisses, cet intervalle est plus court (Beal et al, 1984) et moins variable : on conseille de les inséminer une seule fois 48 h après le retrait (Cf figure 6).

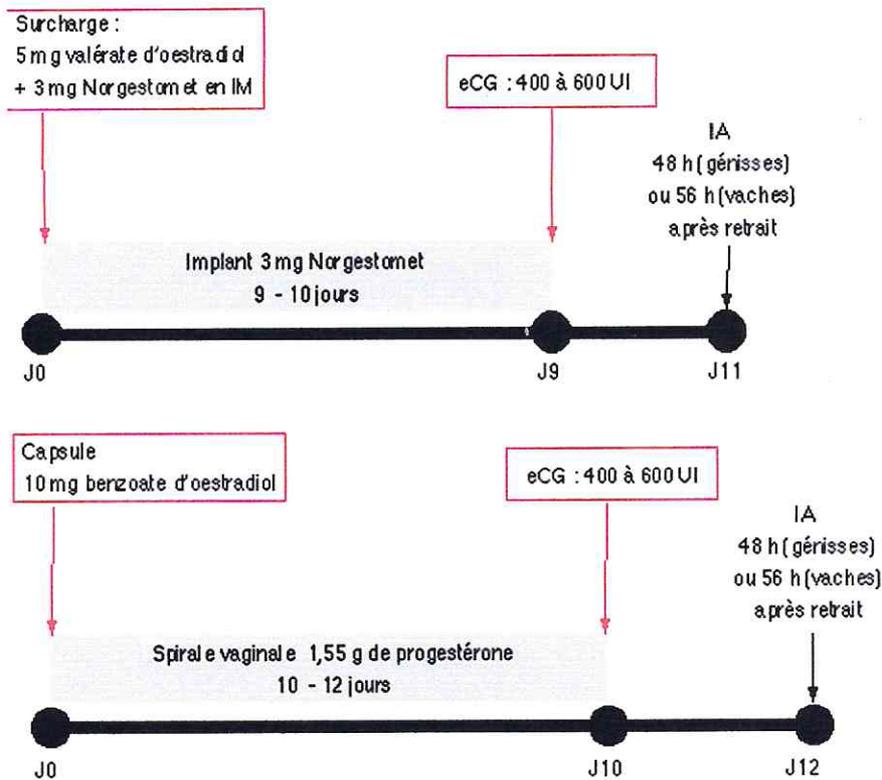


Figure n°6 : Protocoles de synchronisation à base de progestagène (Drion et al, 2000).

III.2.3.2. Association progestérone et prostaglandine :

Lorsque les progestagènes sont associées à une injection de $\text{PGF}_2\alpha$, 24 à 48 h avant ou lors du retrait du dispositif, la synchronisation des chaleurs et la fertilité sont meilleures (respectivement 63 à 98 % et 42 à 66 %) que celle des témoins. Dans ces conditions le dispositif n'est laissé en place que durant 7 à 9 j (Hanzen et Laurent 1991,) et l'injection $\text{PGF}_2\alpha$ est indispensable pour induire la lutéolyse.

L'association progestagène $\text{PGF}_2\alpha$ montre un avantage chez les animaux cyclés ou non, chez les non cyclés, elle induit l'oestrus dans 66 à 65 % et jusqu'à 87 % des vaches (Gonzales al, 1975) avec une fertilité similaire à celle des animaux cycliques.

L'administration de $\text{PGF}_2\alpha$ en fin de traitement inducteur contribue à raccourcir les délais d'apparition de chaleurs induites en augmentant le degré de synchronisation (Hanzen et Laurent, 1991), ont montré un traitement par le spiral vaginal (PRID) associé à une dose lutéolytique de $\text{PGF}_2\alpha$ à 48 h avant le retrait du dispositif que 90 % des animaux ont été observés en oestrus dans les 5 j après le retrait du dispositif.

III.2.3.3. Association progestagène - GnRH - prostaglandine :

La GnRH est administrée au début du traitement inducteur le même jour de la pose de l'implant suivie 7 jours après par une injection de $\text{PGF}_2\alpha$ (Thompson et al, 1999).

La GnRH utilisée dans ce protocole induit l'ovulation du follicule dominant et l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire d'une part et d'autre part elle augmente la

concentration de progestérone plasmatique 4 j après le traitement, par conséquent, une augmentation du taux de synchronisation et de conception des vaches traitées car des études ont montré qu'il y a une relation entre les fortes concentrations plasmatiques en progestérone en fin de l'oestrus et le taux de réponse de vaches à l'insémination (Rosemberg et al, 1990).

III.2.3.4. Association GnRH / PGF2 α :

L'idée de synchroniser la folliculogénèse avant l'administration le PGF2 α a amené à utiliser le GnRH. Le protocole, maintenant classique consiste à :

L'injection de GnRH à j₀, de la PGF2 α 7 jours plus tard, et la GnRH 48 h après l'injection de PGF2 α (Tawagiramungu et al, 1994) (Cf figure7).

En fonction du stade de croissance du follicule dominant, le GnRH provoque soit l'atrésie, soit l'ovulation ou la lutéinisation des grands follicules présents dans l'ovaire au moment du traitement et une nouvelle vague de croissance folliculaire émerge dans les trois à quatre jours.

Une injection de PGF2 α pratiquée 7 jours après la 1^{ère} injection du GnRH entraîne la lutéolyse au moment où un follicule dominant est présent et celui-ci devient pré-ovulatoire.

L'injection de GnRH réalisée 48 h après l'injection de PGF2 α provoque un pic de LH et l'ovulation 24 à 32 h plus tard pour 87 à 100 % des vaches (Pursley et al, 1998).

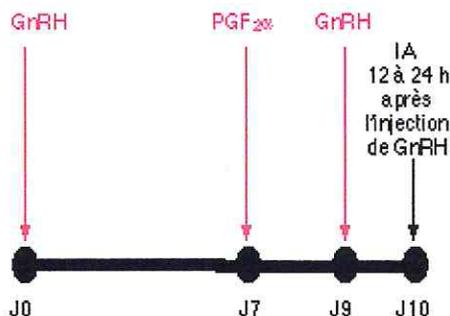


Figure 7 : Protocole de synchronisation associant GnRH et prostaglandine F2 α (Ovsynch). (Drion et al, 2000)

III.2.4. Gonadolibérines :

L'utilisation de GnRH dans la maîtrise de l'activité ovarienne de la vache a fait l'objet de nombreux travaux dont les résultats sont parfois contradictoires (Leslie, 1983). Durant la période post-partum, la sensibilité hypophysaire à l'action de GnRH. augmente progressivement, elle apparaît 10 jours après vêlage chez la vache laitière. Lors d'anoestrus vrai confirmé par dosage de progestérone plasmatique, l'injection de GnRH (0,5mg) à 10 jours d'intervalle, à partir de 70 j post-partum, permet de raccourcir de façon significative l'intervalle de vêlage - 1^{ère} insémination (IA) par rapport à des animaux témoins ne recevant aucun traitement (respectivement $88,9 \pm 9$ et 101 ± 21 jours) d'après Humblot et Thibier (1980).

Une synthèse bibliographique de Morgan et Lean (1993), indique que l'administration de GnRH ou d'analogue le jour d'IA ou juste avant l'oestrus permettrait d'augmenter globalement le taux de gestation d'environ 12,5 % chez la vache normale et d'environ 22,5 % chez des vaches repeat-breeders. Cependant, ces valeurs moyennes recouvrent des résultats très variables, la fertilité étant parfois plus faibles chez les animaux traités que chez les témoins.

D'après Morgan et Lean (1993), La GnRH administrée en milieu de phase lutéale augmente la durée de vie du corps jaune, la progestéronémie et induit la lutéinisation ou l'atrésie du follicule dominant conduisant à une diminution de la sécrétion d'oestradiol. Par ces effets ; la GnRH pourrait diminuer la mortalité embryonnaire en particulier dans le cas où, le signal anti- lutéolytique serait retardé ou faible.

L'administration de la GnRH en milieu de phase lutéale, c'est-à-dire 11 à 14 jours après l'insémination artificielle, n'augmenterait pas de façon significative le taux de gestation.

IV. La fécondation et le développement embryonnaire :

IV.1. La fécondation :

La Fécondation est la fusion du gamète male avec le gamète femelle. Cette fusion aboutit à la formation d'une cellule unique : le zygote (ou embryon de stade 1 cellule). Elle a lieu dans l'ampoule de l'oviducte chez les mammifères.

La fécondation est donc précédée par la libération de l'ovule : c'est la ponte ovulatoire ou ovulation et la libération des spermatozoïdes ou éjaculation.

Les spermatozoïdes de mammifères sont incapables de féconder l'ovule tant qu'ils n'ont pas subi un processus appelé capacitation. Ce processus est induit par les sécrétions des voies génitales femelles dans lesquelles ils doivent séjourner quelques heures pour que cela s'accomplisse. La capacitation n'entraîne aucun changement morphologique. Elle consiste en l'enlèvement d'un facteur décapacitant, de nature vraisemblablement glycoprotéique, déposé à la surface du spermatozoïde lors de son transit épидидymaire.

Ce facteur aurait pour fonction de stabiliser la membrane plasmique en interagissant avec les phospholipides membranaires. Cette capacitation entraîne :

- une activation de la motilité du spermatozoïde.
 - L'augmentation de sa captation d'O₂.
 - L'induction de la réaction acrosomiale par déstabilisation des membranes plasmiques et acrosomiale externe.
- Une fois que les spermatozoïdes ont le pouvoir après capacitation, ils vont à la rencontre de l'ovule au niveau de la partie supérieure de l'oviducte où se produira chez les mammifères, les différentes étapes de la fécondation. Chez la vache, le cumulus entourant l'ovule pondu se disperse rapidement après l'ovulation ce qui permet aux spermatozoïdes d'être en contact direct avec la zone pellucide (Crozet, 1991).

- Le spermatozoïde s'y fixe par un récepteur à une glycoprotéine sulfatée de la zone pellucide : la ZP3. La zone pellucide possède trois types de protéines : la ZP1, la ZP2 et la ZP3. La ZP3 aurait deux fonctions : induire la réaction acrosomiale par sa composante peptidique et assurer la fixation du spermatozoïde par sa composante hydrocarbonée. Une fusion en plusieurs points de la membrane plasmique et la membrane acrosomiale externe donne lieu à la formation de plusieurs petites vésicules produisant des fenestrations permettant au contenu de l'acrosome d'être libéré. Le spermatozoïde se débarrasse de ces vésicules et pénètre obliquement la zone pellucide. Ce phénomène est facilité par la motilité spermatique et l'action de la hyaluronidase ainsi que l'acrosine qui est capable d'hydrolyser partiellement certaines glycoprotéines de la zone pellucide (Dunbar et al, 1985).
- Dans l'espace péri vitellin, le spermatozoïde se trouve ensuite en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte et la fusion des deux gamètes se produit.
- Seul les spermatozoïdes ayant subi une réaction acrosomiale peuvent effectuer cette opération et grâce à la portée de la membrane plasmique restant au niveau du segment équatorial.
- Une série de changements métaboliques et membranaires se produit suite à la fusion des gamètes conduisant à l'expulsion du deuxième globule polaire, l'exocytose des granules corticaux et quelques modifications corticales de l'ovocyte. Le noyau du spermatozoïde est incorporé dans le cytoplasme de l'œuf, les pronoyaux se forment et migrent vers le centre de l'ovocyte, le zygote est ainsi formé.

IV.2. Développement embryonnaire durant le stade libre :

Cette phase se situe entre la fécondation et la migration du zygote à l'intérieur des trompes utérines, en d'autre terme ce stade correspond à l'étape morula. Chez la vache, si deux œufs sont pondus par le même ovaire, un survivra dans la corne utérine correspondante. Si les deux ovaires ont pondu en même temps un ovule, ces deux ovules peuvent survivre, l'un dans chaque corne. Il y aura gestation gémellaire (Callessen et al, 1997). L'œuf résultant de la fécondation commence aussitôt à se diviser : deux, quatre, huit puis seize cellules, toujours entouré de la zone pellucide. Ce petit amas qui n'a fait que diviser le cytoplasme de l'ovule sans augmenter de volume ressemble, au microscope, à une petite mûre, morula en latin. Cette phase de maturation ovocytaire est atteinte in vitro par 85% des ovocytes mis en culture.

In vivo, le développement et la maturation des ovocytes sont complètement achevés dans les follicules, la chronologie du développement est rapportée dans le tableau 1 (Menezo et al, 1982)

Tableau 1 : Chronologie du développement de l'embryon bovin (Menezo et al,1982)

Jours	Heures	Evènements
0	0	Début des chaleurs
0	7	Libération de LH pendant 8 à 12 heures
0	15	Insémination
1	30	ovulation
1	35	Fécondation
2	50	Stade 2 cellules
2	55	Stade 4 cellules
3	75	Stade 8 cellules
4	100	Stade 16-32 cellules
5	120	Passage de l'embryon dans l'utérus
6	130	stade 30-64 cellules (Morula)
7	150	Stade jaune blastocyste
8	200	Stade blastocyste
10		Sortie de Pellucide
11		Début de la phase d'élongation
22		Premiers accolements entre le coceptus et l'endomètre
35		Implantation
40-50		Fin de l'organogenèse

IV.2.1. Les premiers stades de l'embryon :

Après la fécondation, l'œuf ou zygote se segmente. Cette première division au stade deux cellules survient entre 10 et 20h selon les espèces de mammifères, ce qui est relativement lent si l'on considère 6000 cellules. Chez la vache, le stade morula a lieu au 5^{ème} jour de gestation et le stade blastocyste au 6^{ème} jour. La deuxième division (stade 4 cellules) est légèrement asynchrone et se traduit par l'existence d'un stade intermédiaire de 3 cellules pendant 1 ou 2h jusqu'au stade 8 cellules, les divisions sont égales, mais s'effectuent sans régularité (Scriban, 1999), (Cf figure 8).

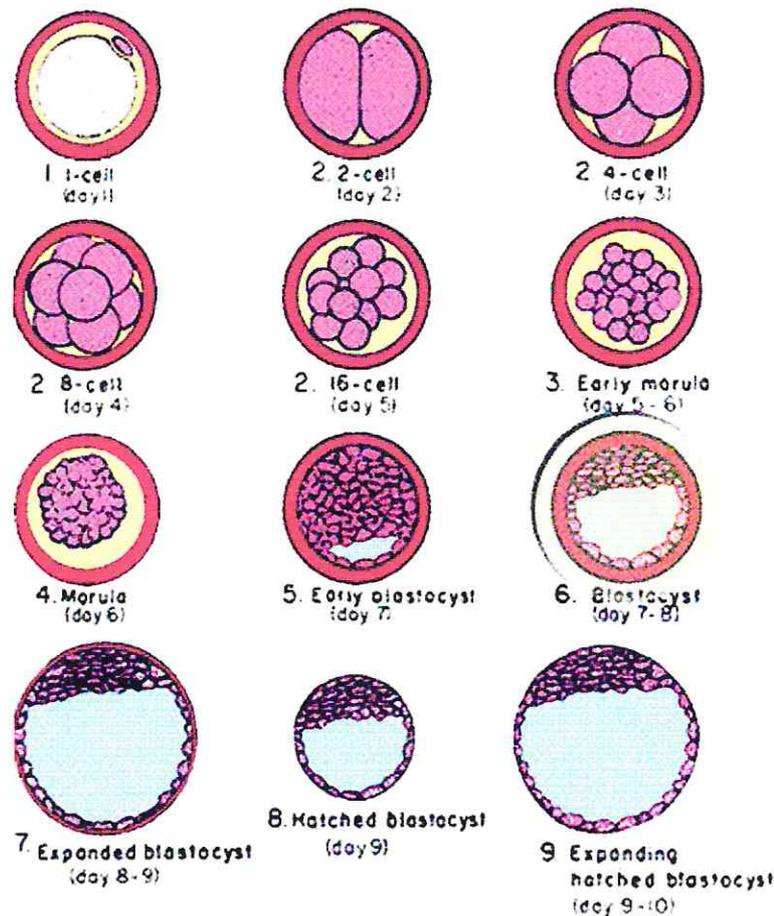


Figure 8 : Correspondance de l'état d'évolution de l'embryon avec son age (Peters et Ball, 1994)

IV.2.2. La Totipotence embryonnaire :

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

IV.2.3. La compaction embryonnaire :

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

IV.2.4. Les facteurs de reconnaissance d'une gestation :

Vers le 9-10^{ème} jour, le blastocyste sort de sa zone pellucide, commence sa pré-implantation qui durera jusqu'au 35-40^{ème} jour chez la vache ou elle sera définitive. C'est l'embryon qui indique sa présence à l'organisme dès le 11^{ème} jour suivant la fécondation en sécrétant la trophoblastine qui empêchera l'utérus de sécréter la prostaglandine F2 α et permettra ainsi au corps jaune cyclique de perdurer et de devenir corps jaune gestatif actif jusqu'en fin de gestation (Chene et al, 1996). La période critique pour maintenir de la gestation se situe avant l'implantation ou nidation définitive. La mortalité embryonnaire précoce (75% des cas) a lieu avant le 16^{ème} jour et se traduit par un retour de chaleur normal 21-24 jour après l'insémination artificielle. Une mortalité embryonnaire plus tardive (25% des cas), entre 16 et 45 jours, se traduit par des retours en chaleurs irréguliers, ne correspondant pas à un cycle. Après 45 jours, la nidation est effective, le fœtus a de fortes chances d'aller jusqu'au bout de la gestation. Les avortements sont plus rares que la mortalité embryonnaire ; d'ailleurs la très grande majorité des avortements embryonnaire ont lieu durant la phase libre de l'embryon, c'est-à-dire jusqu'à l'implantation (J₁₉ chez le bovin), (Chene et al, 1996). Donc, le contrôle de l'environnement progestéronique utérin, qui est nécessaire au développement de tout embryon de mammifère, a été depuis longtemps appelé par les anglo-saxons « maternal recognition of pregnancy » qui veut dire ; la reconnaissance maternelle de la gestation (Chene et al, 1996).

CHAPITRE II

SUPEROVULATION ET TRANSFERT

EMBRYONNAIRE

CHAPITE II : SUPEROVULATION ET TRANSFERT EMBRYONNAIRE**I. Introduction**

La transplantation embryonnaire est une méthode de reproduction qui consiste, dans un premier temps, à prélever après stimulation hormonale les embryons d'une femelle dite donneuse. C'est la collecte des embryons pour, dans un second temps, les transplanter dans l'utérus de femelles dites receveuses. C'est le transfert des embryons.

Dans l'espèce bovine, la transplantation embryonnaire est une technique utilisée depuis plus d'un quart de siècle. Elle est aujourd'hui largement diffusée. En 2000, des équipes de transplantation agréées ont réalisé en France 6716 collectes pour récolter en moyenne 9,31 embryons par collecte dont 5,40 embryons transférables. Au total, 34062 embryons ont été récoltés, 12347 embryons ont été transférés et 1237 embryons ont été stockés (Guérin, 2001).

Cependant, la production des embryons, pour des raisons diverses, reste le facteur limitant du transfert embryonnaire. En effet, les résultats n'ont que très peu évolué depuis plus de 10 ans. La réponse aux traitements de superovulation est très variable (entre 0 et 50 embryons produits par collecte), (Guerin, 2001).

II. La superovulation

On définit le phénomène de superovulation comme une réaction ovarienne produisant un développement et un nombre d'ovulation au-delà du standard moyen de l'espèce, à titre d'exemple un taux d'ovulation supérieur à deux chez les bovins (Nibart, 1991, Saumande, 1995).

L'un des problèmes majeur de tout programme de transfert d'embryons est la variabilité de la réponse au traitement de superovulation, celle-ci varie fortement d'un individu à un autre et chez le même animal d'un traitement de superovulation à un autre. Les intervenants dans cette grande variabilité sont multiples et variés. Ils sont liés à l'individu, au milieu, à l'alimentation et à l'extrait hormonal utilisé.

La stimulation ovarienne par les hormones hypophysaires permet d'obtenir une augmentation de la quantité de follicules pré-ovulatoires et par suite une augmentation du nombre d'ovulation, cette technique est surtout utilisée pour obtenir d'avantage d'embryons lors des transferts embryonnaires. Les hormones gonadotropes sont injectées chez la vache pendant la phase lutéale dont la durée est contrôlée par les prostaglandines, on a longtemps utilisé de la PMSG à forte dose chez les ruminants mais actuellement, on préfère l'utilisation d'extraits hypophysaires dont le rapport LH/FSH est contrôlé.

II.1. Les hormones utilisables:

La plus part du temps, la stimulation de l'ovaire débute entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle (J₀: oestrus), celle-ci se situe au moment du démarrage d'une vague de croissance folliculaire. Deux hormones gonadotropes sont utilisables pour les traitement de super-ovulation : l'une chorionique, la PMSG appelée également eCG ; l'autre d'origine hypophysaire, la FSH

II.1.1. Choix de l'hormone de superovulation:

De nombreuses études comparant l'efficacité de la PMSG à celle de la FSH étaient très encourageants mais pas toujours reproductibles.

Cette variabilité dans les résultats peut s'expliquer par la diversité des protocoles de superovulation (dose administrée, rythme des injections) et par une grande variabilité du rapport LH/FSH des préparations commerciales.

II.1.2. L'utilisation de la PMSG:

Le sérum de jument gravide contient une gonadotrophine de structure glycoprotéique présente dans le sang de jument entre le 40^{ème} et 130^{ème} jour de gestation (PMSG), c'est l'unique hormone possédant les deux activités biologiques de la FSH et de la LH, elle est sécrétée par des cellules du trophoblaste qui envahissent l'endomètre maternel entre le 36^{ème} et le 40^{ème} jour d'où le nouveau nom de eCG (Gordon, 1996).

En effet, la PMSG peut induire la formation d'anticorps, plusieurs études ont permis de trouver la possibilité de prévenir une stimulation excessive de l'ovaire (contenant de nombreux follicules anovulatoires) et de réduire le taux d'oestradiol par l'utilisation de l'anti-PMSG après le début de l'oestrus chez les superovulées (Saumande et al, 1984).

➤ Le protocole de traitement

L'eCG est administrée par voie IM à la dose de 2500 à 3000 UI (Sreenan et Beehan, 1976) durant la phase lutéale entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour. La longue demi vie de la PMSG peut donner des embryons de mauvaise qualité. En effet ,après le pic préovulatoire et l'ovulation, les niveaux de eCG restant élevés et maintiennent le développement de follicules qui ne pourront pas ovuler mais perturberont l'environnement hormonal pendant la fécondation (Almeida et al,1987). Pour cet effet néfaste, Dhont et al (1978) préconise l'utilisation d'un sérum anti-PMSG.

Une injection de prostaglandine deux jours après l'administration de eCG, permet d'arrêter la phase lutéale et induit le retour des chaleurs au cours desquelles deux inséminations sont pratiquées (Chupin et Sammande, 1979).

L'injection d'anti-PMSG par voie IV, 5 et 6 h après le pic pré-ovulatoire à dose unique équivalent à 1800 UI est capable de neutraliser l'action résiduelle de PMSG au

moment de la deuxième insémination (Wang et al, 1987; Zeitoun et al, 1988), (Cf figure 9 et 10).

- Cycle normal

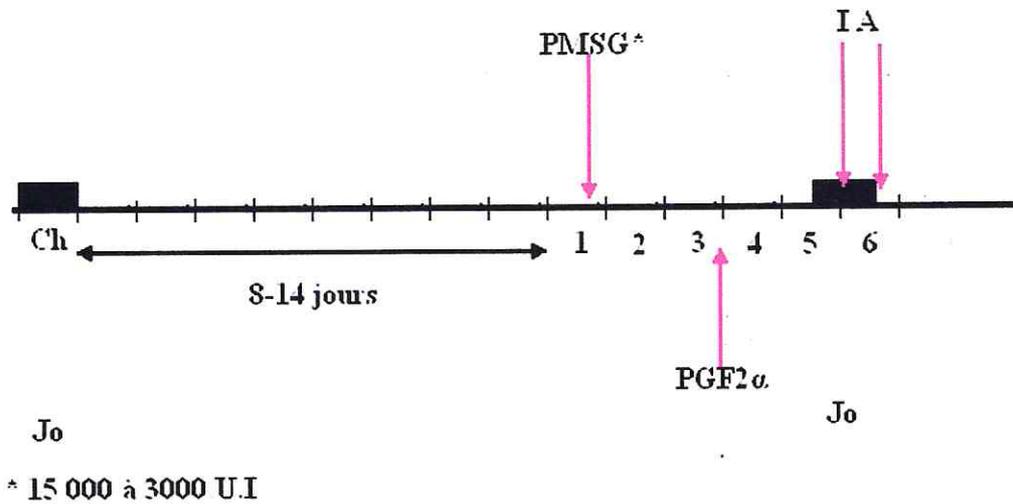


Figure 9 : Schéma du traitement à la PMSG sur chaleurs naturelle (Chupin, 1988)

- Cycle maîtrisé

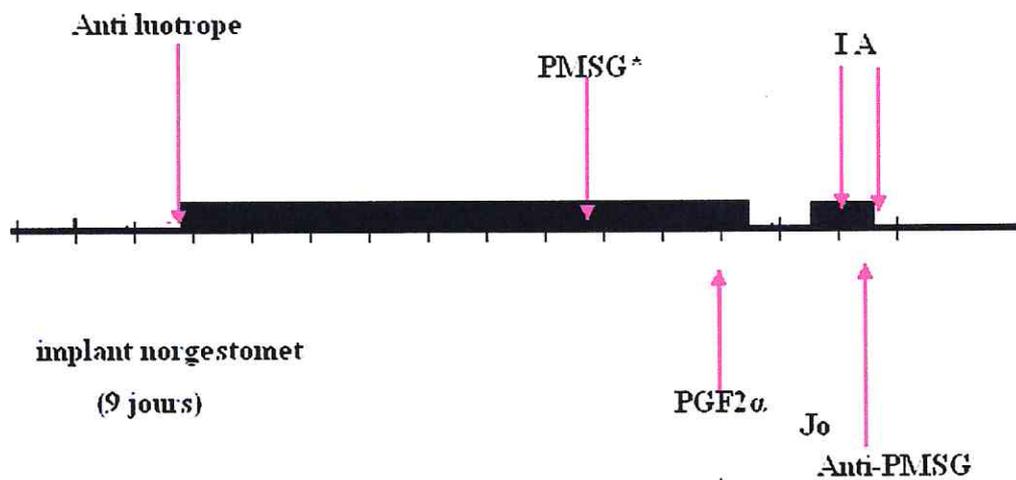


Figure 10: Schéma du traitement à la PMSG sur cycle maîtrisé (Chupin, 1988)

II.1.3. Follicule stimulating hormone FSH :

Le traitement utilisé dans la plupart des superovulations est basé sur l'utilisation de FSH-P (FSH d'origine porcine) administrée en 8 injections en doses décroissantes à 12 heures d'intervalle. Une injection de cloprostenol (0.5 à 1mg par voie intramusculaire) est réalisée à la 5^{ème} injection, (Humblot et al, 1994).

II.1.3.1.Effet du rapport LH/FSH :

Les variations du rapport LH/FSH des différentes préparations de gonadotrophines sont une cause importante de la grande variabilité de la réponse ovarienne.

Une faible réponse ovarienne peut résulter d'un dérèglement dans la maturation ovocytaire et de l'équilibre endocrinien. Les travaux de Donaldson, (1987) ont montré que les faibles taux de fécondation obtenus avec la FSH-P seraient imputables à la quantité de LH présente en association avec FSH non aux nombres d'IA effectués.

Les préparations de FSH hautement purifiées induisent moins d'ovulation que les préparations complémentées en LH. Par conséquence, il existe un certain seuil de LH en dessous duquel il ne faut pas descendre sous peine de ne pas obtenir d'ovulation.

L'évaluation comparative de la réponse à une stimulation chez des vaches laitières avec de la FSH purifiée plus moins complémentée en LH ou d'une préparation commerciale fortement contaminée par la LH a montré que la solution à 40% de LH produit plus de corps jaunes et d'ovocytes fécondés, mais aussi plus d'embryons dégénérés, que la solution à 20 % de LH et la solution commerciale d'après Lucas Hahn et Niemann (1991) (Cf tableau 2).

Tableau 2 : Effet du rapport LH/FSH sur la production d'embryons
(Lucas. Hahn et Niemann, 1991).

Résultats par donneuse	FSH purifiée + 40% LH (0.423 UI)	FSH purifiée + 20% LH (0.069 UI)	FSH purifiée + 80% LH (8.5 UI)	p
Nombre moyen de corps jaunes	12.6 ± 1.1	10.1 ± 0.9	9.0 ± 0.9	<0.05
Nombre moyen d'ovocytes fécondés	5.1 ± 1.3	2.6 ± 0.6	2.7 ± 0.5	<0.05
Nombre moyen d'embryons transférables	3.4 ± 0.6	2.2 ± 0.5	2.2 ± 0.5	<0.05

II.1.3.2. Protocole d'utilisation de la FSH:

a. Dose:

Les doses peuvent s'exprimer en mg équivalents du standard Armour ou en µg de FSH pure (1 mg correspond à 15 µg de P-FSH pure), (Chupin, 1988). La demi-vie de la FSH étant court (20 à 70 min), ce qui contraignait à la répétition des injections lors de traitement de superovulation toutes les douze heures pendant 4 jours.

b. Rythme des injections:

Le rythme des injections est dicté par la courte demi-vie de la FSH porcine (Chupin et Procureur, 1982); en effet 12 heures après injection, elle n'est plus détectable dans le sang (Demonstier et al, 1988), et c'est sur cette base que s'est établi différents protocoles de traitement.

Le rythme des injections est basé sur 2 injections par voie intramusculaire (IM) pendant 4 jours, fractionnement en doses égales ou décroissantes. Il semblerait que les meilleurs résultats soient obtenus lorsque la FSH est injectée 2 fois par jour dans le cou ou en arrière de l'épaule.

Le suivi endoscopique des ovaires pendant les traitement de superovulation a permis une meilleure connaissance des phénomènes de croissance et de dominance folliculaire par conséquent ils ont modifié l'approche globale des phénomènes de superovulation (Cf figure 11).

SUPEROVULATION FSH.P

Superovulation par FSH (NIBART, 1991).

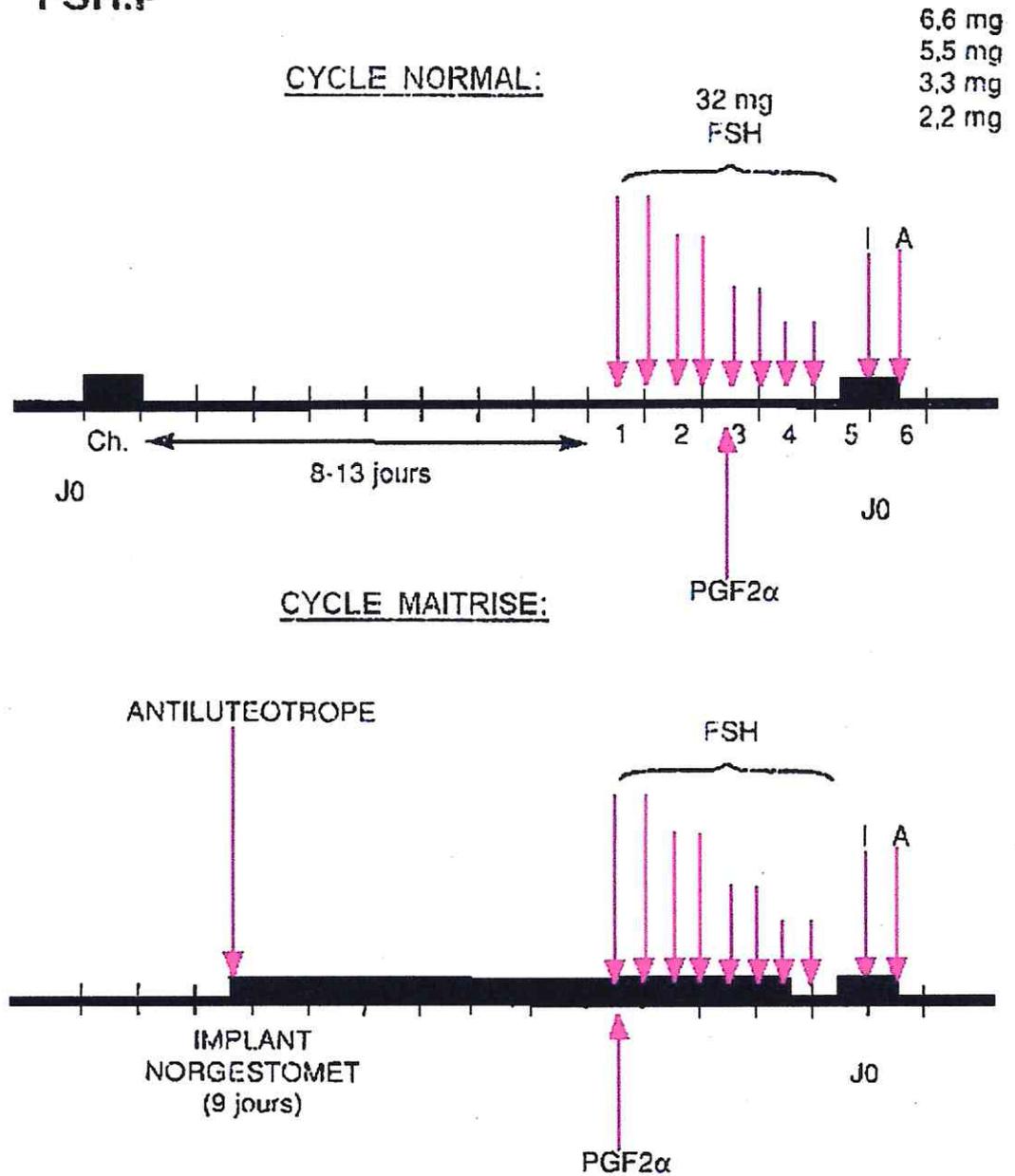


Figure 11 : Protocole de superovulation à la FSH sur chaleurs naturelles et sur cycle maîtrisé (Nibart, 1991).

II.1.4. Moment de la superovulation durant le cycle oestral:

Mapletoft et Pierson (1993) ont indiqué que la détermination de la longueur du cycle est capitale pour les traitements de superovulations. Le moment le plus favorable pour le traitement est celui qui peut être initié durant le cycle oestral d'une vache, coïncidant avec la période d'interphase entre le jour où le premier follicule dominant arrive à son diamètre maximal et celui de l'émergence du second follicule dominant (entre 9^{ème} et 13^{ème} jour).

De plus une injection de PGF₂α à 48h, après le début du traitement induirait une régression lutéale, afin qu'il y'ait une ovulation et manifestation oestrale. Mapletoft et Pierson (1993) ont indiqué que la longueur du cycle est capitale et doit être fournie avec exactitude pour choisir le moment approprié du traitement qui semble être liée à la durée du cycle oestrale, chez les vaches dont le cycle varie entre 21 à 23 jours, le traitement devra commencer au 13^{ème} jour, alors que celles dont le cycle est plus court, c'est-à-dire 18 à 20 jours, le traitement commencera au 10^{ème} jour (Gordon, 1996). Ce n'est pas le jour du début du traitement pendant le cycle qui influence les résultats mais la population folliculaire et la présence ou l'absence de gros follicules au moment de l'initiation du traitement de superovulation (Saumande, 1995).

II.1.5. Effet du follicule dominant sur les résultats de superovulation:

Dans toutes les études, la définition du follicule dominant est très importante afin de pouvoir comparer les résultats. Les critères retenus sont le diamètre et l'augmentation de la taille du follicule (Lee et al, 2000).

Selon, les auteurs; la définition du follicule dominant est différente: la croissance ou la stabilité du plus gros follicules (>9mm de diamètre) pendant 4 jours (Guibault et al, 1991); ou 3 jours (Huhtinen et al, 1992) est la plus couramment retenue.

Cependant, les résultats sont différents quelque peu en fonction de la définition choisie, ce qui explique que certaines comparaisons entre études ne peuvent être interprétées.

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

II.1.6. Synchronisation des vagues folliculaires:

L'élimination du follicule dominant est actuellement la méthode la plus pratiquée pour synchroniser les vagues folliculaires. Selon Kafi et Mc Gowan (1997), la synchronisation de l'émergence des vagues folliculaires pourrait permettre de réduire la variabilité de la réponse à la superovulation.

Une amélioration de la réponse à la superovulation a pu être obtenue suite à l'élimination du follicule dominant (Bungart et al, 1994; Bo et al, 1995).

Cependant, Rajamahendran et al (1992) n'ont pas montré d'effet significatif de la présence ou non d'un follicule dominant.

Dans l'optique de synchroniser l'émergence de la vague folliculaire, Bol et al (1995) ont utilisé de la GnRH pour promouvoir un follicule dominant qui pouvait ensuite être ponctionné 4 jours après la GnRH. Le traitement de superovulation débutait alors 2 jours après la ponction. Pour eux également, ce traitement n'a pas amélioré la production d'embryons transférables, ceci étant dû à l'augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés et d'embryons dégénérés.

Il est évident que le benzoate d'oestradiol diminue le nombre de follicules larges, lors de la récolte d'embryons, la qualité est améliorée, il est visiblement clair que l'utilisation de progestagène combinée avec le benzoate d'oestradiol font mention d'utilité sur le contrôle et la synchronisation des vagues folliculaires et aussi une voie future qui pourrait être utile pour améliorer efficacement les protocoles de superovulation (Gordon, 1996).

III. Insémination artificielle, récolte et examen des embryons

III.1. Insémination artificielle :

Après l'application de traitement de superovulation, la seconde étape à faire est le contrôle de l'oestrus des vaches superovulées, c'est-à-dire le début et la durée de l'oestrus, qui sont des paramètres importants pour déterminer le moment de l'IA (Kanitz et al, 2002).

L'insémination des donneuses en retard et après la fin de l'apparition de l'oestrus, cela influencerait défavorablement sur la récolte des embryons 7 jours plus tard. En France, Slimane et al (1995) ont rapporté, qu'ils ont retrouvé plus d'embryons quand les donneuses superovulées ont été inséminées deux fois pendant l'oestrus ou quand elles sont inséminées en une seule fois à plus de 6 heures après le pic préovulatoire de LH (Gordon, 1996).

III.2. Collecte des embryons

Après fécondation, les embryons sont collectés dans l'utérus, après leur sortie de l'oviducte (J₄-J₅). Pour des raisons sanitaires et de fragilité, la réglementation internationale impose de collecter les embryons encore inclus dans leur zone pellucide donc avant l'éclosion qui a lieu à J₉. La collecte est donc réalisée entre J₆ et J₈ après IA et presque toujours à J₇ (Nibart, 1991).

Les embryons sont collectés par voie cervicale. Une technique chirurgicale est possible mais n'est pas utilisée actuellement chez les bovins (Nibart, 1991). Une sonde est introduite dans l'utérus après nettoyage et désinfection de la vulve. Différentes sondes existent et ont chacune leurs partisans, selon l'habitude de l'opérateur (sonde de Han ou sonde IMV). L'utilisation d'une chemise sanitaire sur la sonde avant son entrée dans le col de l'utérus est recommandée. Un ballonnet gonflable permet de fixer la sonde dans la corne

utérine et d'éviter le reflux du liquide utilisé pour la récolte dans le vagin. Les cornes utérines sont ensuite rincées à l'aide de tampon phosphate PBS. Une anesthésie épidurale basse est parfois réalisée afin de limiter les mouvements de l'animal lors de la manipulation des cornes et pour assurer la sécurité du personnel de collecte (Mapletoft et al,1998).

III.3. Examen et classification des embryons :

Les embryons récoltés au 7^{ème} jour après la suprovulation ou fécondation in vitro se présentent sous des aspects morphologiques divers ; il est important d'en apprécier leurs qualité avant leur transfert. Divers critères ont été proposés, les uns évaluant les caractéristiques morphologiques de la pellucide et des blastomères, et vérifiant si elles sont en accord avec le stade du développement.

- Des valeurs de diamètre externe de l'embryon et de l'épaisseur de la pellucide ont dans ce but été déterminées (Lonergan, 1992), (Cf tableau 3).

Tableau 3 : Diamètre externe (DE) et épaisseur de la pellucide (EP) d'embryon bovins en fonction du stade développement embryonnaire (Lonergan ,1992).

Stade de développement	Nombre	DE (μ)	EP (μ)
2 cellules	13	148	13,7
4 cellules	31	149	14,1
8 cellules	15	149	13,4
J ₆ morula	37	150	14,5
J ₆ morula/jeune blastocyste	18	150	13,1
J ₇ jeune blastocyste	18	158	11,7
J ₇ blastocyste	30	167	9,6
J ₈ blastocyste	46	182	7,6
J ₉ blastocyste	56	200	5,6

- D'autres se basent sur le nombre de cellules identifiées à un stade de développement donné, l'activité enzymatique (test à la FDA : Fluorescéine Di-acétate transformé sous l'action d'estérases présentes dans les cellules vivantes en un composé non fluorescent) ou métabolique (consommation de glucose en culture, synthèse de lactate déshydrogénase) ou encore sur le délai, voire les modalités d'éclosion du blastocyste une fois sa phase d'expansion réalisée.
- Dans la pratique courante, les critères morphologiques sont les seuls utilisés (Eldsen et al, 1978 ; Schneider et al, 1980 ; Shea, 1981 ; Wright et al, 1981). En effet, le principe est basé sur la concordance entre l'aspect morphologique et le stade du développement dont l'appréciation se fait sur la base d'un certain

nombre d'observation qui sont les suivants :

1-La zone pellucide :

- a/ Sphéricité.
- b/ Epaisseur.
- c/ Fissure.

2-Les blastocystes.

- a/ Forme générale.
- b/ Régularité.
- c/ Opacité.
- d/ Structure visibles:trophoblaste, amas interne, blastocœle.

3-Les cellules:

- a/ Aspect des contours cellulaires.
- b/ Variation de taille entre cellules.
- c/ Cellule dans l'espace périvitellin.
- d/ Intégrité des cellules : présence de vacuoles ,dispersion de matériel cellulaire, granulations en périphérie.

L'intervalle entre l'oestrus et le jour de la récolte détermine le stade du développement (Cf Tableau 4). Au jour 6 post-oestrus, l'embryon doit être une morula compacte (tight morula) et doit contenir 50 à 80 cellules de taille uniforme. A 7 jours l'embryon est un blastocyste, il contient une cavité blastocoelique. (Tableau 4)

Tableau 4 : Le stade du développement embryonnaire normal en fonction du jour de l'oestrus (Seidel et al, 1991).

Stade de développement	Jours après l'oestrus
1 Cellule	0 – 2
2 Cellules	1 – 3
4 Cellules	2 – 3
8 Cellules	3 – 5
16 Cellules	4 – 5
Jeune morula	5 – 6
Morula compactée	5 – 7
Jeune blastocyste	7 – 8
Blastocyste	7 – 9
Blastocyste expansé	8 – 10
Blastocyste éclos	9 – 11

Selon Eldsen (1978) ; Kennedy et al (1983) cinq classes d'embryons sont distinguées :

➤ **Classe 1 (excellent) :**

Embryon au stade normal de développement au moment de l'observation : aspect symétrique, blastomères polygonaux formant une masse compacte au stade morula.

➤ **Classe 2 (bon):**

Aspect semblable aux embryons de classe 1 mais de forme asymétrique pouvant contenir des blastomères séparés de l'amas compact des cellules formant la morula. Ils peuvent également présenter un retard de développement par rapport aux autres embryons récoltés sur la même donneuse.

➤ **Classe 3(moyen) :**

Embryons en retard de développement de 1 à 2 jours. Les blastomères sont sphériques et de taille variable au stade morula. On constate la présence de vésicules dans les blastomères. L'aspect de l'embryon est plus sombre ou plus clair que la normale

➤ **Classe 4 (mauvais) :**

Embryon en retard de développement de 2 jours. Les limites cellulaires sont indistinctes.

➤ **Classe 5(dégénérés) :**

La dégénérescence peut parfois être à ce point évidente qu'il n'est plus possible de reconnaître le stade de développement. L'embryon prend parfois une configuration anormale de la transcription ribosomale et de la synthèse des protéines.

En plus de ces différents éléments, on peut aussi distinguer des ovules non fécondées, dans ce cas la zone pellucide est sphérique , l'amas cellulaire est représenté par une seule et grande cellule pycnotique .

Selon Loonergan (1992) la classification repose sur les critères suivants :

- Au stade morula, il est difficile de bien distinguer les différents blastomères. Le tissu embryonnaire occupe la majorité de l'espace périvitellin.
- Au stade d'une morula dite compacte, l'embryon occupe 60 à 70 % de l'espace périvitellin.
- Au stade jeune blastocyste : c'est un embryon présentant un début de cavité blastocoele ; il a un aspect de chevalière. L'embryon occupe 70 à 80 % de l'espace périvitellin .
- Au stade blastocyste, on distingue la masse des cellules embryonnaires et de trophoblaste. La cavité blastocoele est nettement identifiable L'embryon occupe pratiquement tout l'espace perivitellin .
- Au stade de blastocyste expansé : le diamètre de l'embryon a brutalement augmenté (x 1.2 à 1.5) tandis que l'épaisseur de la pellucide s'est réduite de 2/3.

Il existe en générale une corrélation entre l'aspect morphologique des embryons et le développement après transfert, mais il arrive parfois que des embryons classés moyens ou mauvais se développent normalement alors que d'autres classés excellent ne donnent lieu à aucune gestation (Shea, 1981). Cela est illustré par le tableau 5

Tableau 5 : Les taux de gestation des embryons classés dans quatre groupes basés sur la morphologie (Shea, 1981).

Classification	Nombre	% d'embryon	Taux de gestation
Excellent	275	54	63*
bon	153	30	58*
moyen	42	8	31*
pauvre	42	8	12*

* Différence significative à $p < 0,05$.

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons, publiée par l'INRA-UNCEIA (1990) sont exclusivement morphologiques. L'observation de l'intégrité de la zone pellucide, la taille et l'homogénéité de la masse cellulaire incluse dans celle-ci, la formation du blastocœle, du bouton embryonnaire et du trophoblaste permet de juger la viabilité de l'embryon (Cf tableau 6).

Tableau 6 : Classification des embryons selon leur qualité (INRA-UNCEIA 1990)

Classification	Qualité	Description
1	Excellente	-Embryon idéale pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable -Blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact
	Bon	-Embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, -Ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique, -Ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace périvitellin
2	Moyen	Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomères sphériques au stade morula) ou des défauts bien précis comme : - nombreuses échappées dans l'espace périvitellin , des vésicules, des cellules dégénérées , des blastomères de taille variable -Aspect plus clair ou plus sombre qui est normal
3	Médiocre	-Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes, des vésicules grosses et nombreuses ; -Mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable.
4	Morts ou dégénérés	-Arrêt de développement à un stade précoce -Cellules dégénérées

Certains critères d'appréciation des embryons publiée par L'INRA-UNCEIA (1990) sont illustrés dans les figures suivantes :

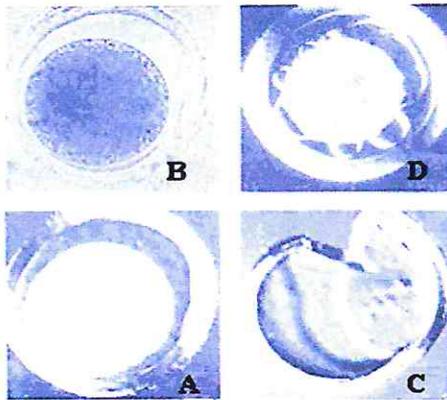


Figure 12 :
A : ovocyte non fécondé récolté 5j après oestrus
B : même ovocyte non fécondé
C : zone pellucide vide après rupture récolté 5j après oestrus
D : ovocyte non fécondé récolté 6j après oestrus

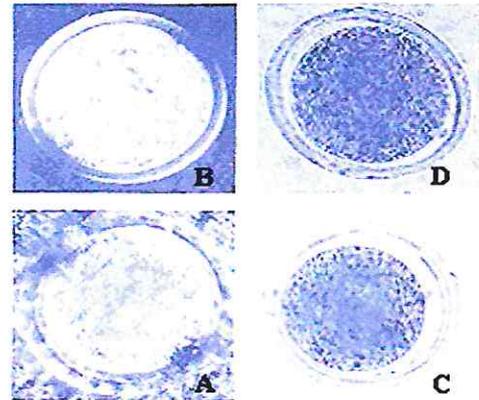


Figure 13 :
A : ovocyte avec des cellules Folliculaires adhérents
B : ovocyte folliculaire après retrait des cellules folliculaires
C : ovule à une cellule récolté 5j après oestrus
D : ovocyte non fécondé.

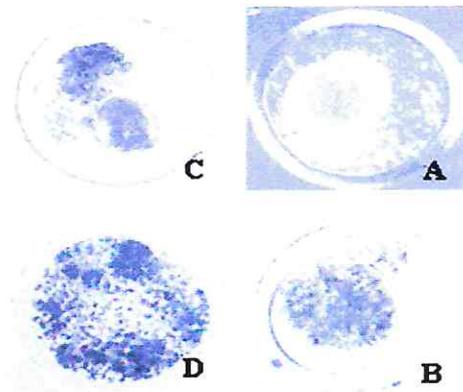


Figure 14 :
A : ovocyte dégénéré récolté 5 j après oestrus
B : Ovocyte non fécondé avec 2 fragments cytoplasmiques
C : ovocyte non fécondé fragmenté récolté 5j après l'oestrus
D : ovule désintégrée probablement non fécondé

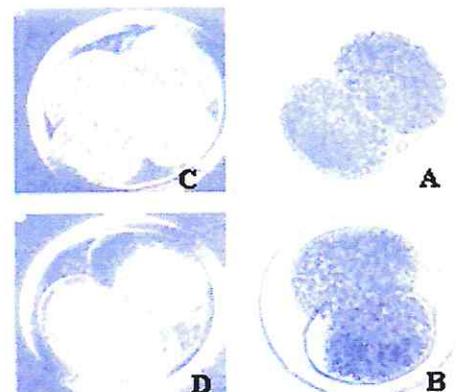


Figure 15 :
A : embryon à 2 cellules récolté 4,5j après oestrus
B : embryon à 2 cellules dégénérés récolté 5j après l'oestrus, cytoplasme clair sur un blastomère.
C : embryon à 4 cellules récolté 2 à 5j après l'oestrus
D : embryon à 2 cellules récolté 5j après oestrus avec un cytoplasme clair

Handwritten notes:
 1. 20/10/20
 2. 20/10/20
 3. 20/10/20
 4. 20/10/20
 5. 20/10/20
 6. 20/10/20
 7. 20/10/20
 8. 20/10/20
 9. 20/10/20
 10. 20/10/20
 11. 20/10/20
 12. 20/10/20
 13. 20/10/20
 14. 20/10/20
 15. 20/10/20
 16. 20/10/20
 17. 20/10/20
 18. 20/10/20
 19. 20/10/20
 20. 20/10/20

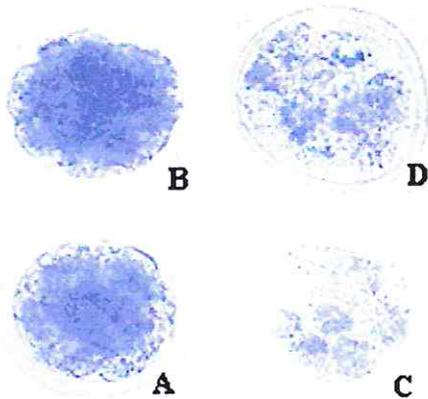


Figure 16 :

A : morula non compacte récolté 3j 6j après oestrus.
 B : morula non compacte récolté 3j après l'oestrus avec un cytoplasme sombre.
 C : embryon avec un retard de développement et dégénéré, récolté 6j après l'oestrus.
 D : embryon dégénéré récolté 7j après oestrus.

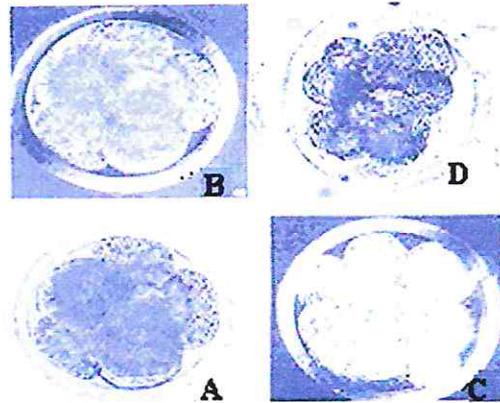


Figure 17 :

A : embryon à 8 cellules récolté 3j après oestrus probablement dégénéré
 B : embryon à 8 cellule récolté 3j après oestrus avec un cytoplasme sombre
 C : embryon de 12 à 14 cellules récolté 4j après l'oestrus
 D : embryon de 12 à 14 cellules avec un retard sévère de développement récolté 6j après oestrus

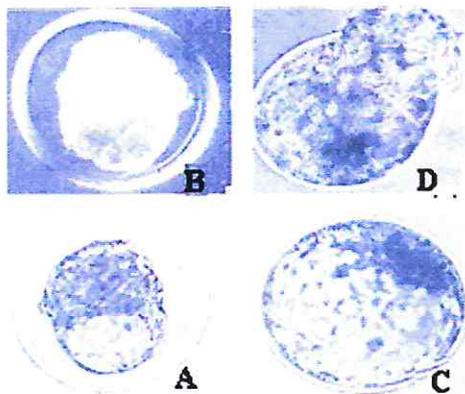


Figure 18 :

A : jeune blastocyste expansé, récolté
 B : même jeune blastocyste
 C : blastocyste expansé récolté 7,5j après oestrus
 D : blastocyste en éclosion récolté 9j après oestrus

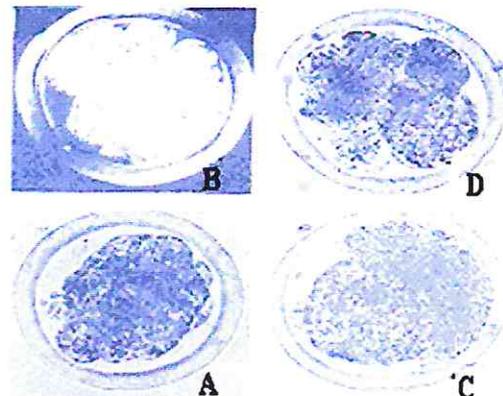
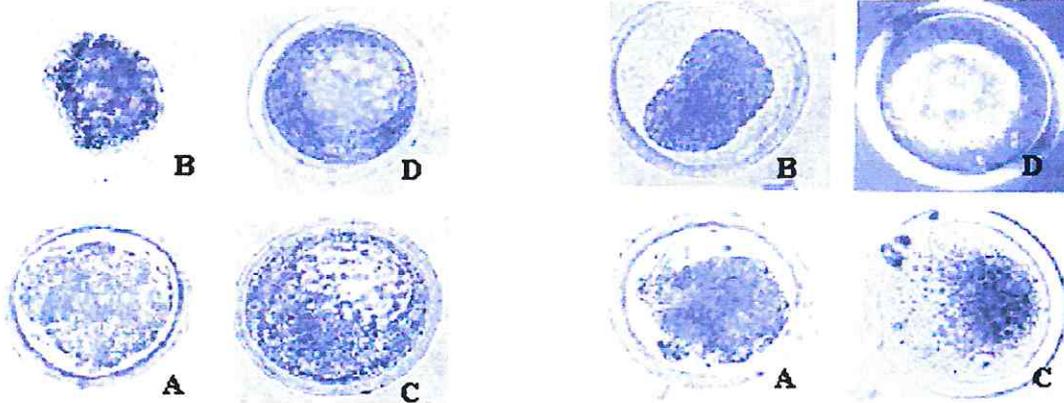


Figure 19 :

A : jeune morula compacte récolté 7j après oestrus
 B : morula compacte récolté 7j après oestrus avec des cellules de bonnes qualité
 C : morula compacte récolté 7,5j après oestrus avec des cellules de mauvaise qualité
 D : morula avec quelques cellules dégénérées

**Figure 20 :**

A : morula compacte de bonne qualité avec quelques cellules dégénérées récoltées.

B : ovule non fécondée récoltée 7j après oestrus. Peut être facilement confondue avec une morula après microdissection.

C : probablement un ovule non fécondé non dégénéré. Peut être facilement confondue avec une morula.

D : ovule dégénéré. Peut être facilement confondu avec une morula .

Figure 21 :

A : morula compacte de bonne avec probablement une cellule anormale située en haut et à droite, récolté 6j après oestrus.

B : ovocyte non fécondé peut être facilement confondue avec une morula).

C : blastocyste récolté 7,5j après oestrus.

D : ovocyte non fécondé avec la présence d'une vésicule large, peut être facilement confondu avec un blastocyste.

IV- Congélation des embryons :

En Europe, en 2003, plus de la moitié des transferts embryonnaires bovins se sont faits à partir d'embryons cryoconservés.

Les premières conservations d'embryons par le froid datent des années 70 (Whittingham et al, 1972 : chez la souris ; Wilmet et Rowson 1973 : chez la vache). Un refroidissement lent (92° c/min) en présence de DMSO (Diméthyl sulfoxyde), comme cryoprotecteur était utilisé, avant le stockage des embryons dans l'azote liquide (- 196° c). Dans les années 80 s'est développée une nouvelle technique de cryoconservation, la vitrification, qui consiste à plonger très vite les embryons dans l'azote liquide (Rolle et Fahy 1985).

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

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

IV.1. Technique de congélation :**IV.1.1. Congélation Lente :**

La grande majorité des embryons de mammifère 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 (Palasez et al, 1996). Elle est basée sur l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon.

IV.1.1.1. Les cryoprotecteurs :

Les cryoprotecteurs employés sont : le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO, le 1,2-propanediol, la 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 des cryoprotecteurs a tendance à ce faire en une seule étape actuellement, mais elle peut se faire en plusieurs étapes : les embryons sont alors déposés dans différents bains de concentration croissantes en cryoprotecteur (ex : 0, 5,1 puis 1,5M, avec environ 5mn dans chaque bain), afin d'éviter les chocs osmotiques importants. Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes de 0,25ml, qui peuvent être réfrigérés suivant un protocole précis (Palasz et al 1996).

IV.1.1.2. Conditionnement de l'embryon dans une paillette :

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

La conductibilité du matériaux composants la paillette ainsi que la ration volume / surface sont à prendre en compte. En effet, auparavant des embryons étaient conditionnés dans de petites ampoules de verre, moins conductrice de chaleur et de ratio volume / surface inférieure :

L'utilisation de la paillette donne de meilleur résultat dans la congélation de jeunes embryons (Slade et al, 1985), ces propriétés favorisant les échanges des températures plus rapides et ce aussi bien a la congélation qu'à la décongélation. Cela implique alors de manipuler très rapidement les paillettes. Les inscriptions de la paillette doivent aussi être facilement lisible une fois qu'elles sont plongées dans l'azote liquide pour éviter de sortir les paillettes à chaque fois que l'on veut lire ce qu'il y a écrit dessus. Pour cela, des visotubes ou des codes de couleur sont utilisés.

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

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

La présence des bulles d'air est primordiale car elles délimitent la région de la paillette dans laquelle se situe l'embryon. Emprisonné entre ces bulles d'air, l'embryon ne peut être entraîné vers l'une ou l'autre des extrémités où il risquerait de se coller au bouchon et d'être perdu (Guignot , 2003), (Cf figure22).

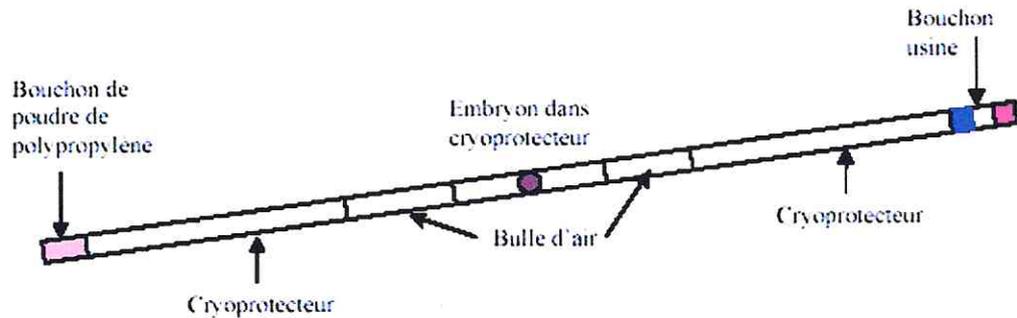


Figure 22 : Schéma d'une paillette, embryon en place lors de congélation lente (Guignot , 2003)

IV.1.1.3. 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 à 25°C que débute le refroidissement.

Dans un premier temps, les paillettes sont réfrigérées jusqu'à -6 à -7°C à la vitesse de 1 à 3°C/min. c'est à ces températures que la cristallisation est induite en appliquant une barre métallique préalablement refroidie dans l'azote liquide ou grâce à un système incorporé dans le congélateur.

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

IV.1.2. Vitrification et vitrification ultrarapide :

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

La technique de vitrification ultra rapide repose comme son nom l'indique sur des vitesses de refroidissement encore plus rapide, de l'ordre de 20.000°C/min. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié et à la faible épaisseur des parois des paillettes dans

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

IV.1.2.1. Les cryoprotecteurs :

Comme dans la congélation lente, les embryons sont mis en présence du cryoprotecteur par étape de concentration croissante. 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 et les cryoprotecteurs employés sont surtout l'éthylène glycol et le DMSO en association avec du sucre, et / ou du ficoll, cryoprotecteurs extracellulaires.

Les cryoprotecteurs sont ajoutés en deux étapes :

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

IV.1.2.2. Conditionnement de l'embryon : paillette, OPS et cryoloop :

A. Vitrification classique :

Dans la technique de vitrification classique, les embryons sont conditionnés dans les mêmes paillettes que celles employées pour la technique de congélation lente avec de part et d'autre de l'embryon, des bulles d'air et des colonnes de sucre. (Guignot, 2003) (Cf figure23)

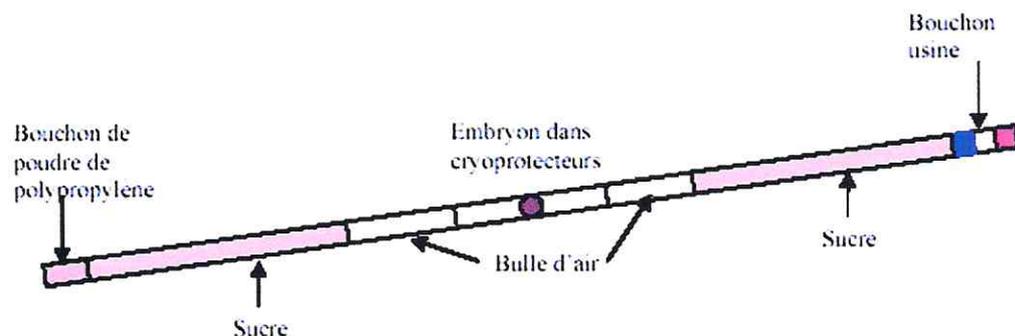


Figure 23 : Schéma d'une paillette lors de vitrification classique (Guignot, 2003)

B. Technique OPS :

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

2 μ l. Quand la paille touche la goutte, le liquide contenant les embryons monte (Cf figure 24), la paille est ensuite immédiatement placée horizontalement dans l'azote liquide.

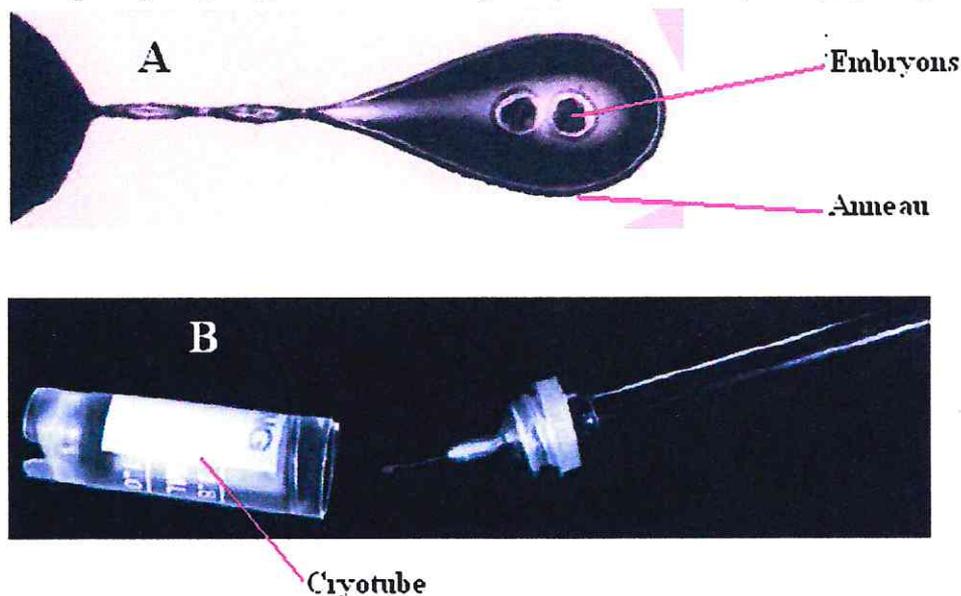


Figure 24 : Montée par capillarité dans la paille OPS (Vajta et al, 1998)

C. Technique cryoloop :

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

Pendant que l'embryon est dans le mélange de cryoprotecteurs de la première étape, l'anneau est trempé dans celui de la deuxième et il se forme un film de cryoprotecteurs à l'inférieur 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), (Cf figure 25).



A : une fois déposé 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 25 : Cryoloop contenant deux embryons (Lane et al, 1999)

IV.1.2.3. Descente de la température :

La descente en température est linéaire et très rapide dans les techniques de vitrification comme le montre la figure 16.

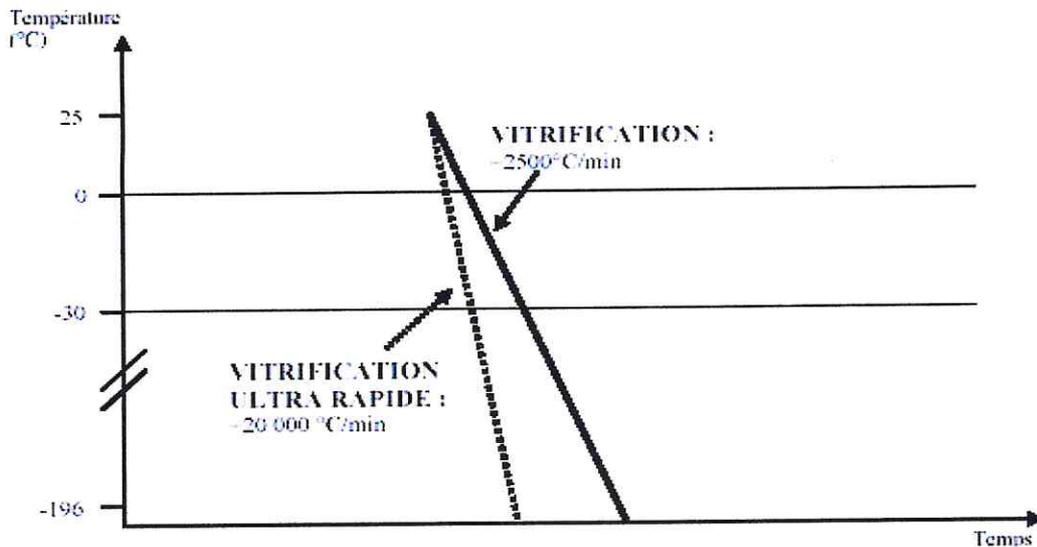


Figure 26 : Courbe de descente de température lors de la vitrification ultrarapide (Guignot, 2003)

IV.2. Décongélation :

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

On a pu obtenir jusqu'à 50% de gestation avec des embryons congelés de bonne et d'excellente qualité (Lehnjensen et Rall, 1983).

V. Transfert embryonnaire :

C'est une méthode moderne, nouvelle, de reproduction artificielle, le transfert embryonnaire permet de transplanter dans une femelle receveuse de faible valeur génétique, les tous jeunes embryons (7^{ème} au 9^{ème} jour après la fécondation) produits par les femelles donneuses de l'élite génétique. Des traitements hormonaux permettent de faire produire plusieurs embryons aux donneuses (superovulation) et d'assurer la synchronisation des situations physiologiques de l'appareil génital des receveuses avec celles de l'appareil génital de la donneuse.

V.1. Méthodes de transfert d'embryons :**V.1.1. La technique chirurgicale du transfert embryonnaire :**

Des travaux prospectant l'ET ont confirmé l'excellent alibi de la technique chirurgicale. Une thèse sur la procédure médio-ventrale étudiée à Cambridge a montré que l'opération medio ventrale en générale se faisait juste à la partie antérieure de l'utérus, alors on ramené la corne utérine ipsilatérale au corps jaune ou une petite ponction était faite pour accéder à la lumière de la corne, la pipette est induite puis l'embryon transféré est déposé. Bien que la procédure médio ventrale se faisait sur des génisses, il était clair de la technique sur la vache, en plus elle n'est pas convenable aux laitières (Coulard, 1991)

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

V.1.2. La technique non chirurgicale.

La voie chirurgicale est une intervention lourde nécessitant un bloc opératoire pour gros animaux et une équipe vétérinaire expérimentée. Des techniques de prélèvement d'embryons et de réimplantation relativement simple, utilisant les voies naturelles via le vagin et le col de l'utérus (cervix) étaient essentielles, afin de pouvoir intervenir directement dans les élevages. Une première approche, via la voie trans-vaginale, pour « court-circuiter » le passage du cervix, a permis de réduire considérablement les inconvénients de la chirurgie.

Bien que de nombreux instruments était conçus spécifiquement pour le transfert non chirurgical des embryons chez la vache, le pistolet de Cassou était l'un des candidats et du faite qu'il a amélioré l'IA, prouvant qu'il était la réponse à ce problème particulier (Coulard 1991).

V.2. Facteurs de variation des résultats du transfert :

De nombreux facteurs affectent la réponse au traitement de superovulation. Ainsi, une étude a été réalisée sur la base des résultats de 2972 collectes sur 1242 donneuses de la station de transfert embryonnaire RPN (Ring de reproduction Niedersachsen GmbH) en Allemagne pour analyser les facteurs qui influenceraient la superovulation (Hahn, 1992). La part de chaque effet dans la variabilité des collectes figure dans le tableau 7

des aberrations chromosomiques lors de la méiose (Bevers et al, 1993). Selon Nibart (1991), les extraits hypophysaires (FSH) sont plus efficaces que la PMSG puisqu'on obtient en moyenne plus d'embryons viables (5,0 contre 3,5). De plus, le pourcentage de vaches ne présentant pas de réponse est plus faible (8% contre 21%) et la fréquence de vaches présentant plus de 6 ovulations est supérieure (Cf figure 27).

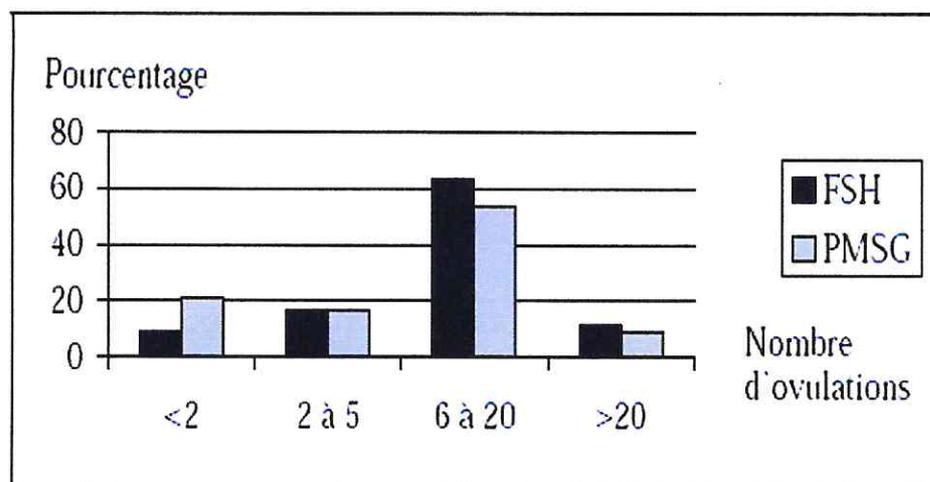


Figure 27 : Répartition des vaches (en pourcentage) en fonction du nombre d'ovulations par vache, obtenues après différents traitements de superovulation (Nibart, 1991).

V.2.1.1.1. Traitement par FSH

Lors du traitement avec FSH-p, les meilleurs résultats sont obtenus, d'après Nibart (1991), pour une dose totale de 32 à 40 mg chez la vache et de 28 mg chez la génisse, en doses décroissantes, en 2 injections par jour pendant 4 jours.

En superovulant des vaches par une unique injection sous-cutanée de FSH (Folltropin®, Vetrepharm, Can. Inc.) entre J₈ et J₁₀ du cycle œstral ou bien sur cycle induit par les œstrogènes et progestagènes (Bo et al, 1996) ou après ponction du follicule dominant (Bergfelt et al, 1997), les auteurs n'ont pas constaté de différences significatives par rapport aux traitements classiques de 2 injections quotidiennes sur 4 jours.

Concernant la dose, Estrada et al (1998) ont évalué la réponse d'élevages adaptés aux conditions tropicales, suite à des traitements de superovulation constitués de 2 doses différentes de Folltropin®, 24 et 36 mg par vache. Ils ont enregistré des différences significatives entre les élevages pour le nombre d'embryons transférables, mais la dose de FSH (24 contre 36 mg) n'influait pas de façon significative la réponse. Au contraire, Yaakub et al (1998) ont observé une augmentation linéaire de la réponse (nombre de corps jaunes et d'embryons/ovocytes non fécondés) avec l'augmentation des doses de FSH-p (400,600 ou 800 UI). Cependant, le nombre d'embryons transférables n'était pas différent entre 600 et 800 UI (Cf figure 28).

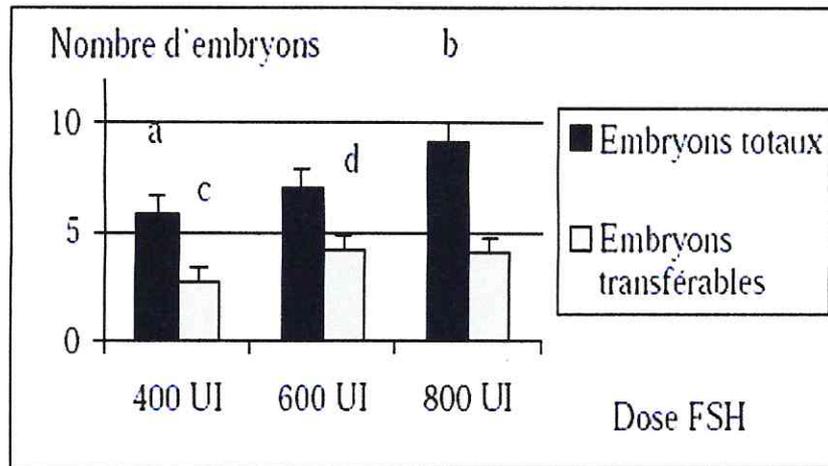


Figure 28 : Effet de la dose de FSH utilisée lors de superovulation sur le nombre d'embryons totaux et transférables récoltés (d'après Yaakub et al, 1998) a vs b ; c vs d : $p < 0,05$

V.2.1.1.2. Traitement par PMSG

Afin de limiter les effets négatifs de la longue demi-vie de la PMSG, l'utilisation d'anticorps anti-PMSG après le pic de LH a été recommandée. En effet, sans anticorps anti-PMSG, une seconde vague de croissance folliculaire démarre après l'ovulation, ce qui entraîne des concentrations en œstradiol dans le sang élevées au moment du développement embryonnaire, ce qui est néfaste pour l'embryon (Dieleman et Bevers, 1987). Les résultats en terme de nombre d'ovulations et du nombre d'embryons transférables seraient alors améliorés par l'injection d'anticorps anti-PMSG juste après le pic pré-ovulatoire de LH. Globalement, lors d'utilisation de PMSG, l'emploi d'anti-PMSG 48 à 60 h après l'injection de prostaglandines permettrait d'améliorer la réponse (Dieleman et al, 1989). L'administration d'anticorps anti-PMSG provoquerait indirectement l'atrésie des follicules non ovulés de diamètre supérieur à 10 mm avec une chute concomitante d'œstradiol. Par contre, l'injection trop précoce de l'anticorps inhibe complètement la superovulation.

Pour Bevers et al (1993), le nombre de corps jaunes présents le jour de la collecte ne semble pas influencé par l'injection d'anticorps 6 ou 18 heures après le pic de LH. Cependant, la qualité des embryons lors d'utilisation d'anticorps anti-PMSG 18 heures après le pic de LH serait supérieure à celle des embryons collectés après utilisation de PMSG seule. La meilleure période pour l'injection d'anticorps anti-PMSG semble être 18 heures après le pic de LH (Bevers et al, 1993). (Cf figure 25)

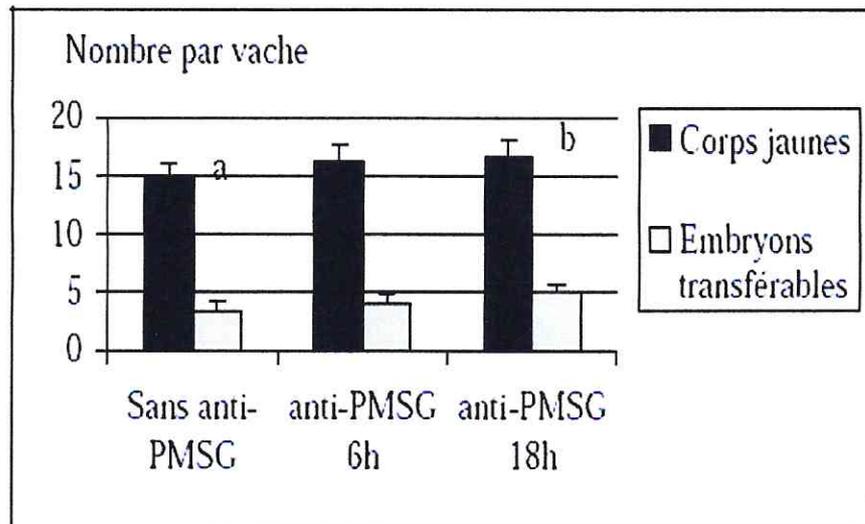


Figure 29 : Effets de l'administration ou non d'anti-PMSG 6 ou 18 heures après le pic de LH sur le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons transférables (Bever et al, 1993) a vs b : $p < 0,05$

L'utilisation d'anticorps anti-PMSG permettrait également de réduire l'incidence des kystes et de follicules pré-ovulatoires n'ayant pas ovulés le jour de l'ovulation (Dieleman et al, 1989).

D'autres auteurs n'ont pas trouvé d'effet de l'emploi d'anticorps anti-PMSG au moment de l'insémination. Zeitoun et al (1988) n'ont constaté qu'une augmentation du nombre de corps jaunes le jour de la collecte. Enfin, Zeitoun et al (1991) et Bever et al (1993) n'ont pas trouvé d'effet de l'administration d'anti-PMSG que ce soit sur le nombre d'embryons totaux ou transférables.

V.2.1.1.3. Influence du type de préparations

La pureté des préparations de gonadotrophines peut également être à l'origine de la variabilité des résultats. Ainsi, le rapport entre LH et FSH de la préparation affecte la réponse (Kelly et al, 1997). En comparant l'efficacité de 2 préparations de FSH (Folltropin®, Vetrepharm, Can. Inc., à faible teneur en LH, et Pluset®, Serovet, Rome, Italie, avec un rapport FSH/LH = 1) sur des vaches allaitantes, ils ont constaté que le traitement par Pluset® permettait d'obtenir plus d'ovulations que par Folltropin®. En revanche, une grande partie des ovocytes étaient non fécondés ou dégénérés (Cf figure 30).

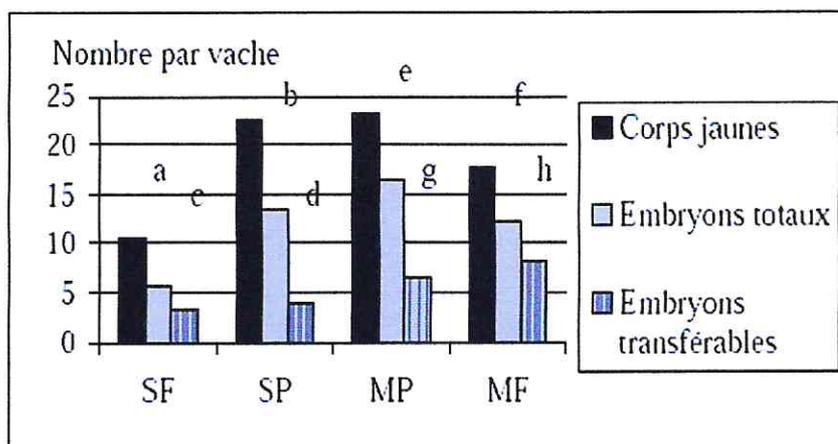


Figure 30 : Réponse au traitement de superovulation avec Folltropin® (-F) ou Pluset® (-P) en injection simple (S-) ou multiple (M-) (d'après Kelly et al, 1997) a vs b ; c vs d ; e vs f ; g vs h : $p < 0,05$

Le meilleur rapport FSH/LH serait de 0,5 en race Charolaise et de 3 à 6 en race Holstein (Nibart, 1991). Un contenu trop élevé de LH aboutit généralement à une plus faible réponse à la superovulation en race laitière (Gonzales et al, 1990) ou allaitante (Yamamoto et al, 1993). En effet, un excès de LH peut provoquer une lutéinisation ou une ovulation prématurée des follicules stimulés par la FSH, ce qui modifie les interactions endocriniennes (Kelly et al, 1997).

Le rôle de la LH dans la maturation folliculaire finale est important pour maintenir une activité œstrogénique et éviter l'atrésie folliculaire. La question est de savoir si le profil pulsatile endogène suffit à stimuler la maturation folliculaire finale et le développement de 10 à 20 follicules chez des animaux superovulés (Kelly et al, 1997).

De plus, au sein d'une préparation, le rapport FSH/LH peut varier. Lindsell et al (1986) ont utilisé des tests de réponse biologique in vitro et ont montré que le rapport FSH/LH dans une préparation de FSH-p pouvait varier de 1 à 20 selon les lots. Cependant, ils n'ont pas trouvé de différence dans la réponse à la superovulation sur la production d'embryons avec l'utilisation sur le terrain de 5 lots de FSH-p. Ils ont supposé que les facteurs individuels et environnementaux avaient plus d'influence sur la réponse à la superovulation que les variations de rapport FSH/LH. Donaldson et Ward (1986) ont montré qu'une contamination des préparations par de la LH avait des effets négatifs sur la réponse à la superovulation. En retirant la LH des préparations de FSH, ils ont augmenté le nombre d'embryons transférables (+ 2,4 embryons transférables de moyenne).

Un excès de LH est défavorable à la production d'embryons transférables. Selon Kafi et McGowan (1997), la reprise de la méiose d'ovocytes à un moment inapproprié, la lutéinisation prématurée de follicules et le contrôle négatif par les récepteurs à LH situés sur les cellules de la thèque et/ou de la granulosa seraient responsables de la mauvaise qualité des embryons collectés chez des animaux traités par une préparation de FSH contaminée par LH.

De hauts niveaux d'activité LH dans les préparations de gonadotrophines pourraient influencer les processus normaux de développement des follicules et des ovocytes. Ceci, rejoint les travaux de Herrler et al (1991), qui ont rapporté un fort pourcentage d'embryons dégénérés lorsque la préparation de FSH était supplémentée par de la LH. L'augmentation du taux de LH réduisait la qualité des ovocytes ou des embryons. Cet effet délétère serait dû à des ovulations prématurées, à des perturbations de la maturation cytoplasmique et/ou nucléaire des ovocytes, à une lutéinisation des cellules de la granulosa, et à un décalage dans l'apparition du pic de LH. Un faible taux de fécondation peut également être observé et serait dû à des ovulations non synchrones et/ou à une augmentation des concentrations d'œstrogènes ou un déséquilibre de l'équilibre œstrogènes/progestérone (Zeitoun et al, 1991).

V.2.1.1.4. Influence des méthodes d'administration

Différentes méthodes d'administration (nombre d'administration, voie, excipient) ont été examinées afin de connaître leurs effets sur la production d'embryons. Des données récentes indiquent qu'une injection sous-cutanée unique de FSH s'avère aussi efficace que des injections multiples intramusculaires (Hockley et al, 1992). De plus, il semblerait que la réponse soit améliorée lorsque cette injection était réalisée par voie sous-cutanée derrière l'épaule plutôt que dans le cou. Pourtant, Bungartz et Niemann (1994) ont trouvé que le nombre d'embryons transférables après superovulation par Folltropin® (Vetrepharm, Can. Inc) était beaucoup plus faible lors d'injections uniques que multiples. De même, pour Kelly et al (1997), chez des génisses, les injections multiples de FSH permettent d'obtenir plus d'embryons congelables et transférables que les injections uniques.

En effet, ils ont comparé l'efficacité de deux préparations de FSH (Folltropin®, Vetrepharm, Can. Inc, à faible teneur en LH ; Pluset®, Serovet, Rome, Italie, avec un rapport FSH/LH de 1/1) en injections multiples (MF ou MP) ou unique (SF ou SP). Ils ont constaté que les injections multiples étaient plus productives que les injections uniques en terme d'embryons congelables et transférables (Cf figure 31).

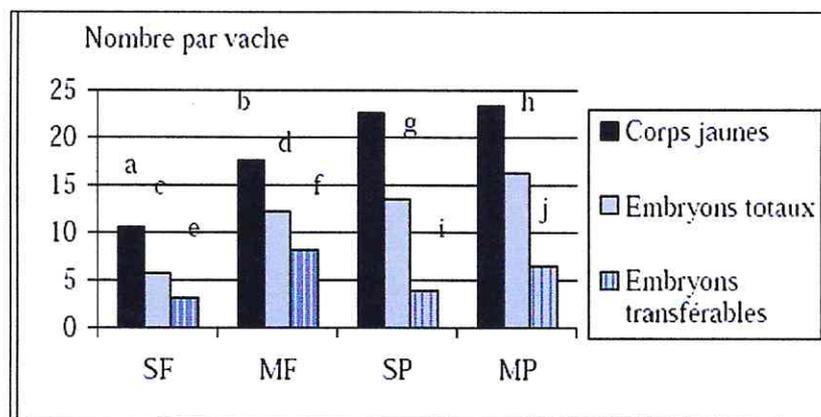


Figure 31 : Réponse au traitement de superovulation avec Folltropin® (-F) ou Pluset® (-P) en injection unique (S-) ou multiple (M-) (d'après Kelly et al, 1997) a vs b ; c vs d ; e vs f ; g vs h : $p < 0,05$

Effet, Suzuki et al (1993) ont montré pour une injection unique, l'excipient joue également un rôle dans la variation de la production d'embryons. L'administration unique de FSH (30 mg) diluée dans de la polyvinylpyrrolidone (PVP) pouvait induire des ovulations multiples chez des vaches à viande, alors que la dilution dans une solution saline induisait la croissance de nombreux follicules mais qui n'ovulaient pas.

V.2.1.1.5. Influence du dosage de l'hormone de superovulation

Lors du traitement avec FSH-p en injections multiples, les meilleurs résultats sont obtenus, d'après Nibart (1991), pour une dose totale de 32 à 40 mg chez la vache et de 28 mg chez la génisse. En injection unique, la dose optimale de FSH diluée dans une solution saline à administrer par voie sous-cutanée serait de 40 mg pour des vaches allaitantes. En augmentant la dose, le nombre de follicules non ovulés augmentait et le taux de fécondation diminuait (Hockley et al, 1992). Suzuki et al (1993) recommandent en injection unique d'une dose de 30 mg diluée dans la polyvinylpyrrolidone (PVP).

Cependant, les effets de la dose à administrer sont variables selon l'âge et la race de l'animal. Selon Breuel et al (1991), dans une étude menée chez des vaches allaitantes de 4 races différentes (Simmental, Charolaise, Polled Hereford et Angus) dans 2 types d'élevage (en station ou en ferme), les relations entre l'âge, la dose de FSH-p et la production d'embryons totaux et d'embryons transférables n'ont pas pu être expliquées, les effets n'allant pas dans le même sens selon la race et la variable concernée.

V.2.1.2. Intervalle vêlage-traitement de superovulation :

L'anoestrus du post-partum a une influence négative sur la folliculogénèse. Il importe donc de ne pas intervenir trop tôt après le vêlage. Par conséquent, on considère qu'il faut un minimum de 60 jours après vêlage pour débiter un traitement de superovulation. Ceci permet de s'assurer qu'il y a eu une bonne involution utérine et que la donneuse est effectivement cyclée (Nibart, 1991).

Selon Manciaux et al (2000), il n'y aurait pas d'effet de l'intervalle vêlage-collecte sur la production d'embryons totaux ou transférables chez des vaches Montbéliardes. Pour les vaches fertiles, il n'y aurait pas de différence significative quant à la production d'embryons viables entre femelles collectées 90 jours, 91-150 jours, 151-300 jours et plus de 300 jours après vêlage selon Nibart (1991).

Cependant, Laurière et al (2001) ont observé un effet de l'intervalle vêlage-collecte chez des donneuses charolaises, mais cet effet n'apparaît que pour des intervalles très longs (>380 jours) sur des vaches donneuses permanentes, c'est-à-dire ne menant plus elles-mêmes de gestation.

Les cycles œstraux post-partum irréguliers constituent donc un frein à la réponse au traitement de superovulation. Selon Nibart (1991), l'observation de 3 chaleurs à intervalles réguliers est conseillée par avant de mettre en œuvre un traitement. Ceci constitue le

meilleur moyen de s'assurer du bon fonctionnement de l'ovaire et de ses capacités de réponse.

V.2.1.3. Répétition des traitements de superovulation :

Selon de nombreux techniciens de collecte, il y aurait une réduction de la réponse à la superovulation lors de traitements répétés. Certains auteurs pensent que la réponse au traitement peut diminuer au cours des répétitions de traitements. Selon Nibart (1991), on pourrait alors obtenir une réponse satisfaisante en changeant d'hormone de stimulation. En effet, l'abaissement de la réponse ovarienne après le 3^{ème} traitement serait d'origine immunitaire (apparition d'anticorps anti-PMSG et anti-FSH, Nibart, 1991). Selon Drion et al (1998), l'exposition répétée d'un animal à une molécule gonadotrope exogène entraîne chez lui la formation d'anticorps spécifiques. Ainsi, des vaches soumise à l'ovum pick-up et recevant hebdomadairement 1000 UI de PMSG présentent des taux plasmatiques en anticorps anti-PMSG significativement élevés dès la troisième injection et apparemment suffisant pour compromettre une réponse biologique lors d'injections ultérieures. Cependant, cette réponse immune varie suivant la dose employée, la demi-vie de la molécule et le solvant utilisé.

Dorn et al (1991) n'ont pas enregistré de différences significatives de la réponse ovarienne suivant des traitements répétés avec des préparations de FSH. Mais Ponsart et al (2001) ont montré que le nombre d'embryons transférables diminuait significativement avec le nombre de collectes, alors que le nombre d'ovocytes non fécondés augmentait de façon significative chez les femelles collectées plus de 4 fois. Selon Nibart (1991), il est cependant possible de répéter des traitements de superovulation chez la même vache pendant plusieurs mois. La production totale d'embryons dépend alors du rythme des collectes et de la donneuse elle-même. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 8.

Tableau 8 : Production d'embryons obtenue par répétition des traitements sur des donneuses permanentes Holstein x FFPN (Nibart, 1991)

Fréquence des collectes	Nombre de femelles	Nombre de collectes/femelle	Moyenne d'embryons récoltés (extrêmes)	Moyenne d'embryons utilisables (extrêmes)
6 semaines	7	5	44(12-84)	21(7-39)
9 semaines	11	4	27(6-66)	15(0-47)
12 semaines	8	3	19(8-33)	13(5-19)

Mais selon Hahn (1992), la répétabilité des résultats de superovulation est faible et une sélection précise des donneuses est difficilement possible même après plusieurs traitements de superovulation. Cependant, il estime qu'il est possible de classer une vache en bonne, moyenne ou mauvaise productrice d'embryons à partir de la 3^{ème} collecte. Il semblerait inutile de persévérer une vache au-delà de 3 ou 4 collectes infructueuses.

V.2.2. Facteurs extrinsèques à la donneuse :

V.2.2.1. Taureau :

Le taux de fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes lors d'insémination artificielle de vaches superovulées est plus faible que lors d'ovulation sans stimulation. Kafi et McGowan (1997) ont estimé que ce taux était compris entre 65 et 70 %, contre 85 à 95 % lors d'ovulations sans stimulation. Ce plus faible taux pourrait être attribué à des perturbations de transport des spermatozoïdes ou des ovocytes. On sait que les concentrations de progestérone et d'œstradiol-17 β au moment de l'insémination peuvent affecter le stockage et la libération des spermatozoïdes de l'isthme vers l'oviducte et la contractilité de l'infundibulum (Kafi et McGowan, 1997). Mais il existe peu d'études concernant le transport du sperme chez des animaux superovulés. Il semblerait que le sperme soit stocké à l'entrée de l'isthme en période pré-ovulatoire chez les génisses non superovulées. Chez les génisses superovulées, ce lieu de stockage fut retrouvé pour uniquement une génisse sur quatre, par Kafi et McGowan (1997). Les trois autres génisses n'avaient pas de site de stockage particulier.

Selon Nibart (1991), le taureau et la qualité de la semence sont en étroite relation avec la production d'embryons transférables. L'effet important du mâle porte sur le taux de fécondation mais aussi sur la mortalité embryonnaire précoce 6 à 10 jours après la fécondation.

V.2.2.2. Les conditions atmosphériques et le climat :

L'influence des conditions atmosphériques sur la réponse aux traitements de superovulation a été étudiée par Freytag et al (1995). Des relevés de température ambiante, de pression atmosphérique et d'humidité relative ont été effectués le jour du début du traitement, de l'insémination et de la collecte. L'analyse statistique a mis en évidence une influence significative de la température le jour du début du traitement sur le nombre d'embryons collectés ; un effet significatif de la pression atmosphérique sur le nombre d'embryons collectés a été mis en évidence mais seulement à partir des relevés du jour du début du traitement et du jour de l'insémination.

Enfin, aucune influence de l'humidité relative n'a été mise en évidence. Les auteurs concluent que les conditions atmosphériques influencent sans doute la réponse au traitement de superovulation mais que la population d'étude est trop faible (n = 455 collectes) pour dégager de véritables tendances.

Une autre étude a évalué la capacité d'adaptation des donneuses d'embryons à un climat différent de celui de leur pays de naissance. Benyei (1997) a testé la capacité de génisses Prim'Holstein nées en Hongrie (climat continental) de s'adapter au climat chaud de l'état de Pernamboco au Brésil (38 à 43°C pendant la saison chaude, 30 à 35°C en saison modérée, 25°C minimum pendant la nuit). Les femelles étaient logées en stabulation libre couverte et étaient micro-arrosées pendant 10 minutes quand la température dépassait 38°C.

Les génisses, arrivées gestantes de 3 mois, ont été superovulées régulièrement par FSH à partir de 6 mois après le vêlage. Les résultats montrent que pendant la première année de présence, les donneuses n'ont pas répondu de façon satisfaisante aux traitements de superovulation ; passée cette période, la production d'embryons a augmenté pour atteindre

une moyenne d'embryons congelables supérieure à 5. Une période d'environ un an serait donc nécessaire pour que les donneuses s'adaptent à leur nouvel environnement climatique.

De plus, les profils hormonaux, observés après superovulation, apparaissent différents chez des vaches en climat subtropical de ceux décrits dans les conditions européennes ; en particulier, le pic de LH apparaît retardé de 24 heures par rapport à l'injection de prostaglandines et ceci peut conduire à utiliser un schéma d'inséminations systématiques différent (Humblot et al, 1994).

V.2.2.3. Alimentation :

Selon Fréret et al (2000), les apports nutritionnels notamment avant et au moment de l'insémination artificielle sont importants à considérer pour une production optimale de gamètes. L'environnement utérin peut ainsi être modifié et compromettre la survie des embryons.

Les apports nutritionnels peuvent influencer de façon complexe la reproduction et à différents niveaux : axe hypothalamo-hypophysaire, ovaire et utérus (O'Callaghan et Boland, 1999). Ainsi, croissance folliculaire et ovocytaire peuvent être affectés par les conditions alimentaires et l'équilibre énergétique (Fréret et al, 2000). Cependant, pour de nombreuses études, les comparaisons sont difficiles car les variations d'apports alimentaires peuvent être extrêmes et éloignées des conditions physiologiques (Laurière, 2001).

L'étude des relations entre nutrition et production d'embryons est un problème complexe, cependant quelques idées peuvent être dégagées d'après Laurière (2001).

Globalement, lors de suralimentation, on constate une diminution du taux de progestérone avant ovulation, alors que pour les animaux sous-alimentés, on constate une augmentation. L'hypothèse évoquée pour expliquer cette augmentation de la concentration plasmatique de progestérone en cas de sous-alimentation serait une diminution de son métabolisme au niveau du foie, la sous-alimentation entraînant une surcharge hépatique. On peut également avancer le fait que lors de sur-alimentation, le nombre d'ovulations est diminué, donc le nombre de corps jaunes également, d'où une sécrétion de progestérone moindre.

Sur la production et la qualité des embryons, les effets de la suralimentation à court terme avant collecte sont globalement défavorables à la qualité des embryons produits. Un faible niveau de progestérone pré-ovulatoire, provoqué par l'augmentation des apports alimentaires avant l'ovulation, pourrait influencer indirectement la survie embryonnaire via des effets sur l'ovocyte en développement (maturation ovocytaire et compétence au développement sub-optimales). Quant aux effets de la suralimentation à long terme, les résultats montrent un effet défavorable d'un fort excès d'apports alimentaires sur la production d'embryons, notamment en terme de qualité. Enfin, une forte restriction alimentaire à court terme avant collecte a un effet globalement défavorable, avec retard de développement et diminution du taux de survie embryonnaire.

V.2.2.4. Stress et maladies intercurrentes :

Le stress est l'une des causes de baisse de fertilité dans les troupeaux. Toutes les maladies intercurrentes (mammite aiguë, boiterie, parasitisme...), toutes les hyperthermies d'origine diverses, sont des formes de stress et exercent une action défavorable sur la réponse ovarienne et la qualité des ovocytes ou des embryons (Nibart, 1991 ; Dobson et al, 2001).

Ainsi, Putney et al (1988) ont pu démontrer que, chez la vache laitière, l'hyperthermie provoquée par élévation de la température ambiante ($>39^{\circ}\text{C}$) après l'ovulation, est responsable du retard de développement et de la dégénérescence des embryons. De même, l'élévation de la température rectale chez des génisses est corrélée ($p < 0,001$, $r = 0,83$) au nombre d'embryons anormaux ou en retard de développement (Putney et al, 1988).

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

Les maladies métaboliques (syndrome vitulaire, affections hépatiques,...) retentissent sur la fonction ovarienne et la production d'embryons. De même, la présence de kystes ovariens conduit à une réponse ovarienne pratiquement nulle (Nibart, 1991).

La réponse ovarienne des vaches à métrite est identique à celle des animaux sains. Cependant, le taux de collecte et le nombre d'embryons viables sont inférieurs (Nibart, 1991 ; Kafi et McGowan, 1997).

Les vaches infertiles à chaleurs normales (repeat-breeder) produiraient autant d'embryons mais de médiocre qualité par rapport aux vaches fertiles (Nibart, 1991). Elles produiraient également plus d'ovocytes non fécondés. Pour Nibart (1991), les traitements de superovulation au cours d'un cycle maîtrisé par des progestagènes semblerait particulièrement adapté aux cas des vaches âgées ou peu fertiles.

V.2.3. Facteurs intrinsèques à la donneuse :

V.2.3.1. Race :

Pour Nibart (1991), il n'y aurait pas de différence significative en terme de production d'embryons entre les 3 races laitières Française Frisonne, Normande et Montbéliarde. Par contre Breuel et al (1991) ont observé des différences significatives entre 4 races allaitantes (1039 collectes), les vaches Simmentales produisant plus d'embryons totaux et transférables, après 79 superovulation par de la FSH-p que les vaches Angus, Polled Hereford ou Charolaises, que la superovulation soit réalisée en station ou en ferme. (Cf figure 32)

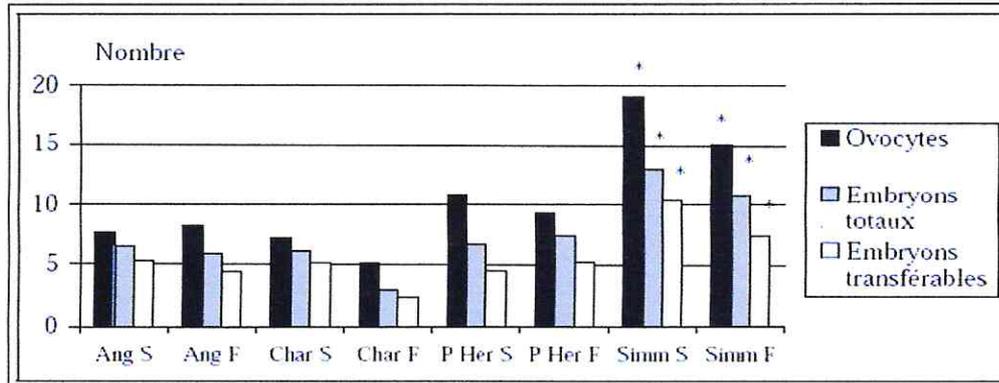


Figure 32 : Résultats de collectes chez 4 races bovines différentes (Angus (Ang), Charolaise (Char), Polled Hereford (P Her) ou Simmentale (Simm)) en station (S) ou en ferme (F)(Breuel et al 1991).

* : le nombre est significativement différent des autres races et lieux de superovulation Enfin, en France, il semble que la race Charolaise produise plus d’embryons que les races laitières mais avec des traitements de superovulation comprenant un rapport FSH/LH plus faible (supplémentation en LH) que ceux destinés aux races laitières (Laurière et al, 2001).

V.2.3.2. Age et parité :

L’âge est un facteur de variation très important ; en effet les vieilles donneuses répondent moins bien aux traitements de superovulation que les jeunes, cela est probablement due à la diminution avec l’âge de l’animal du nombre de follicule quittant la réserve ovarienne (Gordon ,1996).

Chez les vaches, lorsque l’âge augmente, la production d’embryons diminue mais uniquement chez les vaches âgées (>9 ans : Nibart, 1991; 3 lactations : Ponsart et al, 2001 ; >3 lactations, Laurière et al, 2001). (Cf figure 33). La faible réponse chez les animaux âgés a été confirmée par réponse maximale obtenue entre 5 et 6 ans (Gordon ,1996).

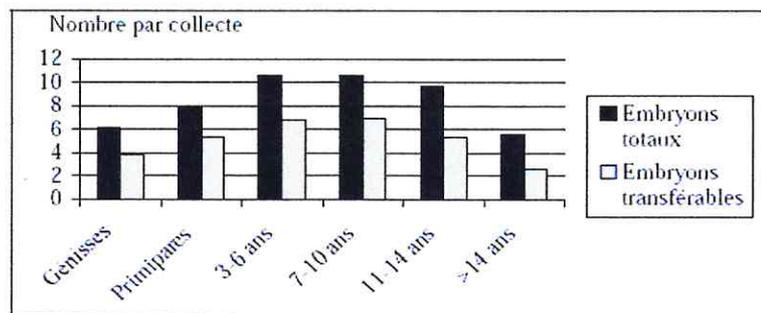


Figure 33 : Influence de l’âge sur la réponse au traitement de superovulation pour 633 collectes chez des vaches laitières (d’après Nibart 1991)

V.2.3.3. Génétique:

Manciaux et al (2000) ont recherché l'influence de l'origine paternelle de donneuses Montbéliardes sur la production d'embryons après superovulation. Ils ont trouvé une relation entre l'origine paternelle de la donneuse et le nombre d'embryons ($p=0,02$), le nombre d'embryons de qualité 1 ($p=0,02$), et le nombre d'ovocytes non fécondés par collecte ($p<0,05$). Ceci laisse à penser que l'aptitude à produire des embryons est héritable.

Cependant, Tonhati et al (1999) estiment que la réponse individuelle des animaux à la superovulation est un caractère faiblement héritable. Le coefficient de répétabilité du nombre d'embryons transférables est faible (0,13). De plus, ils estiment l'héritabilité à 0,03. Ceci signifie que 3 % de la variance phénotypique constatée entre vaches peut être expliquée par la génétique. Ces résultats montrent que les facteurs environnementaux jouent un rôle important sur la réponse d'une vache au traitement de superovulation.

V.2.3.4. La lactation et le niveau de production laitière:

Les conclusions des différentes études concernant l'effet de la lactation sur la production d'embryons sont contradictoires. Pour Darrow et al (1982), le nombre d'embryons transférables est significativement supérieur chez les vaches en lactation par rapport aux vaches tarées (4,0 *versus* 2,8 ; $p<0,01$) ; ils observent aussi une diminution progressive du nombre d'embryons transférables avec l'avancement de la lactation. A l'opposé, pour Deriugh et al (1995), les vaches en lactation produisent moins d'embryons viables que les vaches tarées ($p<0,01$).

Concernant le niveau de production laitière, alors que pour Hasler et al (1983) la production journalière et le stade de lactation n'influencent pas la réponse aux traitements de superovulation, Manciaux et al (2000) ont montré que le niveau de production laitière influence de façon significative le nombre d'embryons transférables, le nombre d'embryons de qualité 1 et le nombre d'ovocytes non fécondés ($p<0,05$; tableau 9).

Tableau 9 : Influence du niveau de production laitière sur la production d'embryons (d'après Manciaux et al, 2000).

Production laitière (kg)	<7000	7000-9000	9000-11000	>11000	P
Nombre total d'embryons	10.1± 0.8	9.5 ± 0.5	10.6 ± 0.6	8.2 ± 0.9	0.06
Nombre d'embryons transférables	5.4 ± 0.8	6.2 ± 0.4	7.5 ± 0.5	4.9 ± 0.7	0.003
Nombre d'embryons de qualité 1	2.9 ± 0.5	3.9± 0.4	5.0 ± 0.5	2.9 ± 0.5	0.002
Nombre d'ovocytes non fécondés	2.6 ± .6	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.5	0.04

PARTIE
EXPERIMENTALE

OBJECTIF :

L'objectif recherché au cours de cette étude expérimentale est d'étudier la réponse des vaches locales de type Cheurfa à un traitement de superovulation avec production et transfert d'embryons in vivo.

MATERIELS
ET
METHODES

I- Matériel :

I.1 Animaux :

La présente étude, réalisée durant la période d'avril 2004 à mai 2005, a porté sur 07 vaches au total

- 02 vaches donneuses de race locale Cheurfa sélectionnées sur leurs caractères phénotypiques, à partir d'un noyau de bovin de type Cheurfa originaire de l'est d'Algérie (berceau de cette race rustique adaptée aux conditions locales). Les donneuses sont toutes primipares avec une durée du postpartum supérieur à 90 jours et une note d'état corporel moyenne de 3. Ces donneuses ont été superovulées à 2 reprises en mai 2004 et 2005
- 05 receveuses de race laitière améliorée nées en Algérie, issues de mères laitières d'importation sont toutes des pluripares avec une durée du postpartum supérieur à 90 jours et une note d'état corporel moyenne de 2.5 à 3.

I.2. Matériel et produits de récolte et de transfert :

- Sonde souple avec mandrin métallique (sonde de folley). La sonde est à double voie, une voie pour gonfler le ballonnet situé à 5 cm de l'extrémité et une voie d'administration et de récupération du liquide de lavage des cornes utérines.
- Seringue de 50 ml pour administrer et récupérer le liquide de lavage des cornes utérines.
- Bouteilles stériles d'un litre permettant la récupération du liquide de récolte.
- • Loupe binoculaire (Nikon) et microscope inversé (Hund), indispensable à la mise en évidence et la classification des embryons.
- Boîtes de pétrie carrée et quadrillée.
- Petites boîtes de pétrie rondes où sont stockés les embryons récupérés avant leur classification, leur lavage et leur conditionnement en paillettes.
- • Seringue à insuline ou un récolte embryon pour la manipulation et le conditionnement de l'embryon dans la paillette.
- Lidocaïne à 2% pour l'anesthésie locorégionale.

- Pistolet de transfert de type Cassou.
- Paillettes de 250 µl pour le conditionnement des embryons.
- PBS comme milieu de lavage des cornes utérines.
- Milieu de conservation des embryons (tampon phosphate F1 à 4g/l de BSA, contenant des antibiotiques et des antifongiques) (IMV ZA 454).
- Milieu de congélation pour transfert direct (tampon phosphate F1 à 4g/l de BSA, et 1,5 mole d'éthylène glycol) (IMV ZA 468).
- Bio-congélateur d'embryons.
- Echographe Toshiba SONOLAYER- L- SAL32-B, équipé d'une sonde linéaire à 5Mhz.

I.3. Matériel d'insémination :

- Container pour le stockage contenant de l'azote liquide à -196°C pour la conservation des paillettes de semence.
- Paillettes de 0,25ml contenant de la semence de taureau de type local Cheurfa.
- Un pistolet d'insémination.
- Une gaine protectrice en plastique à usage unique pour assurer la protection sanitaire et l'étanchéité du pistolet d'insémination.
- Chemise sanitaire.
- Une paire de ciseau pour la section de l'extrémité de la paillette de semence fermée.
- Lubrifiant pour le gant du fouiller rectal.
- Gants pour fouiller rectal.

I.4. Hormones de synchronisation des chaleurs

- Implant sous cutané à 3mg de norgestomet et 2ml d'une solution injectable huileuse contenant 3 mg de norgestomet et de 3,8mg de valérate d'oestradiol. Ce produit hormonal est commercialisé sous le nom de "Crestar®".
- Luprostiol, prostagladine de synthèse conditionnée en solution injectable dosé à 7.5mg /ml, est commercialisé sous le nom de "Prosolvlin®".
- PMSG (pregnant mare serum gonatropin) présenté en flacon de lyophilisat dosé à 1000 UI avec un solvant de 5ml est commercialisé sous le nom de "Folligon®".
- Un applicateur d'implant.
- Seringues stériles de 10ml pour les injections intramusculaires.
- Alcool chirurgical comme produit de désinfection.

I.5. Hormones de superovulation

- Extrait hypophysaire produit par l'équipe du Pr. Beckers de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Belgique). L'extrait hypophysaire contient deux gonadotropines purifiées à partir d'hypophyse porcine, la FSH et la LH avec un rapport LH / FSH de 40% (ULg FMV PhR).

II. Méthodes**II. 1. Protocole du traitement de synchronisation**

L'induction et la synchronisation des chaleurs de référence des donneuses et des receveuses a été réalisée par la pose d'un implant sous cutané de 3mg Norgestomet "Crestar® ", sur la face externe de l'oreille après désinfection du lieu d'implantation. Cette dernière est associée à une injection intramusculaire contient de Progéstagène et de valérate d'oestradiol; le 10^{ème} jour, jour du retrait de l'implant une injection (IM) de Luprostiol "Prosolvlin®" a été pratiquée pour induire la lutéolyse et de PMSG "Folligon®" pour favoriser l'ovulation (Cf figure1), (Mialot et al 1998, Grimard 2003).

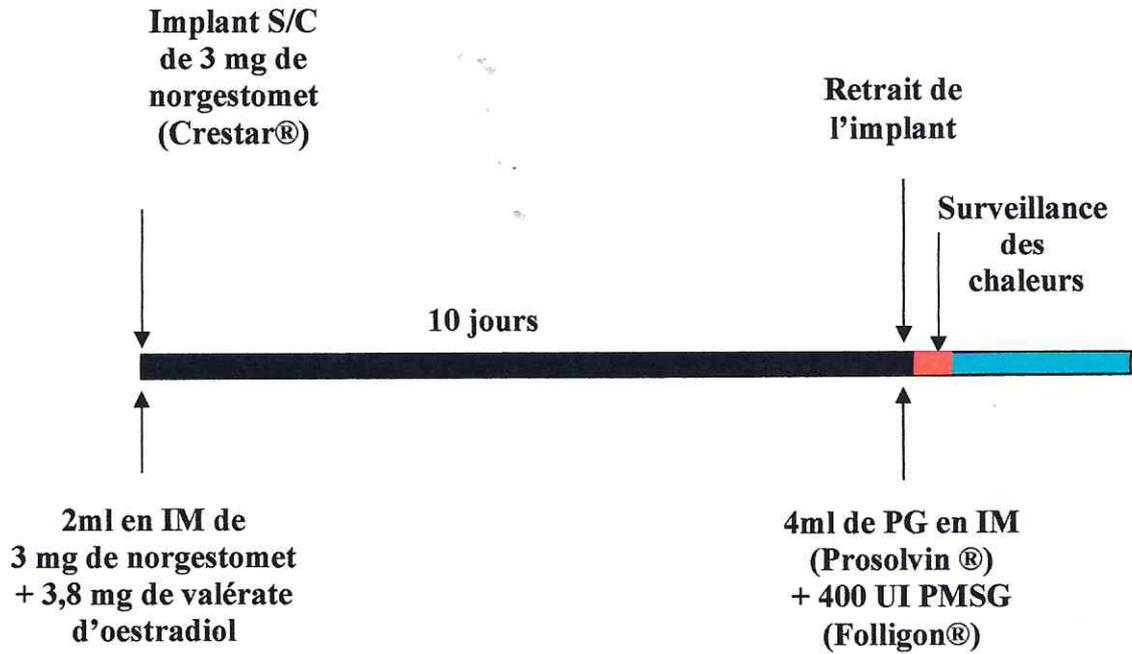


Figure 1 : Traitement d'induction et de synchronisation des chaleurs des donneuses et Receveuses.

II.2. Protocole du traitement de superovulation

Le traitement de superovulation a été réalisé avec 40mg de pFSH (10 μ gde pFSH sont équivalents à 1mg de la pFSH-P1 du NIDDIKD) (LH/FSH à 40%), administré à des doses décroissantes, à J₁₀ du cycle oestral par rapport aux chaleurs de référence, à raison de 2 injections à 12 heures d'intervalle pendant 4 jours. Au 3^{ème} jour du traitement, une injection de prostaglandine de synthèse "Prosolvin" est faite. Une double insémination, à base de semence locale congelée de type Cheurfa, a été effectuée à 12 heures d'intervalle sur chaleurs observées; la première réalisée 12 heures après le début des chaleurs (Cf figure 2).

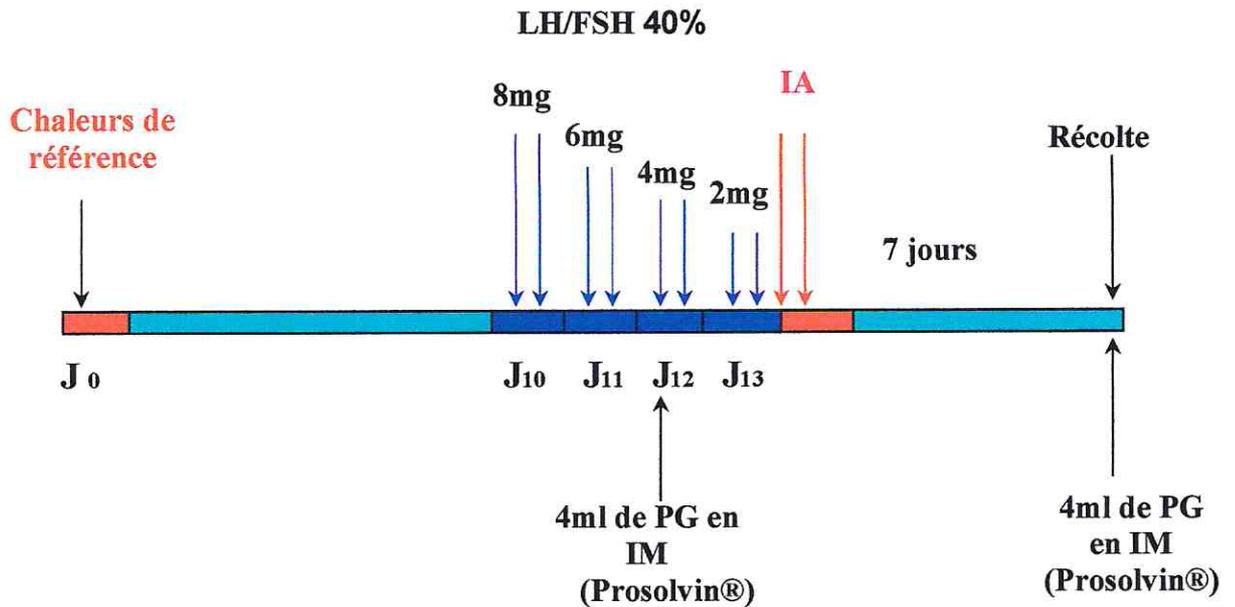


Figure 2 : Protocole de traitement de superovulation (Nibart, 1991).

II.3. Contrôle de la réponse au traitement de superovulation

La réponse au traitement de superovulation a été estimée par l'évaluation de 2 paramètres :

- L'intervalle PG-début d'apparition des chaleurs par observation visuelle des signes d'oestrus et d'acceptation du chevauchement.
- Le nombre de corps jaunes présents sur les ovaires après palpation et échographie transrectale (échographe Toshiba, sonde linéaire 5Mhz).

II.4. Récolte d'embryons

La récolte des embryons a été effectuée par voie cervicale au 7^{ème} jour après la 1^{ère} insémination, à l'aide d'une sonde à 2 voies de folley ou de Han munie d'un ballonnet situé à 5 cm de son extrémité.

En premier lieu, la vache est mise dans une cage de contention, la tête attachée par une corde. Une anesthésie épidurale est effectuée par une injection de 4 ml de xylocaine à 2% pour faciliter la récolte.

Avant de procéder à la récolte, le rectum est vidangé de ses matières fécales suivi d'un nettoyage de la région anovulvaire avec une eau additionnée de permanganate de potassium.

La récolte consiste à rincer chaque corne utérine séparément à l'aide de la sonde de folley utilisant le PBS préchauffé à 37°C comme milieu de récolte. La sonde est introduite à travers le col utérin, une fois au niveau d'une des cornes utérines ; le mandrin métallique est partiellement retiré, afin de permettre d'avancer la sonde plus profondément, le ballonnet est alors gonflé grâce à une seringue remplie d'air et le mandrin retiré. Le rinçage de chaque corne utérine se fait en injectant et en récupérant à travers la sonde la solution de PBS avec des doses croissantes. La quantité de PBS introduite est récupérée dans un flacon stérile identifié et propre pour chaque vache. Après avoir remis le mandrin métallique en place, on déplace la sonde vers l'autre corne qui est rincée de la même façon.

Les volumes croissants de PBS administrés étaient plus faibles en rapport avec la faible taille de l'appareil génital. Le volume total de PBS utilisé par vache a été de 320 ml.

II.5. Classement et conditionnement des embryons

La recherche des embryons est réalisée par examen du décantât du liquide de récolte, réparti dans des boîtes carrées quadrillées sous loupe binoculaire et microscope. Une fois repérés, les embryons récoltés sont placés dans une petite boîte ronde contenant un milieu de conservation et ensuite classés morphologiquement sous microscope selon la méthode de Elsdén et al (1978) et de l'INRA (1980).

Les embryons récoltés destinés à un transfert en frais sur des receveuses déjà préparées, sont lavés dans un milieu de conservation puis conditionnés en paillette de 250 µl pour le transfert en frais. L'embryon en paillette est placé entre deux bulles d'air pour éviter son déplacement à l'une des extrémités (Cf figure 3).

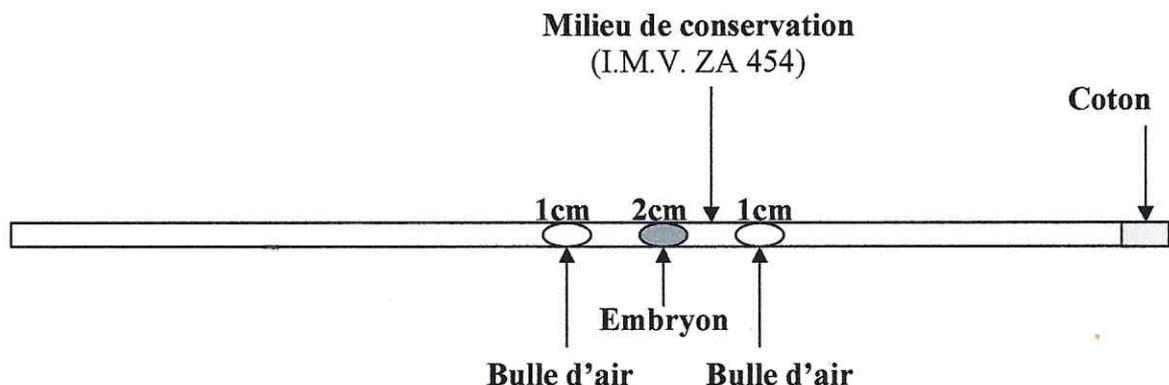


Figure 3 : Schéma du montage de l'embryon en paillette pour un transfert en frais.

Les embryons à congeler sont conditionnés en paillette dans le milieu de congélation à base d'éthylène glycol (IMV ZA 468 à 1.5 M d'éthylène glycol), (figure4). La congélation a été réalisée à l'aide d'un bio-congélateur programmable selon la méthode classique lente (Cf figure5).

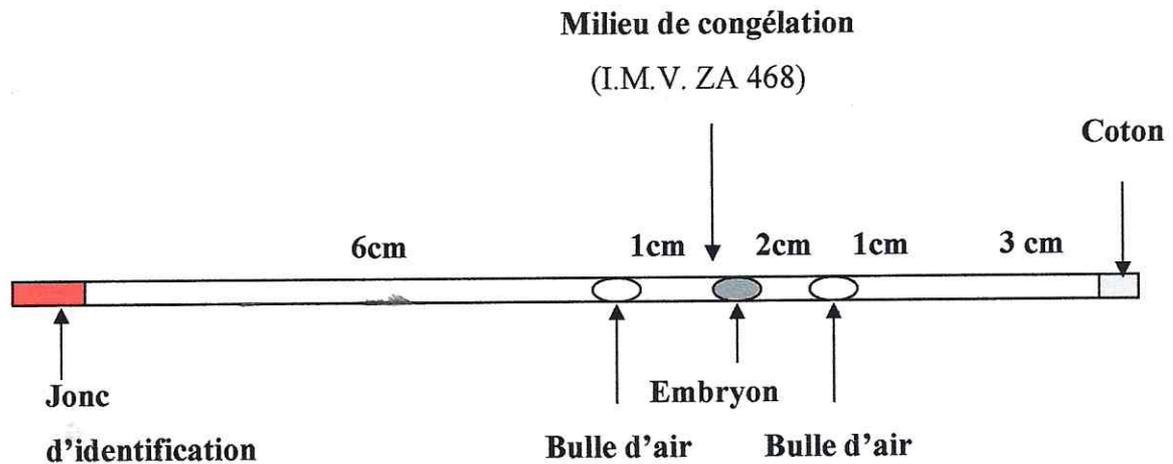


Figure 4 : Schéma du montage de l'embryon en paillette pour une congélation (Elsden et al, 1978)

II.6. Congélation des embryons :

Après un temps d'équilibration de 10 à 15 mn de l'embryon en paillette dans la solution de cryoprotecteur, la méthode de congélation a consisté :

- Mettre de l'azote dans le coffret du bio-congélateur.
- Mise en marche du bio-congélateur, commutateur en AS.
- Transférer la paillette dans le coffret du bio-congélateur et le refroidissement de l'embryon commence jusqu'à la température de -7°C à raison 1 à 3°C par minute
- Maintenir l'embryon -7°C pendant 5 à 7 minutes pour stabiliser la paillette
- Après avoir retiré la barre du seeding immergé dans l'azote liquide, le seeding (cristallisation) a été réalisé en appliquant la barre du seeding sur les paillettes des 2 extrémités.
- Passer le commutateur en PS, le refroidissement de l'embryon reprend pour une température de -30°C à raison de 0.3 à 0.6°C par minute

- A -30°C , la paillette est plongée dans la cuve d'azote liquide à -196°C
- Les embryons congelés sont transférés dans un container d'azote liquide.

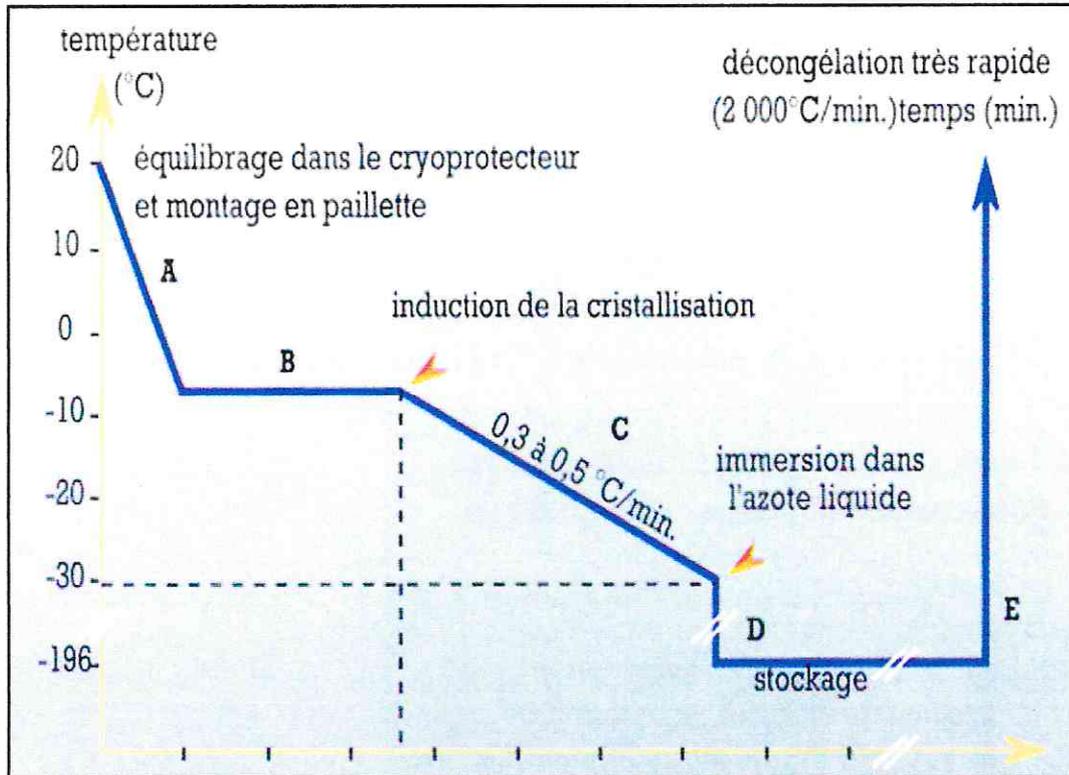


Figure 5 : Schéma de congélation lente des embryons (Palasz et al, 1996)

II.7. Transfert d'embryon :

Avant le transfert des embryons à l'état frais, les receveuses au nombre de cinq ont fait l'objet d'une palpation transrectale pour vérifier la présence effective d'un corps jaune fonctionnel sur l'un des ovaires.

Le transfert des embryons sur receveuses a été réalisé par voie cervicale, qui consiste à déposer l'embryon au sommet de la corne utérine ipsilatérale au corps jaune, à l'aide d'un pistolet de transfert muni d'une gaine et d'une chemise sanitaire en passant par les voies naturelles.

II.8. Diagnostic de gestation :

Le diagnostic de gestation a été réalisé par palpation transrectale à 60 jours après transfert puis confirmé à 90 jours.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

I. Résultats

I.1-Synchronisation des chaleurs des receveuses :

Les délais d'apparition des chaleurs des receveuses après retrait de l'implant sont présentés par le tableau 1 :

Tableau 1 : Délai d'apparition des chaleurs des receveuses (heures)

Nombre de vaches (05 vaches)	Délai d'apparition des chaleurs (heures)
2	39
1	40
2	42
Moyenne	40,4

I.2-Réponse au traitement de superovulation :

- **Intervalle PG-début d'oestrus des donneuses**

La réponse des vaches au traitement de superovulation est positive (Cf Photo 1 et 2). Toutes les vaches sont venues en œstrus avec une moyenne de 39,5 heures après l'injection du luprostriol (Cf Tableau 2).

Tableau 2 : Intervalle PG –début d'oestrus des donneuses (heures).

N° du traitement	N° de vache	Intervalle PG–début d'oestrus (heures)
1	1	40
	2	39
2	1	38
	2	41
Moyenne		39,5

**Photo 1** : Chevauchement de la vache cheurfa en oestrus.



Photo 2 : Chevauchement de la vache cheurfa en oestrus .

- **Nombre moyen de corps jaunes**

L'examen par voie rectale et échographique des ovaires effectué le même jour de récolte, a permis de faire une estimation moyenne de 7.5 CJ par vache avec un maximum de 9 pour la vache n°2 (Cf Tableau 3 et Photo 3).

Tableau 3 : Nombre de corps jaunes estimé par vache.

N° du traitement	N° de Vache	Nbre de CJ estimé par vache	Nbre moyen de CJ
1	1	6	7,5
	2	9	
2	1	7	
	2	8	

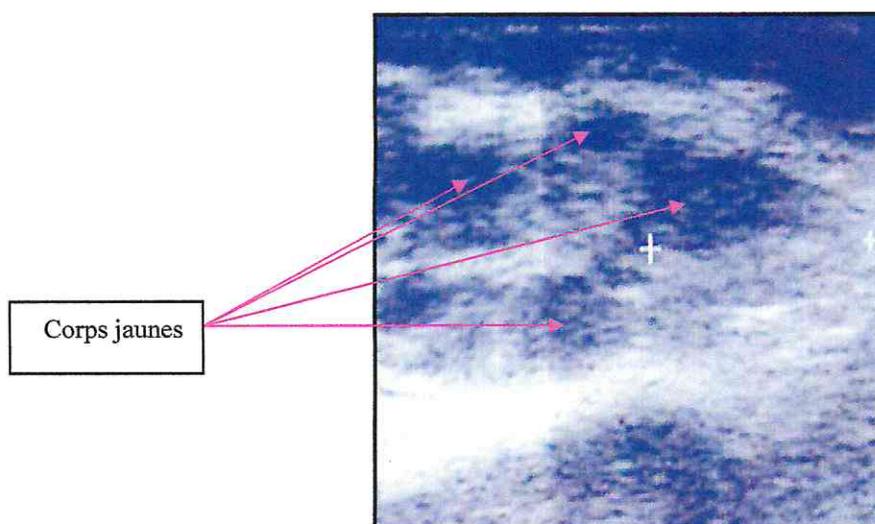


Photo 3 : Image échographique d'un ovaire superovulé avec présence de corps jaunes (le jour de récolte)

I.3. Résultats de récolte

Les embryons récupérés des 3 vaches récoltées ont été classé selon leurs caractères morphologiques (Cf Tableau 4 et Photo 4, 5, 6, 7, 8).

TABLEAU 4 : Classification des embryons récoltés par vache

N° de récolte	N° de vache	Nbre total d'embryons par vache	Nombre d'embryons			
			Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
1	1	4	1	/	/	3 (2NF,1D)
	2	6	/	4	/	2 (2NF)
2	2	5	1	1	/	3 (2NF,1D)
Total		15	2	5	/	8

NF : Emb non fécondé. D : Emb dégénéré.

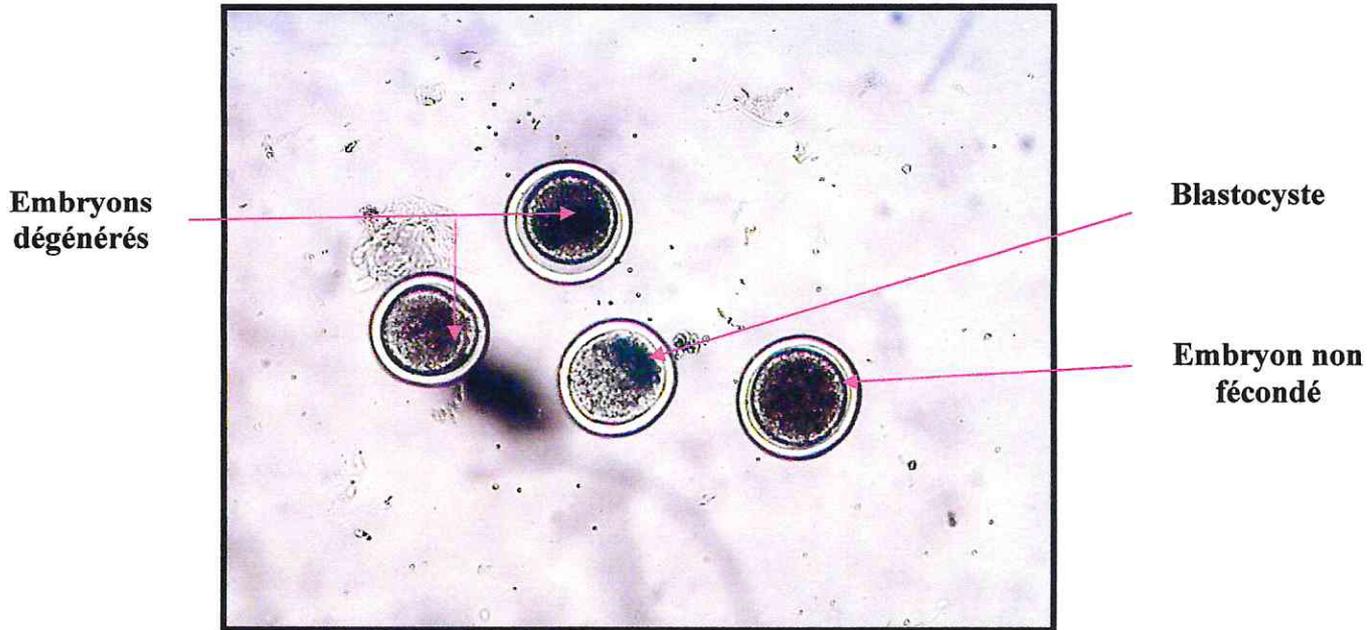


Photo 4 : Ensemble d'embryons récoltés (après lavage, x100).



Photo 5 : Jeune blastocyste de classe 1 (après lavage, x100).



Photo 6 : Ovocyte de classe 4 (après lavage, x100).

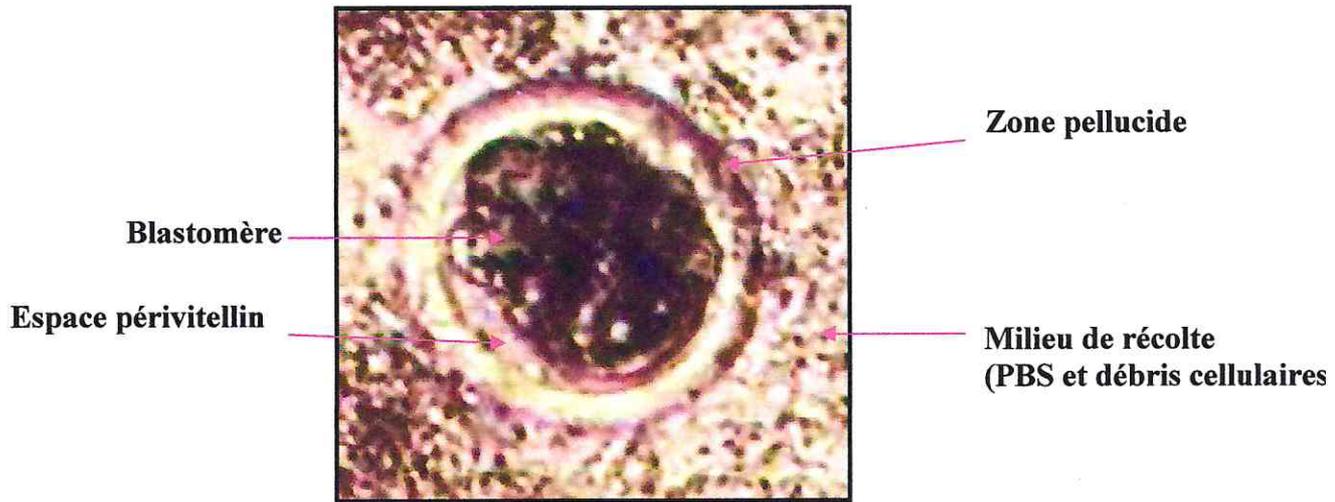


Photo 7 : Morula dans le milieu de récolte (x100).

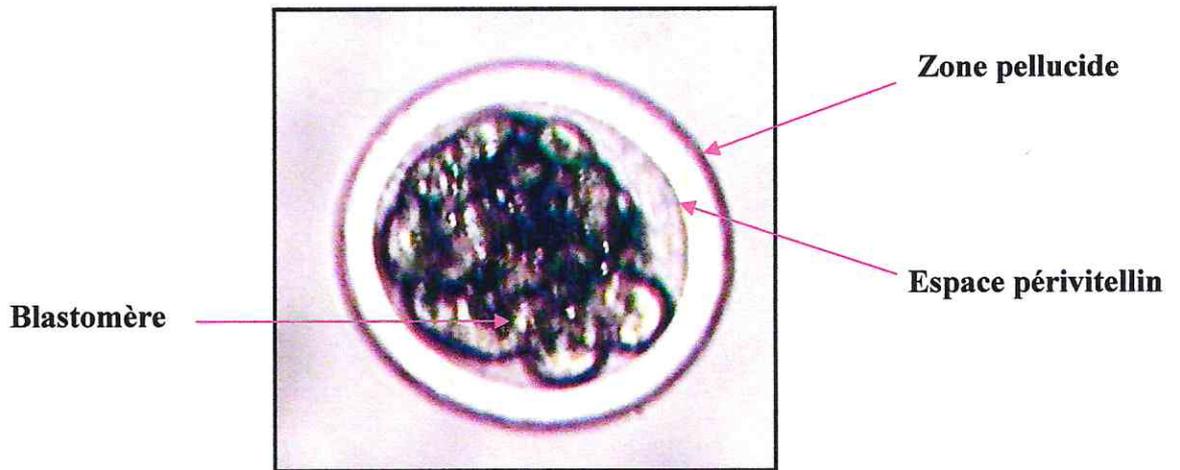


Photo 8 : Morula de classe 2 (après lavage, x100).

Les résultats moyens d'embryons récoltés en transférables, congelables, dégénérés et non fécondés par vache sont présentés par le tableau 5.

Tableau 5 : Résultat de récolte par catégorie d'embryon

N° de Récolte	N° de Vache	CJ	Embryons				Congelables
		Nombre	Nombre	Non Fécondés	Dégénérés	Transférables	
1	1	6	4	2	1	1	1
	2	9	6	2	0	4	4
2	1	7	/	/	/	/	/
	2	8	5	2	1	2	2
Total		30	15	6	2	7	7
Moyenne		7,5	5	2	0,66	2,33	2,33

I.4. Résultat de transfert

Le transfert des 5 embryons utilisables à l'état frais sur des receveuses de race laitière améliorée a permis d'obtenir 60% de gestation donnant naissance à deux mâles et une femelle de type Cheurfa (Cf Photo 9, 10 et 11).



Photo 9 : Receveuse pie noir avec son veau cheurfa



Photo 10 : Receveuse pie rouge avec son veau cheurfa.



Photo 11 : Les 3 veaux cheurfa issus par transfert embryonnaire.

I.5. Résultat de congélation

Les résultats de congélation ne sont pas encore connus puisque aucun embryon congelé n'a été transféré sur des vaches receveuses.

II. Discussion

II.1. Evaluation de la réponse au traitement de superovulation :

- **Délai d'apparition des chaleurs :**

La vache de type Cheurfa répond au traitement de superovulation et ne présente pas de variabilité dans le délai d'apparition des chaleurs. L'intervalle moyen PG - début d'oestrus observé de 39.5 heures, sur un effectif faible, est comparable à celui obtenu pour les races spécialisées (Dalton et al, 2000).

- **Nombre moyen de corps jaunes :**

Chez la vache de type cheurfa, le nombre moyen de corps jaunes obtenu est faible par rapport à celui des races spécialisées à viande et à lait (Chupin et Procureur, 1983 ; Donaldson 1984, Chupin 1988).

Par comparaison aux races locales des pays d'Afrique, le nombre de corps jaunes obtenu est proche de ceux rapportés par Chicoteau (1989) et Bianchi M et al (1986) qui sont respectivement de 6,5 et 6,9 chez la race Baoulé. Il est par contre supérieur à ceux observés à par Diop et al (1994) et Jordt et al (1986) qui sont respectivement de 5,06 et 4,5 ; pour une dose de pFSH plus faible (28mg de FSHp) pour la race Ndama et sur un effectif similaire.

Par contre, il est inférieur à ceux de 9.5 ± 3 et 10.5 ± 2.6 observés chez la race Oulmes Zaer marocaine par Elaidi et al (1996a et b) avec une même dose de pFSH utilisée mais comparable à celui rapporté par Elaidi et al (1996a) qui est de 7,2 quant la dose pFSH est faible (32mg).

La réponse au traitement de superovulation semble être liée à la dose utilisée où le nombre de corps augmente proportionnellement avec la dose utilisée jusqu'à une valeur optimale, au-delà de laquelle la réponse devient faible d'après Kanitz (2002).

II.2. Collecte d'embryons :

Le résultat des récoltes obtenu à savoir de 2.33 embryons transférables sur 5 embryons récoltés par vache cheurfa est faible par rapport à celui des races spécialisées à viande et à lait (Donaldson 1984, Breuel et al, 1991, UNCEIA 2001, Lafri 2002, Hasler 2003).

Il est comparable à celui obtenu chez la race Ndama de 2.2 (Jordt et Lorenzini 1990), et faible à ceux de la race Oulmes-Zaer marocaine de 3.2 et 3.12 apportés respectivement par Elaidi. et al (1996a) et (1996b) avec un taux de viabilité comparable pour ces derniers.

Par contre, il est supérieur à celui obtenu chez la race Baoulé (0.88 et 0.63) d'après Chicoteau (1989) et à ceux de 1.8 et 1.4 obtenus respectivement par Jordt et al (1986) et Diop (1994) chez la femelle Ndama. Cette différence peut s'expliquer soit, par la faible dose de FSHp utilisée (28mg et 36 mg) où le nombre d'ovulation augmente avec la dose de pFSH jusqu'à une dose optimale au delà de laquelle la réponse au traitement de superovulation diminue (Kanitz et al 2002, Murphy et al 1998, Escouflaire et al 1989, Lerner et al. 1986, et Donaldson et Ward 1985) et /ou soit par l'effet race où certaines races sont plus sensibles au traitement de superovulation (Breuel et al. 1991).

II.3. Taux de gestation :

Le taux de gestation obtenu par transfert en frais de 60% est satisfaisant par rapport à ceux rapportés par Lakhdissi et al (1996) (66.7 à 60%), Hasler (2001 et 2004) (68.3% à 77.1%) et Chagas et al (2002) (50 à 58.7%).

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que le bovin local a répondu au traitement de superovulation, et que la récolte et le transfert d'embryons est possible chez ce type de bovin malgré la petite taille de l'appareil génital en rapport avec son format ellipométrique *pour* l'espèce bovine.

Le rendement en embryons transférables obtenu est comparable à d'autres races autochtones mais reste faible par rapport aux races sélectionnées. Cette différence peut être liée à une plus grande sensibilité du bovin amélioré à la pFSH et/ à la dose utilisée.

Le taux de gestation après transfert d'embryons en frais est comparable aux résultats obtenus au niveau mondial.

Cette technique de production d'embryons in vivo pourrait être appliquée pour améliorer la fonction de reproduction par la multiplication plus rapide d'un noyau existant sélectionné, et pour la conservation du bovin cheurfa par la constitution d'un stock d'embryons congelés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdelguerfi A, 2003.** "Plan d'Action et Stratégie Nationale sur la Biodiversité ; Bilans des expertises", Tome XI, 22-23 janvier, pp.117-123.
- **Adesbri EY, Resnick CE, Hermandez ER,1988** Insuline-like growth factor 1 as amplifier of follicle stimulating hormone action: studies on mechanism (s) and site (s) of action in culture rat granulosa cells. *Endocrinology*, 122: 1583-1591.
- **Almeida AP,1987,**Superovulation in cattle : a combined treatment using synchronate Bwith either PMSG or FSH. *Theriogenology* ; 27, 1: 203 abstr.
- **Armstrong DT. 1993.** recent advances in super ovulation of cattle. *Theriogenology*, 39, 7-24.
- **B.O.G.A, Bergfelt DR, Brogliatli GM. Pierson RA, Adams GP, Mapletoft RJ, 2000.** local versus systemic effects of exogenous Estradiol. 17. Beta on ovarian follicular Dynamics in heifers progestagen Implant. *Anim repro. SCI*, 59, 141-157.
- **Bao B, Garverick HA, 1998.** expression of steroidogenic enzyme and gonadotropine receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *JA nim. Sci.* 76: 1903-1921.
- **Beal WE, Good G.a, Peterson.L, 1984,** Oestrus synchronisation and pregnancy rates in cyclic and monocyclic beef cows and heifers treated with syncro-niate. B or morgestemet and alfaprostrol. *Theriogenology*, 22, 53-66.
- **Bellow RA. Stagniller RB. Wilson JM. Phelps DA, Dorling A. 1991.** use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology*, 35, 1069-1082.
- **Bendell JJ. Dorrington JH,1990,** Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 127, 533-540. in Drion PV, Beekers JF. Derkenne F Henzen CH. 2000, le développement folliculaire chez la vache: 2 mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Med. Vet.* 2000, 144, 385-404.
- **Benyei B., Fari M., Baarros C.W.C., Solti L. (1999).** Superovulatory response in continuously heat stressed holstein-friesian cattle in Brazil. *Theriogenology*. 51, 260.
- **Bergfel,D.R.,B.O.G.A.,Mapletoft,R.J.,Adams,G.P.(1997).**Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Ani. Reprod. Sci.* 49, 1-12.
- **Bevers M.M., Dieleman S.J., Gielen J.T., Wurth Y.A., Janszen B.P.M, Van Debroek J., Willemse A.H. (1993).** Yield of embryos in PMSG-superovulated cows treated with anti-PMSG six or 18 hours after the peak of luteinising hormone. *Veterinary Record*. 132, 186-189.
- **Bianchi M., Chicoteau P., Cloe C., et Bassinga A.1986,** "Premiers essais de transfert d'embryons sur bovins de race baoulé au Burkina-Faso", *Rev. Elev. Med. Vet Pays trop*, 39, (1), pp. 139-144.
- **BO. GA. Adams. GP. Pierson. RA and Mepletoft RJ. 1995.** exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31-40.
- **BO. G.A., Pierson R.A., Mapletoft R.J. (1991).** The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. *Theriogenology*. 36, 169-183.
- **BO.G.A, Bergfelt DR, Brogliatli GM. Pierson RA, Adams GP, Mapletoft RJ, 2000.** local versus systemic effects of exogenous Estradiol. 17. Beta on ovarian follicular Dynamics in heifers progestagen Implant. *Anim repro. SCI*, 59, 141-157.

- **Boichard D, Manfredi E. 1995** Analyse genetique du taux de conception en population Holstein. Elevage et insémination, 269, 123 Boland MP. Roche JF, 1993. les gonadotropines INRA, Paris.
- **Breuel K.F., Baker R.D., Butcher R.L., Townsend E.C., Inskoop E.K., Dailey R.A., et Lerner S.P.1991**, "Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows", Theriogenology,36, pp. 241-255.
- **Byskov, AG, 1979**, Regulation of meiosis in mammals Ann. Biol. Anim. Biophys. 19: 1251-1261.
- **Callesen et Al, 1987**; Callesen, H, liborussen, T. Andersen, B.B. (Eds). Embryo Transfer, physiological challenge test and Nucleus, Herd Breeding with Dairy cattle, Rapport no.737, Danish Institute of Agricultural sciences, Denmark, p. 23-46.
- **Chagas J., Silva.E., Lopes da costa L., et Robalo Silva J.2002**, "Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-foetal mortality following embryo transfer in dairy cattle", Theriogenology, 58, pp. 51-59.
- **Chene, N et Martal, J. 1996**. contrôle du développement embryonnaire et reconnaissance maternelle de la gestation. Le point vétérinaire, vol 28, (Numero spécial) Reproduction de Ruminants. 1996. pp. 57-66. (901-910).
- **Chicoteau.P.1989**, "Adaptation physiologique de la fonction sexuelle des bovins Baoulé en milieu tropical soudanien", Thèse de doctorat, université de paris créteil.
- **Chupin D, pelot J, Petit j, Petit M, 1977 b**. Induction et synchronisation de l'ovulation chez les femelles de race à viande. In physiologie et pathologie de la reproduction, journées ITEB-UNCEIA, 45-49. ITEB, paris.
- **Chupin (D), Saummand (J), 1981**. Effect of exogenous prostaglandin and /or estrogen on luteolyses after Electrocauterization of the largest follicles et the end of the bovine Estrous cycle theriogenology,16.
- **Chupin D, 1985**. Application pratiques du transfert d'embryons chez les bovines. Elevage et insémination 26. 3-6. in combarnous y. vollard. Nail.P, 1997. les Gonadotropines. INRA, Paris.
- **Chupin D.1988**, super ovulation par PMSG or FSH pour le transfert embryonnaire colloque Soc Fr. Etude de la fertilité. Masson Ed paris ; 26 : 213-232.
- **Chupin D.1983**, et Procureur R.E., "Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle", Anim. Reprod. Sci., 6, pp.11-23.
- **Colleau JJ. Heyman Y. Remard JP. 1992**. les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. IMRA prod. Amin, 11. 41-56.
- **Collesen, H. Greve, T and Hyttel, P. 1993** oestrus characterization in superovulated cattle, theriogenology 40, 1259-1267.
- **Combarnous y, Volland-Nail P, 1997**. les Gonadotropines. INRA, paris.
- **Coultard, H. 1991**. on form embryo Transfert in cattle. In practice 13, 16-22. in: Gordon I. 1996. reproduction in: cattle and Buffaloes. Vol.1, cab international, UK.
- **Cushman. RA; De Souza JC. Hedeth V. Sand Britt.2001**, Effect of long term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentration and ovulatory response of super ovulated cattle. Theriogenology, vol 55 (7) pp. 1533-1547.

- Dalton J.C., Nadir S., Bame J.H., Noftinger M., et Saacke R.G.2000,"The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows", J. Anim. Sci., 78, pp.2081-2085.
- Davoren JB, Hsueh Aaron JW.1986, Rowth hormone uicreases avosian levels of immunoreactive sonatomedin C/ insuline C/ insuline-like factor in vivo. Endocrinology, 118, 888 (Abst).
- De loos FAM. Bevers, MM Dreleman, SJ and Fruip, TAM. 1996, follicular and oocyte moturation in cows treated for superovulation theriogenology 35, 537-546.
- Delacharlerie PF, Manciaux.I, charreaux.F, Marie M, 1995. Relation ships between diet and response to super ovulation in dairy cows in : Merieux ch. Ed): Imme colloque scientifique de l'AETE, 8-9 septembre 1995, Hannovre, Allemagnep. 160 (Abstr).
- Dieleman S.J., Bevers M.M., Wurth Y.A., Gielen J.T., Willemse A.H.(1989). Improved embryo yeld and condition of donor ovaries in cows after PMSGsuperovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LHpeak. *Theriogenology*. 31, 473-487.
- Dieleman S.J., Bevers M.M. (1987). Effects of monoclonal antibody against PMSGadministered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG treated cows. *J. Repro. Fertil.* 81, 533-542.
- Dielemen SJ. Bevers MM. Vos, P.L.A.M and de loos, F.A.M1993 b. PMs/anti PMSG in cottle : a simple and efficient superovulatory treatment . *theriogenology* 33, 25-41.
- Demonstier MM. Beckers JF, van Der. Zwalmen. P, closset J, Gillard IJ, Ectors. F,1988 Determination of porcine plasma folitropine levels during super ovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 1988, 30, 379-386.
- Dhont D, Bouters R, spincemaille J, Goryn M, Vandeplessche M.1978, the contrôle of super ovulation in the bovine with a PMSG. *Anti serum therigergnology*, 9, 529-539.
- Diop P.E.H., Fall R., Mbaye M., et Faye L.1994, "Le transfert embryons en milieu villageois sénégalais", *Dakar Médical.*, 39, pp.135-375.
- Donaldson .LL, Dose of FSH. P.1984b, as a source of variation in embryo production from super ovulated cows. *Theriogenology*, 22, 205-212.
- Donaldson L.E.1984, "Cattle breed as a source of variation in embryo transfer", *Theriogenology.*, 21, pp.1013-1018.
- Donaldson L.E., Ward D.N. (1986). Effect of LH on embryo production insuperovulated cows. *Vet. Record.* 119, 625-626.
- Drion P.V., Remy B., Houtain J.Y., Mcnamara M., Baril G., Heyman Y.,Cognie Y., Thement-Clement M.C., Leboeu B., Ectors F., Segers K.,Beckers J.F. (1998). Utilisation répétée des gonadotropines exogènes dans le contrôle dela reproduction: justifications, relations structure-activité biologique, effets secondairespotentiels. Une synthèse. *Ann. Méd. Vet.* 142, 373-396.
- Drioncourt MA, thatcher WW, terqui M. andrien D. 1991b. dynamics of ovarion follicular development in cottle during the oest rows cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom. Anim endocrinol*, 8, 209-221.
- Driancourt (M.A), 2001. Regulation of ovarien follicular.
- Elaidi L., Ectors F., et Lakhdissi H.1996a, "Effet de différents traitements sur la réponse à la superovulation chez la race bovine « Oulmez-Zaer » ", «Reproduction et production laitière», III^{ème} Journées Scientifiques du réseau thématique Biotechnologies Animales de l'AUPELF - UREF., pp.295-299.

- **Elaidi L., Ectors F., et Lakhdissi H.1996b**, "Premiers résultats de transplantation embryonnaire chez la race bovine « Oulmez-Zaer »", «Reproduction et production laitière», III^{ème} Journées Scientifiques du réseau thématique Biotechnologies Animales de l'AUPELF-UREF., pp. 301-304.
- **Eldsen RP, Nelson LD, seidel GEJr,1978**, super ovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9, 17-26.
- **Ennuyer, M. 2000**, les vagues folliculaire chez la vache: application pratique à la maîtrise de la reproduction. *Point vét.* 31 (209) 377-383.
- **Erickson. BH. 1966**: developpement and radio-responnse of the prenatal bovin ovary. *J. repord. Fert.* 10; 97-105 in drion et al 2000. *anim. Med. Vet.* 144; 115-135.
- **Escouflaire Ph., Dumont P., Maniere J., et Leon D., Mercier A., Bouchard F.,Tainturier D., Fieni F., Bruyas J.F.1989**, "Recherche d'une dose optimale de P-FSH dans la superovulation des bovins", 5th Scientific Meeting A.E.T.E., Lyon, 8-9 September , Proc 150.
- **Estrada J.L., Pachon L.A., Olivera M., Pidrahita J., Weshusin M.(1998)**. Superovulatory response of colombian creole cattle to two doses of FSH.*Theriogenology.* 49, 377.
- **Evans C. 1991**. application of reproductive technology to the Australian livestock industris. *Reproduction. Festility and development* 3, 627-650.
- **Fortune J.E.Sirois J. Quik S.M.1988** .The growth and différenciation of ovarian follicules during the bovine estrus cycle .*Theriogenologie.*29 :95-109.
- **Fortune J.E.Sirois J., Turzillo A.M. Lavoit M.1991**. Follicule selection in domestiques ruminants .*J.Reprod. Fert supp* I.43 :187-198.
- **Fortune JE, vincent SE. 1994**. ovarian follicular growthand development in mammals. *Diol Reprod*, 50, 225-232.
- **Freret S., Grimard B., Ponter A., Humblot P. (2000)**. Variation du niveaud'apport nutritionnel et production d'ovocytes et d'embryons chez les ruminants: étudebibliographique. *Elev. Insem.* 297, 3-25.
- **Ginther O.J, Kastelic JP, Knopf L, 1983**. composition and characteristics of follicular vaves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod.sci*, 20, 187-200.
- **Gonzalez- pedilla, Bruiz. R, lefever, D, Denhain, A, with bank, JM, 1975**. puberty in beef heifers III induction fertile strus *J. anim. SCI.*40 : 1110.
- **Gorden I, 1996** *Reproduction in cattle and buffalos*. Vol I, cab international, UK.
- **Gospodoriviez D. Birdwell C.R.1977**, effect of Fi broblast and epidermal growth factor on ovarian cell proliferation "in vitro" *endocrinology*, 100, 1108 (Abst).
- **Goulding D., Williams D.H., Roche J.F., Boland M.P. (1991)**. Superovulationin heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle stimulating hormoneduring the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology.* 36, 949-958.
- **Green Wald (G.S).1972**. of eggs and follicules (editorial) *Am. J.Anort.*137.1-
- **Green Wald G.S.1992**. Teranova p.f. Follicular selection and its control. In the physiology of reproduction ed. E. Knobil et J. Neill et al .Raven press, LTD, New York, .11.387.
- **Greve.T,1982**. Embryo-Transplantation in dairy cattle: an attempt to analyse factors that many affect embryo number and quality. Deuxième congrés international: "transfert d'embryons chez les mammifères", 251-276.

- **Grimord (B), Humblot (P), ponter (A.A), Ghanstan (S), 2003, Constant (F), Mialot (J.P)** efficacité de traitement de synchronisation des chaleurs dans les bovines, *Revus édités par INCA, Prod. Anim.* 16, 211-227.
- **Guerin B- 2001-** Embryo Transfert Activity in 200 : France – in: proceedings 17th AETE meeting, lyon, 07-08 septembre 2001:38.
- **Guibault. L.A.1991.** The influence of the présence of a dominant follicle on superovulatory reponse in Holstein heifers *Bulletin-agriculture .Research, no_14;* 25-27 in: Gordon I.1996. *Reproduction in cattle and Buffales vol I .CAB international.*
- **Guignot, F (2003)** le point sur la cryoconservation des embryons. Dans *biotechnologies de la reproduction : quoi de neuf. Association pour l'étude de la reproduction animal, maison Alfort, France.* 77-88.
- **Hanzen CH, tourtie O, Drion PV, 2000,** le developpement folliculaire. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vet.* 144-223-235.
- **Hahn J. (1992).** Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology.* 38, 269-275.
- **Hasler J.F.2003,** "The current status and future of commercial embryo transfer in cattle", *Anim. Reprod. Sci.,* 79, pp.245-264.
- **Hasler JE. 1992** curent status and potentiel of embryo transfert and reproductive technology in dairy cottle. *Jounal of Dairy science* 75. 2857-2879. in. I an Grd on, R crodution in cottle and Buffaloesm vol. 1. 1996.
- **Hasler JF.2001,** "Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle", *Theriogenoloy ,* 56, pp.1401-1415.
- **Hasler JF.2004,** "Factors influencing the success of embryo transfer in cattle", 23^{ème} Congrès mondial de Buiatrie., Quebec Canada, 11-16 juillet .
- **Herrier A., Elsaesser F., Parvizi N., Niemann H. (1991).** Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology.*35, 633-643.
- **Heller (D.T), cahill (D.M). Schultz (R.M),1981-** biochemiol studies of mammalian oogenesis metabolic cooperativity between granulose cells and growing mouse oocytes. *Dev. Boil,* 81, 455-464.
- **Hirshfield AN.1989.** Rescue of atretic follicles in vitro an in vivo. *Biol. Repor ,dm* 40. 181-190.
- **Hochi S. Fryimoto T. braun J et Oguri N, (1994)** pregnancies following transfer of equine embryos cry op reserved by vetrification *theriogenology* 42, 483-488.
- **Hochi S. Fujimoto T et Oguri N, (1995)** large equine blastoysts are damaged by vitrification procedures. *Reproduction, fertility and development,* 7, 113-117.
- **Hockley D.K., BO G.A., Palasz A.T., Del Campo M.R., Mapletoft R.J.(1992).** Superovulation with a single subcutaneous injection of folltropin in the cow: effect ofdose and site of injection. *Theriogenology.* 37, 224.
- **Hughes FM. Gorosp WC. 1991** Biochemical identification of apoptosis (programmed all death) in granulosa cells: evi dence for potential mechanism underlying pollicolor atresia. *Endocrinologm* 129. 2415-2422.
- **Huhtinen M. raino V. aalto J. Bredbacka P. maki. Tanila, 1992.** Increqsed ovqriqn responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 37: 457-463.
- **Humblot P, Rodrigues JL, Nibort M, Silvestrum, Tiezzi FL. Jean Guyot N, Thibier M, 1994.** effet du mode de synchronisation des cycles sexuels sur la

réponse hypophysaire et la fonction ovarienne après super ovulation chez la vache. *Elevage & insémination* 261: 7-18 in : combronus y. volland – Nail P, 1997. les Gonadotropines. INRA. Paris.

- **INRA 1980** Blastographie du développement précoce de l'embryon bovin super ovule. *Elen et Insém*, 178, 1-27.
- **INRA-UNCEIA (1990)**. Blastographie. *Elev. Insem.* 235, 39 pages.
- **Ireland JJ. Roche JF 1982**. development of antral follicles in cottle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormone. *Steroids in follicular fluid and gonodotrophin receptors, endocrinology* 111: 2077.
- **ITEBO.**, "Connaissance de la race bovine Algérienne. La cheurfa"., (1997).
- **Jones PBC. Welsh Jr.T.H. H such AJW.1982**. Regulation of ovarian progesterin production by epidermal growth factor in cultured gramkosa cells. *J. boill, chem.* , 257, 1268.
- **Jordt T., et Lorenzini E.1990**, "Multiple superovulation in Ndama heifers", *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 22, 178-184.
- **Jordt T., Mahon GD., Touray B.N., Ngulo W.K., Morisson W.I., RAWLE J., et Murray M,1986.**, "Succesful transfert of frozen N'dama embryos from the Gambia to Kenya", *Trop.Anim.Prod.*, , 18, pp.65-75.
- **Journal of animal science 72,1996** (suppi.I) journal of Dairry science (sppi.I). 373. Im: Gordon I. Reproduction in: cattle and Buffaloes. Vol I, cab international, UK.
- **Kanitz W, Becker F., Schneider F., Kanitz E., Leiding.C., Nohner H.P,2002.**, et Pohland.R., "Superovulation in cattle practical aspects of gonadotropin treatment and insemination", *Reprod. Nutr. Dev.*, 42, pp.587-599.
- **Kafi M., McGowon M.R. (1997)**. Factors associated with variation in the superovulatoryresponse of cattle. *Ani. Reprod. Sci.* 48, 137-157.
- **Kelly P., Duffy P., Roche J.F., Boland M.P. (1997)**. Superovulation in cattle:effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response andendocrine patterns. *Ani. Reprod. Sci.* 46, 1-14.
- **Kennedy LG, Boland. MP, Gordon I, 1983**. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryo. *Theriogenology* 19, 838,832.
- **KO JCH, Kastelic JP. Del compo MR, Ginther O. J, 1991** effects of a dominant follicule on ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers. *J. repord. Fest.* 91, 511-519.
- **Lafri M., Ponsart C., Nibart M., Durant.M., Morel. A.,Jeanguyot N., Badinant F., De Mari K., et Hunblot P.2002**, "Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle", *Theriogenology.*, 58, pp. 1141-1151.
- **Lafri, 2003**, cours de troisième année.
- **Lakhdissi H., et Ouanane B.1996**, "Résultats préliminaires d'un programme de transfert d'embryons conduit en ferme", «Reproduction et production laitière», III^{ème} Journées Scientifiques du réseau thématique Biotechnologies Animales de l'AUPELF-UREF., pp. 279-286.
- **Lane M. bavister, BD. Lyons EA et Forest, KT. (1999)** containerless vitrification of mammalian oocytes and embryo, *nature* 17, 1234-1236.
- **Lauriere P., Manier J., Chastant S., Grimard B. (2001)**. Facteurs devariation de la production d'embryons chez des vaches Charolaises superovulées en régionBourgogne. *Rencontre Recherche Ruminants.* 361-364.

- **Leibo SP.1981** Preservation of av and embryo by freeing. I "New technologie in animals breeding" Eds. BJ. Brekett, GE. Seidel and SM. Academic press, NY. 127-140.
- **Lerner S.P., Thayne W.V., Baker R.D., Henschen T., Meredith S., Inskeep E.K., Dailey RA., Lewis P.E., et Butcher R.L.1986**, "Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows", J. Anim. Sci., 63, pp. 176-183.
- **Lindse C.E., Rajkumar K., Manning A.W., Emery S.K., Mapletof R.J., Murphy B.D. (1986)**. Variability in the FSH:LH ratios among batches of commercially availablegonadotrophins. *Theriogenology*. 25, 167.
- **Lonergan. P. 1992**, studies in the in vitro maturation, Fertilization and culture of bovine follicular ovocytes. PhD. Thesis, National university of Ireland. Dublin.
- **Lucas. Hahna. Niemannh. 1991**. aspect of bovine embryo production in ovo and in : proceeding 7th Aete. Meeting, cambriadg, 14-15 september 1991: 63-75.
- **Lucy MC, Staples CR, Michel FM. Thatcher W.W, Bolt D. J. 1991**. effect of feeching calcium soops to Early post partum dory cows on plasma prostaglandin F2- alpha luteinizing hormones, and follicular (GS) of and follicules (editorial). *Am. J. Anat*, 1972, 137. 1-4.
- **Lucy M.C Savoi.J.D.Badinga L. De La Sota RL., Tatcher ww.1992** .Factors That affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J.Anim. Sci*, 70,3615-3026.
- **Lussier JG; Matton P, Duffour JJ 1995**: growth rates of follicules in the ovary of the cow. *J. reprod Festil 1987*. 81: 301-307.
- **Malafosse A.** l'insémination des différentes espèces animaux dans le monde. Document UNCEIA. Paris.
- **Manciaux L., Ponsart C., Grisouar D., Humblot P. (2000)**. Sources ofvariation in embryo production following superovulation in the monbeliard breed.*Theriogenology*. 53, 502.
- **Mapletoft. RJ, Pierson, 1993**. featured article: factors affecting super ovulation in the cow. Practical considerations. TETS. Embryo transfer News letter 1993; 11:15-24. in : Greve, T, callesen H, Hyttel, P, Hoier, Rond. Assey, R. 1995. the effects ofexogenous gonadotropine on ovocute and embryo qualite in cattle. *Theriogenology* 43: 41-50, 1995.
- **Mariana J.C. Millier C.1977** .Application de quelque modeles de dynamique des populations à l'état de la folliculogénèse ovarienne *Ann. Biol .Anim. Bioch.Biophys*.17.193-206.
- **Marion (GB) et coll. 1968**. *Am. J. vet. Res.* 29, 71-75. in vaissaire.
- **Menezo,y (1982)**. Mtabolisme et regulation des premiers stades du développement embryonnaire. Embryo Transfer and in vitro Fertilisation 2nd word conference. Annecy, 20, 21-22 septembre, P 17-25.
- **Monniaux, D. chupin, D; Sammande, J, 1983**. superovulatory reponse of cattle. *Theriogeniology*. 19: 55-64.
- **Monniaux, D. Monget, 1997**. Gonadotropine et révélation paracrue ovarienne dons combarnus y. Volland-NAILP. Les gonadotropme. Eds. INRA, 276-284.
- **Morgan (WF) lean (IJ),1993**. Genadotrophin-releasing hormone Treaturnt in cattle a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. *Aust vet. J*, 70, 205-209.
- **Monniaux D. mondon. Pepin B. monget P. 1999**. l'atreire folliculaire, un gaspillage programme. *Médecine/science* 15 : 157-606.

- **Murphy M.G., Boland M.P., et Roche J.F., 1998.**, "The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers", *Theriogenology.*, 49, pp.557-569.
- **Nibart. M et thibier. M. 1987**, le transfert embryonnaire en France .3^{ème} colloque scientifique de l'AETE. Lyon, 1987, 27-39.
- **Nibart M. 1991**, "Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage", *Rec. Med. Vet.*, 167, pp.261-290.
- **O'callaghan D., Boland M.P. (1999)**. Nutritionnal effects on ovulation, embryodevelopment and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim. Science.* 68, 299-314.
- **Palaiz, AT. Nibort M. martin. Sportiello, T et Humblot, P. (1996)**. Progress recent de la congélation d'embryons et d'ovocytes de mammifères. Principes généraux. *Elevages et insémination* 273, 1-13.
- **Pedersen.T, 1972** follicle growth in the mouse ovary. In Buggers JD, Schuetz.A.W, oogenesis, Butterworths, London.361.
- **Peters AA. Ball PJH. 1987**. reproduction in cattle. Butterworths England.
- **Pursley. J.R, Silox. RW, W.A. bank C.W, 1998**. effect of time of art artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci*, 81, 2139-2144.
- **Purwantera B, Schmidt M, Callesen H and Greve. T, 1994** a follicular development and embryo recovery. Following 3 versus FSH injection in heifers. *Acta veterinaria scandinavica* 35. 1 89-93.
- **Putney D.J., Drost M., Thatcher W.W. (1988)**. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 postinsemination. *Theriogenology.* 30, 195-209.
- **Rajamahenfran R. sianangana PC. 1992** Effect of human chorionic gonadotropin (HCG) on dominant follicles in cows. Accessory corpus luteum formation progesterone production and pregnancy notes. *J. reprod. Fert.*; 95: 577-584.
- **Rall WF, Fohy GM, 1985**. Ice – free cryo preservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. *Nature*, 313, 573-575.
- **Rhodes (FM), Burke (CR), Clark (BA), Day (ML). Macmillan (KL), 2002**. effect of treatment with progesterone and bestradiol benzoate on ovarian follicular Turnovers in post partum Anestrus cows and cows with have Resumed estrous cycles. *Anim. Reprod. SCI*, 69, 139-150.
- **Riviera CM, Goni CG, Chaves. MA, Ferreros B, BO. CA, 1998**, ovarian follicular wave. Synchronisation and induction of ovulation in post partum beef cows. *Theriogenology*, 49, 1365-1375.
- **Roch JF, Irland J.J, 1981**. Effect of exogenous progesterone on time of occurrence of the LH. Surge in heifers. *J. anim SCI*, 52, 580-586.
- **Rodriguez HF, Newendorff DA, Lewis, AW, 1994**. Chose, CC, Jr and Randel. RD. Endocrine and ovarian responses in beef cattle super ovulated with two different FSH preparations.
- **Rosenberg M, Kaim H Herz.Z, Folman.Y, 1990**. Comparaison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 1. effects on plasma progesterone and manifestation of estrus. *J. dairy. SCI*. 73:2807-2816.
- **Saumande.j, 1981**. Ovogénèse et folliculogénèse. *Rec. Med-vet.* 157, (1), 29-38.

- **Saumande J, 1995.** la production d'embryon chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de super ovulation ? INRA, prod, Anim 8 : 275-283.
- **Saumande J, procureur R; Chupin D 1984:** effet of injection time of anti. PMSG anti serum on ovulation rate and quality of embryos in super ovulated cows. Theriogenology:21; 727-731.
- **Saumande J, 1991,** la folliculogènes chez les ruminants. Rec Med Vét 167: 205-218.
- **Schneider HJ.Jv, Caslelberry RS, Griffni JL,1980,** Commercial aspects of bovine embryo transfer. Theriogenology. 13, 73-85. 1980.
- **Scriban R.1999.** Biotéchnologie, 5ème edition. P629-761.
- **Seidel GE Jr, seidel SM,1991** Travining manual for embryo transfert in cattle. FAO, anima production and health paper, 77.
- **Shea BF,1981,** Evaluation the bovine embryo. TR eriogenology. 15, 31-42.
- **Shimane W. nibart M. thuard JM. Keita J. Band Hamblot P. 1995.** effect of controlling the moment of alwith a fild LHKit on the number and quality of embryos collected from super ovulated cows. In proceeding of the II the metting of dirteuropean. Embryo transfer association (Hanover), P, 240.
- **Sirard, MA, Florman, HM. Leiberied. Rultedge, ML. 1989.** timing of nuckor progression and protein synthesis sonography. Boil of Reprod. 39, 308-317.
- **Sirois J0 fortune JE, 1988.** ovarian follicular dynamics during the oestrows cycle in heifers monitored by real-time ultra sonography. Boil of reprod, 39, 308-317.
- **Sirors J, fortune JE, 1990.** lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studuing ovasion follicular dommance endocrinology, 127, 216-225.
- **Skinner M,1987.** k ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor- like substance endocrinology,121, 1892-1896.
- **Smith C. 1990.** breeding strategies to copitalize on new technologies. In of the 23rd international Dairy congress (montreal). Vol Agricol 2^e édition.
- **Staigmiller, RB, short, RE, Bellows, RA and Hall, JB. 1994,** variations in a single injection protocol for super ovulation of beef cows. Journal of Animal science.
- **Suzuki T, yamamoto. M, Oe M, Takagi M, 1994** super ovulation of beef cows and heifers with a single injection of dilute in poly viny lpyrrolidone. Vet. Rec 135: 41-42.
- **Taylor C, Manikkan M, Rajamahendrou R, 1994.** changes in overian follicular dynalics and luteinizing hormone profiles following different progestetogen treatments in cottle. Can J, Anim. Sci, 74, 273-279.
- **Taylor C, Rajamahendran R, 1991.** follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lacting dairy cattle. Can J. anim. Sci. 71, 61-68.
- **Thibault C. levesseur MC. 2001.** la reproduction chez les mammifères et l'homme. Coédition INRA. Ellipse, paris, 928p.
- **Thompson K.E, stevenson J.S, Lam G.C, Crieger D.M, 20 est, C.A 1999.** Follicular, hormonal and pregenancy reponses of early post partum beef.
- **Touati K, Van . Der. Zwalten, Ectors. Fs, Beckors JF, ectors. F1989,** low doses of FSH early in estrous cycle enhances superovulatory response in heifers theriorgenolozy , 31: 263 (abstract).
- **Tregaskes LD. Broadhent PJ and Roden JA. 1994.** effects of performance testing of superovulatory response in juvenile Simmental heifers. Paper N°20.

- **Tribulo H, Jofre F, Cacedo J, carcedo J, Alonso A, Tribulo R, BOGA, 1993.** super ovulation in bas indicus cattle a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Their.....* 39: 331 (Abstr).
- **Twagiramungu H, Guibault LA, proulx J.G, Dufour.J, 1994.** influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian. Follicular dynamics in increase the precision of estrus in cattle: A review. *J, Anim. SCI*, 733141-3151.
- **UNCEIA.2001,** "Les biotechnologies de la reproduction". Mars, pp.6-7.
- **Wand JI, Gang JG, Fortier, MA. Siurard, MA, 1992** differential response to gonadotropins and prostaglandin E₂ in ovarian Tissue during prenatal and postnatal development. *Boil. Reprod.* 46: 1034-1041.
- **Wang H. Wu M, Yuk, Hagel. W.C, Mapeltoft R.L,** control of the super ovulation in the cow with a PMSG antiserum. *Theriogenology*.
- **Whittingham DG. Leibo SP.1972** Survival of mouse embryos frozen to 196°C and 269°C. *science (wash DC)*, 178, 411-414.
- **Wihmut I. rowson LEA.1973,** Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686-690.
- **Wilson JM, Jones AL, Moork, looney. CR, Bondioli KR, 1993.** super ovulation in cattle with a recombinant DMA bovine follicle stimulating hormone. *Ann. Reprod. Sci.* 33, 71.82
- **Wright JM,1981.** Non-Surgical embryo transfer in cattle: embryo recipient interactions. *Theriogenology*, 15, 43-56.
- **Yaakub H., Duffy P., O'callaghan D., Boland M.P. (1998).** Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to gonadotropin treatment on superovulatory response, and on embryo yield and quality in beef heifers. *Ani. Reprod. Sci.* 52, 191-204.
- **Yamamoto M., OOE M., Fujii C., Suzuki T. (1993).** Superovulation of Japanese Black heifers treated with FSH-P and FSH-R. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 133-134.
- **Yanagimachi, R. 1994.** mammalian fertilization In: Knobil, E Meill, JD. (Eds) *the physiology of reproduction*, second edition laven press ltd, New york, 189-317 (IN Drion et al 2000).
- **Zeitoun MM. yassen AM, Hassen AA. Fathelbas AZ. Wise TH. Maurer BR,1988.** Superovulation using PMSG and; PMSG in beef cows. *Theriogenology*, 29 (2), 339.