



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida



Université Saad
Dahlab - Blida 1-

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**ESSAI DE PRODUCTION D'EMBRYONS BOVINS
EN UTILISANT DES EXTRAITS HYPOPHYSAIRES**

Présenté par
Wahiba Kaced

Devant le jury:

Président(e) : KAIDI R.	Pr	ISVB
Examineur : KALEM A	MAA	ISVB
Examineur : YAHIMI A.E.K	MAA	ISVB
Promoteur : ADEL D.	MAA	ISVB

Remerciements

Je remercie mes parents, mes frères et mes sœurs pour leur encouragement indéfectible, qui m'a permis de réaliser que la patience était la clef de la réussite.

Je remercie mon encadreur **D^r Adel**, pour tous ses conseils et ses recommandations, pour sa patience ainsi que pour sa présence tout au long de mon travail.

Un grand merci à **D^r Yahimi** pour avoir accepté d'examiner ce travail, ainsi que **D^r Kalem**, avec qui j'ai pu réaliser le suivi d'élevage, et qui m'a fortement aidée dans la réalisation de mon projet de fin d'études.

Merci au **P^r Kaidi** d'avoir accepté de présider ma soutenance.

Un grand merci à notre invité d'honneur **P^r Hanzen**, qui nous honore de sa présence à la soutenance.

Je tiens à remercier **M. Bouchemal**, le directeur général du **CNIAAG**, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de fin d'étude au sein de son établissement. Merci également à ses vétérinaires et à tout l'ensemble du personnel.

Wahiba

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à toute ma famille : mon père, ma mère, mes frères Samir, Réda, Djoudi, et Lotfi, ainsi que mes sœurs Nadia, Nabila, Assia, et Souhila.

À mes neveux et nièces Akli, Ines, Lina, Celyann, Aïda, Wassim, Rimel, Manyl, Nelya, Adam, et enfin, Massyva.

À mes belles sœurs, Florie-Anne, Assia,
Et mes beaux-frères, Omar, Mounir et Samir,
Sans oublié tous mes amis de l'institut.

Wahiba Kaced

Table des matières

Remerciements et dédicaces

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Résumé

Introduction générale **1**

Chapitre I : Physiologie de la reproduction chez la vache

1. Introduction **3**

2. Contrôle hormonale

2.1. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique : **4**

2.2. L'œstrus et le cycle œstral de la vache : **4**

3. Folliculogénèse et ovulation

3.1. Notion de vagues folliculaires **6**

3.2. La folliculogénèse **9**

3.3. L'ovulation **12**

4. Conclusion **14**

Chapitre II : Production d'embryons bovins

1. Introduction **15**

2. La superovulation	17
3. Objectif	17
4. Critères de choix des donneuses	17
5. Résultats de la superovulation	18
6. Suppression de la sélection et de la dominance : induction de la superovulation	19
7. Traitements utilisés en France	20
8. Traitement de superovulation utilisant une seule injection de FSH	21
9. Récolte des embryons	24
10. Classification des embryons récoltés	24
11. Paramètres métaboliques	26
12. Relation entre BCS et production d'embryons	27

Chapitre III : Expérimental

1. Introduction	28
2. Matériels	29
2.1. Elevage	29
2.2. Hormones et milieux	30
2.3. Matériels de l'IA et récolte	31
2.3.1. IA	31
2.3.2. Récolte	32

3. Méthodes	34
3.1. Suivi de la cyclicité	34
3.2. Traitement de superovulation et récolte	35
3.2.1. Traitement de superovulation	35
3.2.2. Récolte	39
4. Résultats	41
4.1. Suivi d'élevage	41
4.2. Suivi de la cyclicité	42
4.3. Réactions ovariennes aux traitements et résultats de récolte	43
5. Discussion	46
6. Recommandations	48
7. Conclusion	49
Références	50
Annexes	53

Liste des abréviations :

% : pourcentage

Ceva : laboratoire pharmaceutique vétérinaire mondial implanté dans 42 pays.

CJ : corps jaune.

Cm : centimètre.

CNIAAG : centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique.

Emb : embryons.

FSH: Follicle Stimulating Hormone.

GH: Growth Hormone.

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone.

H: heure.

hCG: Human Chorionic Gonadotropin.

IA : Insémination Artificielle.

IBR/IPV : *Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis*

IETS: *International Embryo Transfer Society*

IM : intramusculaire

IMV : instrument de médecine vétérinaire.

INRA : institut national de la recherche agronomique.

IV : intraveineuse.

J : jour.

KFL : kyste folliculaire lutéinisé.

LH : Luteinising Hormone.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

pFSH : porc Follicule Stimulating Hormone.

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin.

SC : sous cutané.

ZP : Zone Pellucide.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effet du traitement utilisé sur le % de génisses superovulées, % d'ovulation, le nombre de follicules, le nombre de CJ, le nombre d'ovocytes fécondés, d'embryons transférables et le % d'embryons transférables	23
Tableau 2 : Classification des embryons selon leur qualité	25
Tableau 3 : effet du score corporel sur la production d'embryon	27
Tableau 4 : protocole de superovulation de la vache 1	36
Tableau 5 : protocole de superovulation de la vache 2	36
Tableau 6 : protocole de superovulation de la vache 3	37
Tableau 7 : protocole de superovulation de la vache 4	37
Tableau 8 : protocole de superovulation de la vache 5	38
Tableau 9 : Evolution du BCS pendant les visites du suivi	41
Tableau 10 : structures palpées sur l'ovaire pendant les visites du suivi de la cyclicité	42
Tableau 11 : Réaction ovarienne au traitement	43
Tableau 12 : Réaction ovarienne au traitement selon le protocole suivi	43
Tableau 13 : Résultats de la récolte	44
Tableau 14 : Note BCS au début du traitement	45

Liste des figures

Figure 1 : Cycle sexuel de la vache (Extrait de Réussir Lait Élevage, 2003).	4
Figure 2 : Emergence d'une nouvelle vague folliculaire (www.reprology.com)	6
Figure 3 : Représentation schématique de l'ovaire (Gayrard ; 2007)..	7
Figure 4 : Événements cellulaires, endocriniens et comportementaux du cycle œstral de la vache (Gayrard, 2007).	13
Figure 5 : Sécrétion des hormones gonadotropes (LH, FSH) et des facteurs de rétrocontrôle (œstradiol et inhibine) au cours des phases de recrutement, sélection et dominance (Gayrard , 2007)..	20
Figure 6 : Schéma de traitement de superovulation par FSH-p (en phase lutéale d'un cyclenaturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes)(d'après Nibart, 1991). .	21
Figure 7 : Schéma de traitement de superovulation par PMSG (en phase lutéale d'un cycle naturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes) (d'après Nibart, 1991)..	21
Figure 8 : Représentation schématique des protocoles suivis par Carvalho et <i>al.</i> , 2014.	22
Figure 9 : Différents stades du développement embryonnaire de J0 à J9 (Torres et Sevellec 1987).	24
Figure 10.1 : les étables vues du ciel – Google Maps	29
Figure 10.2 : l'étable des vaches laitières	29
Figure 11.1 : Donneuse Normande	29
Figure 11.2 : Donneuse Fleckvieh	29
Figure 12 : Minicutter	31
Figure13 : Paillettes de semence 0.25ml	31
Figure 14 : Echographe DRAMINSKI	32
Figure 15 : Sonde de récolte à 2 voies avec mandrin	32
Figure 16 : Microscope inversé Hund	33
Figure 17 : Diagramme de superovulation du protocole 1.1.	36
Figure 18 : Diagramme de superovulation du protocole 1.2.	36
Figure 19 : Diagramme de superovulation du protocole 2.1	37

Figure 20: Diagramme de superovulation du protocole 2.1.	37
Figure 21 : Diagramme de superovulation du protocole 2.2.	38
Figure 22: Epidurale basse	40
Figure 23 : Introduction de la sonde avec mandrin, à un angle de 45°	40
Figure 24 : Rinçage : injection du PBS	40
Figure 25 : Rinçage : récolte du PBS	40
Figure 26 : Liquide de récolte sur plaque chauffante	40
Figure 27 : Observation sous microscope optique	40
Figure 28 : Diagramme de l'évolution de la moyenne des BCS des 5 vaches donneuses	42
Figure 29.1 : Réaction ovarienne au traitement (corps jaunes compactés)	43
Figure 29.2 : Réaction ovarienne au traitement	44
Figure 30.1 : Ovocyte	45
Figure 30.2 : Embryon dégénéré	45

Liste des annexes

Annexe 1 : Injection de la FSH

Annexe 2 : Matériel d'IA

Annexe 3 : IA profonde

Annexe 4.1 : Laboratoire mobile

Annexe 4.2 : Beine du laboratoire mobile

Annexe 5 : Désinfection de la région périnéale

Annexe 6 : Gonflement du ballonnet.

Annexe 7 : Hygiène de l'étable à la 2^{ème} visite

Annexe 8 : Cervicite de la vache 0455

Annexe 9 : Tableau récapitulatif des traitements de superovulation et récolte.

Annexe 10 : Tableau récapitulatif du suivi d'élevage des 5 vaches superovulées.

Résumé

Dans le cadre d'un essai de production d'embryons bovin en utilisant des extraits hypophysaires porcins (pFSH), nous avons suivi deux protocoles : l'un classique à 8 injections, et l'autre simplifié à 3 injections, sur chaleurs naturelles et induites. Notre travail s'est effectué sur 5 vaches primipares de deux races : Montbéliarde et Fleckvieh, appartenant au CNIAAG. Le traitement de superovulation simplifié que nous avons suivi consiste en l'injection de 3ml de pFSH (Stimufol FSH/LH = 20%) une fois par jour pendant 3 jours (total 9ml), et l'injection de 3ml de PGF2 α au 3^{ème} jour. L'IA a eu lieu systématiquement suivant le protocole.

Sur les 5 traitements de superovulation, nous n'avons pu récolter que 3 vaches, donnant au total un seul embryon mais dégénéré, et 8 ovocytes non fécondés, même si la réaction ovarienne globale était d'une moyenne de 10CJ/vache. Nous avons pu constater une différence dans la réaction selon le protocole, elle était plus élevée pour le protocole à 8 injections (13 CJ), que pour celui à 3 injections (8 CJ).

Mots clés : superovulation – vaches – FSH – embryon – ovocyte.

Abstract

As part of the production of bovine embryos assay using porcine pituitary extracts (pFSH), we followed two protocols: one vector to 8 injections, the other reduced to 3 injections on natural and induced heat. Our work is carried out on 5 primiparous cows of two breeds: Fleckvieh and Montbeliarde belonging to CNIAAG. The simplified treatment of superovulation we followed involves the injection of 3ml pFSH (Stimufol FSH / LH = 20%) once daily for 3 days (total 9 ml), and the injection of 3ml of PGF2a on the 3rd day. AI took place systematically according to the protocol.

Of the 5 cows superovulated, we were able to reap 3, giving a total of only one embryo but degenerated and eight unfertilized oocytes, although the overall response was of an average of 10CL / cow. We have seen a difference in the reaction according to the protocol, it was higher for the protocol to 8 injections (13 CJ), than for one to three injections (8 CJ).

Keywords : superovulation - cows – FSH – embryo – oocyte.

ملخص

كجزء من إنتاج الأجنة في الأبقار باستخدام مستخلصات الغدة النخامية (pFSH)، تابعنا بروتوكولين: بروتوكول أول متكون من 8 حقن، والآخر من 3 حقن، على حرارة طبيعية ومسببة. تم عملنا على 5 أبقار من سلالتين اثنتين: Fleckvieh و Montbeliarde ينتمون إلى CNIAAG. العلاج المبسط من فرط الإباضة ينطوي على حقن 3مل من pFSH (Stimufol FSH / LH = 20%) مرة واحدة يوميا لمدة 3 أيام (مجموع 9 مل)، وحقن 3مل من PGF2 α في اليوم الثالث. التلقيح الإصطناعي تم بصورة منهجية وفقا للبروتوكول.

من 5 الأبقار المعالجة ، تمكنا من حصد 3، أي ما مجموعه جنين واحد فقط ولكن ميت، وثمانية البويضات غير المخصبة. على الرغم من أن الاستجابة الكلية كانت في المتوسط من 10 أجسام صفراء / البقرة. لقد رأينا اختلاف في رد الفعل وفقا للبروتوكول، فإنه كان أعلى للبروتوكول ب 8 حقن (13 أ.ص.)، من بروتوكول حقن (8 أ.ص.).

كلمات المفتاح: فرط الإباضة – أبقار – FSH- جنين – البويضات.

Introduction générale :

La production et la multiplication d'animaux d'élite constitue l'objectif primordial de tous les éleveurs. Malheureusement dans l'espèce bovine, la sélection du patrimoine génétique est en partie limitée par des facteurs tels que la prolificité, la durée de gestation et l'intervalle entre les générations. Depuis ces dernières décades de nouvelles techniques sont venues au secours des éleveurs et des zootechniciens.

En effet, chez le mâle, l'insémination artificielle et la congélation du sperme ont permis d'utiliser au maximum la potentialité des taureaux primés, et cela d'autant plus facilement que chez le mâle la spermatogénèse est un phénomène continu depuis la puberté.

En revanche, chez la femelle les choses ne sont pas aussi simples. Très tôt, au cours de la vie embryonnaire, les cellules germinales se multiplient et les premières ovogonies entament leur méiose et se bloquent au stade diplotène de la prophase méiotique. Dès la fin de la gestation, cette multiplication s'arrête et à ce moment, la femelle possède tout son capital reproducteur. Une période quiescente très longue va débiter, durant laquelle l'ovogonie est stockée sous forme de follicule primordial. A la naissance, l'ovaire de la vèle contient environ 100 000 ovogonies, dont la plupart va subir l'atrésie et seules quelques-unes d'entre elles serviront à la reproduction (Ectors et *al.*, 1989). Un tel gaspillage ne pouvait laisser les biologistes insensibles et ils se sont attachés à préserver ce capital par différents moyens : telles la superovulation et la transplantation embryonnaire, la micromanipulation, la séparation des blastomères et le clonage.

La superovulation a pour but de stimuler la folliculogénèse de manière à obtenir l'ovulation simultanée de plusieurs follicules et à donner au transfert d'embryons sa pleine efficacité.

Une telle manipulation devrait prendre une grande place dans la gestion de l'élevage et l'avancement des techniques de reproduction. Cependant, les résultats stagnent depuis des années à cause des échecs ou des résultats insatisfaisants. Les chercheurs et les praticiens se sont intéressés à étudier les facteurs limitant le nombre et la qualité d'embryons produits après traitement de superovulation. Parmi eux, ceux qui ont conclus

que le stress lié à l'injection répétée des hormones pourrait être la cause de ces résultats insatisfaisants.

Nous nous intéressons dans cette étude à comparer les résultats d'un traitement de superovulation suivant le protocole classique de huit injections biquotidiennes à doses décroissantes d'extraits hypophysaire porcin, et les résultats d'un traitement de superovulation suivant un protocole simplifié de trois injections quotidiennes à la même dose.

1. Introduction

La fonction de reproduction repose sur l'intégrité des interactions existant au sein de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Les différentes composantes de ce système se différencient très tôt au cours du développement embryonnaire et établissent des relations fonctionnelles in utero qui s'avèrent nécessaires pour assurer la maturation sexuelle. Comme le fonctionnement gonadique dépend étroitement des hormones gonadotropes hypophysaires, elles-mêmes sous le contrôle de l'hypothalamus et des gonades, plusieurs travaux se sont intéressés à l'ontogenèse de ces hormones gonadotropes (Cambarnous et Pvolland-Nail, 1997).

Les gonadotropines jouent un rôle primordial dans les régulations des fonctions gamétogénétiques et endocrines des gonades. Par leur intermédiaire, le système nerveux central, qui intègre de nombreux paramètres internes et externes, exerce son contrôle sur la fonction de reproduction. C'est pourquoi la recherche des mécanismes régissant la sécrétion et l'action des gonadotropines est d'un intérêt majeur depuis plus d'un demi-siècle (Cambarnous et Pvolland-Nail, 1997).

Au cours de la dernière décennie, les développements considérables dans les techniques d'analyse des phénomènes biologiques a permis des avancées déterminantes de nos connaissances de ces hormones tant au plan moléculaire et cellulaire qu'au point de vue clinique (Cambarnous et Pvolland-Nail, 1997).

2. Contrôle hormonal

2.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique :

La physiologie du cycle sexuel est complexe et fait intervenir le système nerveux central (axe hypothalamo-hypophysaire) et l'appareil génital (ovaires et utérus).

La GnRH est synthétisée et libérée par des neurones de l'hypothalamus. Chaque sécrétion de GnRH provoque à son tour la synthèse et la libération d'hormones folliculo-stimulantes FSH, et lutéinisantes LH par l'antéhypophyse. La FSH assure le recrutement ainsi que le début de la croissance de plusieurs follicules et stimule la sécrétion d'œstrogène : hormone responsable du comportement de chaleur.

L'augmentation de la production d'œstrogènes a une rétroaction positive sur la production de GnRH et donc de LH. La LH assure la maturation folliculaire, provoque l'ovulation et la formation du corps jaune. La progestérone produite par le corps jaune pendant toute la phase lutéale du cycle inhibe la production de GnRH et donc de LH, empêchant ainsi toute ovulation. S'il n'y a pas eu fécondation, l'utérus produit des prostaglandines (PGF 2α) qui provoquent la lyse du corps jaune (Website : www.reprology.com 20-12-2015).

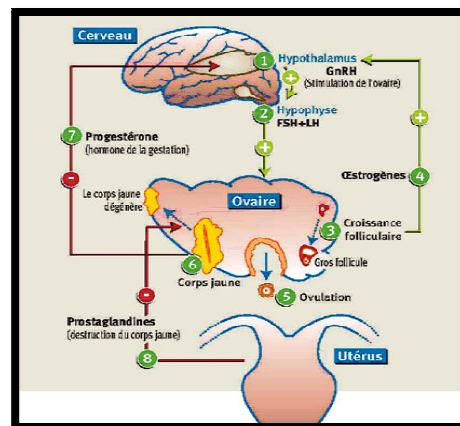


Figure 1 : Cycle sexuel de la vache (Extrait de Réussir Lait Élevage / Réussir Bovins Viande (dossier spécial médicament vétérinaire) Décembre 2003.

2.2. L'œstrus et le cycle œstral de la vache :

L'œstrus ou chaleur est la période d'acceptation du mâle et de la saillie. C'est la période de maturité folliculaire au niveau de l'ovaire, suivie de l'ovulation. Cet œstrus dure de 6 à 30 heures, et se caractérise par des manifestations extérieures : excitation, inquiétude, beuglements, recherche de chevauchement de ses compagnes, acceptation passive du chevauchement et écoulement de mucus (Bosio, 2006).

Le cycle œstral dure en moyenne 21 jours, bien que sa durée varie entre 18 et 24 jours. Il débute avec le jour de l'**œstrus** (Jour 0), soit le jour où la vache démontre des signes de chaleur (écoulement de mucus, réceptivité à la monte, vocalisation). À ce moment, la progestérone est à son plus bas niveau, alors que la concentration d'œstradiol atteint son sommet, induisant ainsi un pic de LH qui provoquera l'ovulation. Puis, le **metœstrus** couvre la période suivant l'ovulation, alors qu'un corps hémorragique est en formation pour devenir le nouveau corps jaune (Jours 1 à 5) (Pelletier, 2013).

La concentration plasmatique de progestérone est alors en croissance pour atteindre un seuil détectable au jour 4 environ. Le **diœstrus** correspond aux jours 6 à 17, soit la période où il y a présence d'un corps jaune fonctionnel produisant une quantité importante de progestérone. Finalement, le **prœstrus** est la période où le corps jaune entame sa régression, permettant ainsi une chute dans la concentration plasmatique de progestérone, ce qui favorise la croissance du nouveau follicule ovulatoire par une augmentation du nombre de pulses de LH (Jours 18 à 20) (Pelletier, 2013).

Parallèlement à ces profils hormonaux qui suivent un cycle régulier, la plupart des animaux de la ferme ont un développement folliculaire qui suit un modèle de vague pendant le cycle œstral. Chez le bovin, le cycle œstral présente typiquement 2 ou 3 vagues folliculaires, la dernière de celles-ci se terminant avec l'ovulation. La vague folliculaire suivante, qui sera la première vague du cycle œstral subséquent, débute le jour de l'ovulation, soit dans les heures suivant la chaleur (Jour 1), puis elle laissera place à la 2^{ème} vague au milieu de cycle (Jours 8 à 10). Advenant l'émergence d'une 3^{ème} vague folliculaire, la 2^{ème} vague régressera pour que débute une nouvelle vague aux Jours 15-16 environ (Pelletier, 2013).

Le follicule ovulatoire traversera trois phases avant d'atteindre l'ovulation : le recrutement (qui correspond à l'émergence de la vague folliculaire), la sélection (où le follicule dominant se distancie des autres follicules de sa vague folliculaire en acquérant les caractéristiques lui permettant de poursuivre son développement), et finalement la phase de dominance. Lorsque le follicule ovulatoire a atteint cette dernière étape, les autres follicules de sa propre vague folliculaire ont perdu la capacité de devenir dominant et deviendront ainsi atresiques. Le follicule dominant aura ainsi la voie libre pour poursuivre son développement jusqu'à l'ovulation (Aerts & Bols, 2010) (Pelletier, 2013).

3. Folliculogenèse et ovulation

3.1. Notion de vagues folliculaires :

Sous l'action de la FSH hypophysaire un groupe de follicule se développe sur l'ovaire : c'est la phase de recrutement. La diminution de la FSH induit la sélection de quelques follicules, puis la dominance d'un follicule. Le sort du follicule dominant est déterminé par la fréquence des décharges de LH ; si cette fréquence est élevée, il ovulera ; il deviendra atreétique si la fréquence des pulses de LH est basse, c'est le cas en présence de progestérone (Website : www.reprology.com).

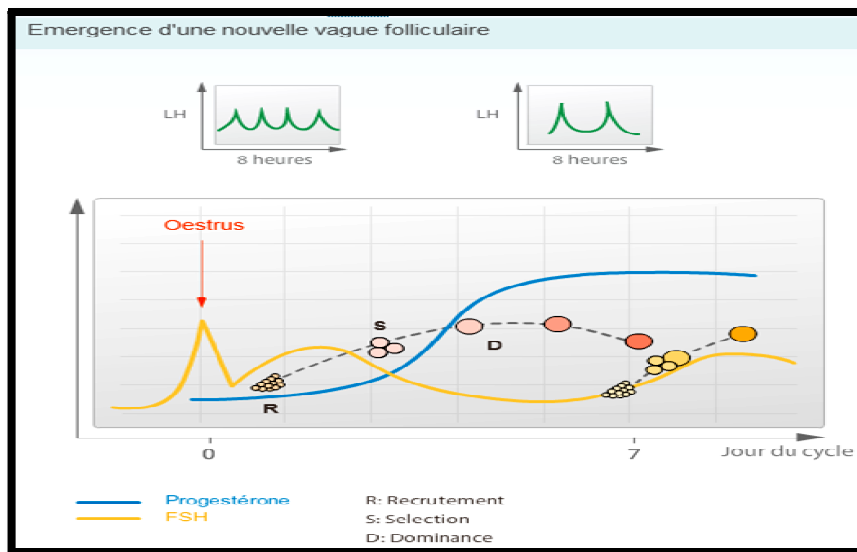


Figure 2 : Emergence d'une nouvelle vague folliculaire (Website : www.reprology.com).

Rôle de la FSH :

La FSH hypophysaire stimule l'activité de l'aromatase des cellules de la granulosa (Dorrington et *al.*, 1975, Erickson et *al.*, 1978), favorisant ainsi l'aromatation des androgènes en œstrogènes. L'activité de cette enzyme est plus importante dans les follicules dominants que dans les follicules dominés (Badinga et *al.*, 1992) (Drion et *al.*, 2000).

Chez les bovins, espèce présentant des vagues de croissance folliculaires en phase méœstrale ou diœstrale, le recrutement pourrait être déclenché par une élévation peu conséquente de la FSH ou être le résultat de l'amplification de son action par des facteurs de croissance. Une telle augmentation de la FSH avant chaque vague de croissances folliculaires a été observée chez la vache. Il lui fait suite une phase de sélection pendant laquelle, la concentration en FSH diminue (Adams et *al.*, 1992) (Drion et *al.*, 2000).

Le rôle de la FSH peut, pour une espèce donnée, dépendre de la taille du follicule. Il s'exercerait davantage sur les follicules de diamètre supérieur à 2 (Purwantara et *al.*, 1993) voire 3 ou 4 mm que sur les plus petits follicules présents au sein de la même cohorte de recrutement (Lussier et *al.*, 1994). De même, lors d'un traitement de superovulation, l'effet de la FSH se manifeste davantage et de manière plus précoce sur les follicules de taille comprise entre 2 et 4 mm ou entre 5 et 9 mm que sur les follicules de diamètre supérieur à 10mm. Comme pour la PMSG (Monniaux et *al.*, 1983), il semblerait que cet effet se manifesterait plus par une stimulation de la multiplication cellulaire que par une augmentation du volume de liquide folliculaire (Drion et *al.*, 2000).

3.1.1. Contrôle hormonal de la phase de recrutement :

Le recrutement de plusieurs follicules est essentiellement imputable à l'hormone FSH (Picton et *al.*, 1990). Des différences entre espèces ont néanmoins été constatées. Ainsi, chez la vache, différentes observations ont confirmé la relation entre l'hormone FSH et la phase de recrutement. Chaque vague de croissance folliculaire est précédée 2 à 4 jours plus tôt d'une augmentation de FSH (Adams et *al.*, 1992, Sunderland et *al.*, 1994), celle-ci apparaissant, en ce qui concerne la première vague, le jour de l'ovulation (Dobson 1978, Walters et Schallenberger 1984). L'inhibition du pic de FSH le jour de l'ovulation par du liquide folliculaire renfermant de l'inhibine retarde l'apparition de la première vague de croissance folliculaire et du follicule dominant de 1,9 à 2,7 jours respectivement et augmente ce faisant le nombre de cycles ne comportant que deux vagues de croissance folliculaire (Turzillo et Fortune 1990). Cet effet est d'autant plus net que l'administration de liquide folliculaire est précocement réalisée au cours du cycle (Kastelic et *al.*, 1990) (Drion et *al.*, 2000).

3.1.2. Contrôle hormonal de la phase de sélection :

La phase de sélection se caractérise par une diminution de la concentration de la FSH, et d'une augmentation progressive de la synthèse d'œstradiol, résultat de l'augmentation de la fréquence des pulses de l'hormone LH responsable de la synthèse accrue d'androgènes par la thèque interne. L'augmentation de l'œstradiol et plus précisément du rapport entre œstradiol et androgènes constitue une caractéristique de la dominance fonctionnelle du follicule en croissance (Sunderland et *al.*, 1994). On observe également une augmentation dans le liquide folliculaire de la concentration en inhibine. La rétroaction de l'inhibine et de l'œstradiol, variable selon les espèces, sur la FSH

entraîne la réduction de synthèse de la FSH et est responsable du processus de sélection. Ainsi, 1 à 3 jours après le recrutement, les concentrations en FSH atteignent des valeurs inférieures à celles induisant le recrutement (Adams et al. 1992), celui-ci s'arrête et l'excédent de follicules s'atrophie (Driancourt et al., 1991) (Drion et al., 2000).

3.1.3. Contrôle hormonale de la phase de dominance :

La phase finale de la période de dominance, voire la phase finale de la maturation folliculaire préalable à l'ovulation, se traduit notamment par une augmentation très nette des œstrogènes. Cette synthèse suppose la coopération des cellules de la thèque et de la granuleuse et l'intervention des hormones gonadotropes LH et FSH, la LH induisant la formation d'androgènes par la thèque interne et la FSH assurant l'aromatisation de ceux-ci en œstrogènes par la granuleuse (Richards et al., 1987). Chez la vache, ce processus présente la particularité de pouvoir être observé à des moments différents du cycle, c'est-à-dire, en présence ou en l'absence d'une imprégnation progestéronique.

Dans le premier cas, la synthèse d'androgènes et leur aromatisation en œstrogènes ne se prolonge pas au-delà du 8^{ème} voire 10^{ème} jour du cycle en ce qui concerne le follicule dominant de la première vague (Badinga et al., 1992, Sunderland et al., 1994). Cet effet limité dans le temps est imputable à l'augmentation de la progestérone dont on sait l'effet inhibiteur qu'elle exerce sur l'activité de l'aromatase (Fortune et Vincent 1983). La fin de la phase de dominance du follicule est précédée par la perte de ce follicule de sa capacité à supprimer l'effet FSH ; à produire des œstrogènes et par la perte de ses récepteurs à LH et FSH (Adams et al., 1992). Cette période coïncide avec l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire à nouveau précédée par une augmentation transitoire de la FSH (Guilbaut et al., 1993, Evan et al., 1997, Roche et al., 1997) (Drion et al., 2000).

À l'inverse, la lutéolyse induit une augmentation drastique de la synthèse d'androgènes et de leur aromatisation en œstradiol dans le follicule dominant (Fortune et al., 1988). Cette augmentation résulte d'une sensibilité accrue de la thèque à l'action de l'hormone LH dont par ailleurs la concentration basale et la pulsativité coïncident avec la diminution de la progestérone (Rahe et al., 1980, Walters et Schallenberger 1984). Ces changements de la concentration de l'hormone LH en présence de concentrations basales en FSH sont essentielles pour le devenir ovulatoire du follicule dominant. Il apparaît donc que c'est la réduction de la pulsativité de l'hormone LH qui serait responsable de l'atrophie

des follicules dominants des première et surtout deuxième vague de croissance folliculaire (Lucy et *al.*, 1992) (Drion et *al.*, 2000).

3.2. La folliculogénèse :

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement folliculaire ovarien, depuis le moment où il sort de la réserve jusqu'au moment de sa rupture à l'instant de l'ovulation ou à son involution. La croissance folliculaire se déroule en deux étapes. À une phase de croissance indépendante de l'action des gonadotrophines, pendant laquelle la croissance folliculaire est soumise à l'influence des gonadotrophines : hormone folliculostimulante (FSH), et hormone lutéinisante (LH). Le développement des follicules passe alors d'une croissance de type continu à une croissance de type cyclique (Ennuyer, 2000).

3.2.1. Phase non gonado-dépendante :

Le développement d'un follicule primordial (diamètre 30 microns) à un follicule tertiaire recruté pour être intégré à une vague folliculaire (diamètre 5mm) dure plus de six mois. Pendant cette période, les cellules de la thèque interne du follicule acquièrent des récepteurs à LH, et les cellules de la granulosa acquièrent de récepteurs à FSH. Elles deviennent capables de répondre à une stimulation gonadotrope et de synthétiser des œstrogènes (Ennuyer, 2000).

3.2.2. Phase gonado-dépendante :

Un follicule est recruté quand il est capable de répondre à la stimulation par les gonadotrophines. La GnRH, ou gonadolibérine, est le régulateur principal de la fonction reproductrice. Elle est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus et provoque la synthèse et la libération des gonadotrophines (FSH et LH) par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. Ces deux hormones sont produites dans les mêmes cellules. Elles sont stockées dans des granules sécrétoires à l'intérieur du cytoplasme. Le stockage de la FSH est faible et de courte durée : elle est libérée d'une façon régulière au cours du cycle, contrairement à la LH dont le stockage se prolonge pour être libérée en grande quantité durant la montée préovulatoire (Ennuyer, 2000).

3.2.3. Aspect morphologique de la croissance folliculaire :

La croissance folliculaire est caractérisée par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme. Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordial, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaires et de De Graff représentant les follicules antraux (Hulshof et *al.*, 1994).

- a- **Le follicule primordial** : Centré par l'ovocyte 1, est entouré de cellules folliculaires endothéliformes. Son diamètre moyen est de 40 μm . Habituellement localise en périphérie de l'ovaire. L'ovocyte est de diamètre compris entre 25-35 μm , se trouve bloquée au stade diplotéine de la prophase 1 par un polypeptide produit par la granuleuse des follicules primaire et secondaires : L'OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor)
- b- **Le follicule primaire** : À ce stade l'ovocyte ne commencera à prendre du volume qu'au moment où il y aura un nombre suffisant de cellule de granulosa, soit environ 40 cellules chez le bovin (Braw-Tal et Yossefi, 1997). C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise, et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse : la zone pellucide. Elle est constituée à 95 % de trois glycoprotéines organisées en logs filament interconnectés, appelées ZP₁, ZP₂, et ZP₃. La ZP₃ forme avec le ZP₂ des filaments qui sont pontés par la ZP₁. Seule la ZP₃ est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique (Yanagimachi, 1994).
- c- **Le follicule secondaire** : Les follicules primordiaux, primaires et secondaires constituent ensemble 95% de la population folliculaire. Les follicules secondaires montrent une activité de divisions mitotiques intensives qui se manifestent par plusieurs couches de cellules de granulosa cubique ainsi qu'un ovocyte plus volumineux variant entre 50 et 60 μm (Hyttel et *al.*, 1997 ; Russe, 1983). Chez le bovin, les follicules secondaires apparaissent vers le 210^{ème} jour de gestation.
- d- **Le follicule tertiaire (antral)** : 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 plasmasanguin et de produits sécrétés par les cellules folliculaires. Le stade tertiaire correspond à la phase de recrutement folliculaire. Chez la vache, le nombre de follicules antraux est de manière constante, compris entre 25 et 50. Il

dépend du nombre de follicules entrant en phase de croissance, du taux de croissance de ces follicules et du nombre de follicules qui s'atrophient (Armstrong, 1993). Chez le bovin c'est au 270^{ème} jour de gestation que les premiers follicules antraux apparaissent. Le follicule antral est composé de plusieurs couches de cellules de thèque, d'une membrane basale, d'un épithélium stratifié de cellules de la granulosa et d'un complexe ovocyte-cumulus (COCs).

- e- **Le follicule de De Graaf** : Représente la phase terminale du développement folliculaire. Cette phase ne concerne qu'un follicule sur mille qui entre en croissance (Saumande, 1991). Le follicule mûr se caractérise par une taille maximale de 25 mm chez la vache par un nombre maximale de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse. Gonflé de liquide, le follicule affleure en surface de l'ovaire. L'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé de la corona radiata et du cumulus oophorus. Les thèques interne et externe sont bien différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne. La thèque interne est une glande à part entière. La thèque externe est de nature fibreuse. Une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et de la membrane basale. Chez la vache, il faut 42 jours pour qu'un follicule de 0.13mm atteigne la taille préovulatoire. En effet, l'activité mitotique se réduit progressivement pour céder la place à une différenciation cellulaire plus importante.

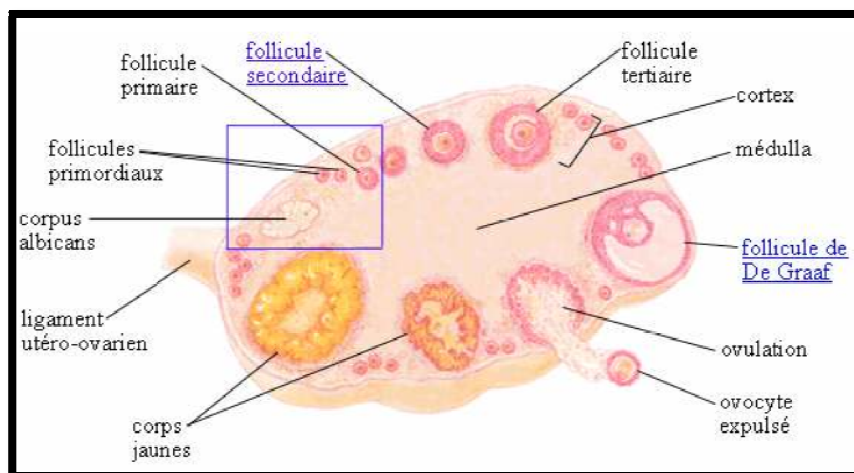


Figure 3 : Représentation schématique de l'ovaire (Gayrard ; 2007).

3.3. L'ovulation :

L'ovulation correspond à la rupture du ou des follicules permettant la libération d'un ovocyte fécondable. Le follicule dominant répond à l'élévation brutale et importante des concentrations plasmatiques en hormones gonadotropes observée au début du cycle œstral par la rupture et la libération d'un ovocyte fécondable.

Chez la vache, le taux de plus en plus élevé d'œstrogènes ovariens produits par les follicules mûrs qui exerce un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus et l'hypophyse, ce qui déclenche la production de GnRH et de LH.

Les décharges pulsatiles sont de plus en plus intenses et rapprochées :

- Le taux de FSH augmente progressivement ;
- Le taux de LH augmente brutalement et brièvement : sa pulsatilité devient très forte, cette décharge cyclique est appelée « le pic de LH »

Dans tous les cas, le pic de LH est suivi très rapidement d'une ovulation. C'est en effet, principalement l'action de la décharge de LH qui provoque la rupture des follicules préovulatoires. Le pic de LH est de ce fait fréquemment appelé « décharge ovulante » (Leborgne et *al.*, 2013).

C'est le taux de plus en plus élevé d'œstrogènes ovariens, produits par les follicules mûrs, qui exerce un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus et l'hypophyse, ce qui déclenche la production de GnRH et de LH. La progestérone est alors une hormone faible : elle n'est pas libérée dans la circulation sanguine, mais métabolisée en œstradiol et excrétée dans le sang (Leborgne et *al.*, 2013).

Toutes les substances inhibant la synthèse, l'excrétion ou l'action LH s'opposent donc à l'ovulation ; c'est le cas de la progestérone utilisée dans les traitements de maîtrise des cycles sexuels. Inversement, toutes les substances à action LH ou GnRH peuvent induire l'ovulation, c'est le cas de l'eCG (equin Chorionic Gonadotropin), complexe hormonal extrait du sérum de jument gestante, à action FSH et LH. De même la GnRH obtenue par synthèse peut être utilisée en médecine vétérinaire (Leborgne et *al.*, 2013).

L'ovulation a lieu 6 à 14 h après la fin de l'œstrus et est suivie par la formation du corps jaune et l'installation d'un état prégravidique de l'utérus, correspondant à la période d'installation de la fonction lutéale (Derivaux et *al.*, 1986).

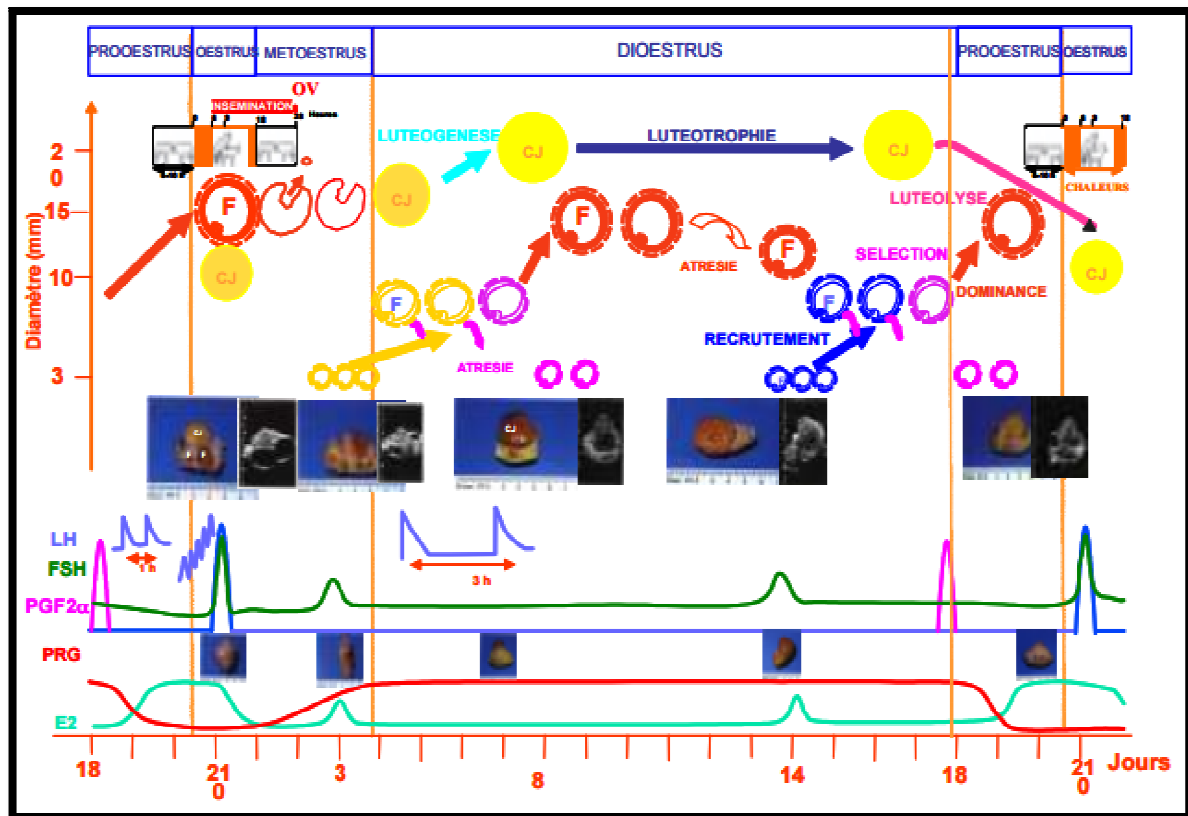


Figure 4 : Événements cellulaires, endocriniens et comportementaux du cycle œstral de la vache (Gayrard, 2007).

4. Conclusion

Les mécanismes hormonaux du cycle sexuel sont complexes ; les hormones concernées sont d'origine ovarienne et hypophysaire, sous le contrôle de l'hypothalamus.

Au cours de la phase lutéale, le taux d'œstrogènes est faible, et le taux élevé de progestérone maintient l'appareil génital au repos. Pendant la phase folliculaire, le taux de progestérone chute brutalement alors que les œstrogènes sont produits en quantité croissante jusqu'au déclenchement des chaleurs.

Les hormones hypophysaires gonadotropes, FSH et LH, sont produites en quantité constante pendant la plus grande partie du cycle. Une décharge simultanée de FSH et LH au moment des chaleurs permet l'achèvement de la croissance folliculaire ; le pic bref et brutal de LH provoque l'ovulation.

La connaissance de ces mécanismes de régulation permet l'utilisation de traitements adaptés pour une meilleure maîtrise de la reproduction.

1. Introduction

Les biotechnologies de la reproduction basées sur l'utilisation d'embryons bovins ont été développées à partir des années 70. La technique de transfert embryonnaire augmentant le nombre de produits des femelles d'élite par superovulation puis transfert à l'état frais des embryons chez des receveuses a été vite utilisée dans les programmes de sélection en substitution de l'IA pour produire les futurs reproducteurs (Ponsart *et al.*, 2004).

La production d'embryons est une technique de reproduction assistée fréquemment utilisée dans l'élevage de bovins laitiers et de boucherie sur des animaux possédant une conformation et un rendement supérieurs à leurs congénères. À sa source, on retrouve un traitement de superovulation qu'on administre à un animal de génétique jugée désirable et qui permettra d'engendrer de nombreux embryons de cette bête de valeur. Puis, ces embryons pourront être implantés dans des vaches ou génisses receveuses qui porteront la gestation et amèneront la progéniture à terme à la place de la mère naturelle. Puisqu'un tel traitement de superovulation ainsi que les manipulations qui s'en suivent (telles que la récolte des embryons et leur transfert dans des mères porteuses) s'avèrent onéreux pour l'éleveur, il est important de maximiser le rendement obtenu en embryons suite à cette procédure. Malheureusement, les rendements en embryons lors d'une récolte suite à un traitement de superovulation tendent à stagner depuis la démocratisation de cette technique de reproduction assistée, malgré les efforts en recherche afin d'augmenter ces rendements (Hasler, 2006). Les avancées techniques dans les protocoles de superovulation ont ainsi principalement permis d'en simplifier l'utilisation grâce au contrôle de l'émergence de la vague folliculaire et de l'insémination à temps fixe (Bo *et al.*, 2010 ; Mapletoft & Bó, 2011) sans pour autant augmenter le nombre d'embryons récoltés. La disparité des rendements d'un animal à l'autre suite à un traitement de superovulation est toujours omniprésente avec des nombres très variables d'embryons produits (Monniaux *et al.*, 2010).

Dans l'espèce bovine, le transfert embryonnaire est un outil de choix pour l'accélération du progrès génétique et sa diffusion nationale et internationale. Il participe aussi à la préservation des ressources génétiques existantes grâce au stockage des embryons dans des cryobanques. Actuellement, plus de 98 % des embryons transférables sont produits *in vivo* dans le cadre des programmes *multiple ovulation and embryo transfer* (MOET), les

autres résultant d'une production *in vitro* par *Ovum pick-up associated with In vitro embryo production* (OPU-IVP). La production d'embryons en grand nombre repose sur l'administration d'un traitement de stimulation ovarienne (ou superovulation) par *Follicle stimulating hormone* (FSH) à des femelles donneuses. Environ 500 000 embryons sont ainsi produits annuellement dans le monde et plus de 90 % des futurs taureaux reproducteurs soumis au testage sur descendance pour les schémas de sélection génétique sont issus de transfert embryonnaire (Monniaux et *al.*, 2010).

2. Définition de la superovulation

La superovulation est la première étape du processus de production d'embryons. C'est un traitement à base d'hormones gonadotropes exogènes capables de stimuler la croissance, la maturation, et l'ovulation de nombreux follicules (Briant et *al.*, 2007).

3. L'objectif des traitements de superovulation

L'objectif des traitements de superovulation est d'augmenter, dans des conditions contrôlées, le taux naturel d'ovulations. Ceci est afin de produire, au cours d'un même cycle, après fécondation *in vivo*, plusieurs embryons, qui seront ensuite collectés à J7 après fécondation. Ces traitements pourraient apporter un bénéfice évident pour l'élevage. En effet, même s'ils ne sont susceptibles d'intéresser qu'un nombre limité de femelles, ces traitements permettraient d'augmenter le nombre de veaux de haute valeur génétique. Ces veaux seront alors issus de vaches qui mènent de front une carrière productive et reproductrice, ou de vaches âgées dont les produits ont déjà montré des aptitudes particulières (Briant et *al.*, 2007).

4. Critères de choix des donneuses

Quelques conditions préalables sont requises avant de préparer une vache à la superovulation. Les vaches ou génisses donneuses et receveuses devront être en bonne santé, sans problèmes particulier de reproduction et présenter un appareil génital propre. (www.escouflairepol.fr)

Les vaches donneuses doivent officiellement appartenir à un cheptel indemne de maladies réputées contagieuses comme la tuberculose, la brucellose, la leucose bovine enzootique et aucun cas clinique d'IBR / IPV ne doit être constaté depuis au moins un an. La donneuse doit obligatoirement avoir un numéro de groupe sanguin.

En théorie, les animaux des dernières générations sont à privilégier car ils présentent un potentiel génétique supérieur aux animaux plus âgés. Les génisses peuvent ainsi être collectées une fois qu'elles sont bien cyclées, vers l'âge d'un an au minimum (www.escouflairepol.fr).

Dans la mesure du possible, mieux vaut éviter les stress, il est donc préférable de ne pas vacciner, transporter ou de faire des transitions alimentaires un mois avant le début des premières injections d'hormones et jusqu'à la confirmation de la gestation pour les porteuses.

Les donneuses peuvent être inséminées deux fois, environ 12 puis 24 heures après le début des premières chaleurs, afin de tenir compte de l'étalement du moment de l'ovulation. Pour reprendre son cycle normal, la donneuse devra recevoir une injection de prostaglandine après la collecte et pourra être de nouveau fécondée dès son premier retour en chaleur, ou bien être de nouveau collectée environ cinq semaines après la première collecte (www.escouflairepol.fr - Charolais Embryons)

5. Evolution des résultats de superovulation

Pendant plusieurs années, les résultats de transfert embryonnaire obtenus après traitement de superovulation ont stagnés. Une amélioration importante est observée dans les années 80, elle résulte principalement de la mise au point de protocoles de superovulation plus performants que ceux utilisés auparavant, utilisant des préparations de FSH à la place de traitements de PMSG et préconisant l'administration biquotidienne de FSH à doses décroissantes (Chupin et Procureur, 1982). De plus, les préparations à base de FSH d'origine porcine et/ou ovine étaient devenues plus pures et présentaient un rapport FSH/LH plus stable (Nibart et Humblot, 1997). La mise en place à ce moment d'une réglementation assurant un meilleur niveau sanitaire des donneuses a certainement contribué à améliorer les résultats (Ponsart et *al.*, 2004).

L'augmentation du nombre moyen d'embryons viables par collecte observée depuis 1995 pourrait être expliquée par une meilleure préparation des donneuses prenant en compte la dynamique de croissance folliculaire (Guilbault et al., 1997 ; Ede et al., 1999), l'utilisation de nouveaux traitements, comme par exemple la mise en place d'un implant progestatif pendant 5 jours lors de la superovulation (Govignon et al., 2000) et enfin une meilleure maîtrise des facteurs d'environnement dans l'élevage, en particulier de l'alimentation. Plusieurs travaux ont en effet montré les effets défavorables d'une suralimentation sur la réponse des donneuses (Negrao et al., 1997) (Ponsart et *al.*, 2004).

En dépit des progrès enregistrés, l'absence de réponse ou une réponse faible au traitement de superovulation restent fréquents. Ceci limite toujours l'application de cette technique à des fins commerciales, rend difficile l'exploitation de certaines souches de femelles et engendre des surcoûts dans la conduite des schémas de sélection.

Globalement, l'origine paternelle des donneuses d'embryons est une source de variation pour toutes les variables de la réponse au traitement de superovulation. Les moyennes de production (nombre d'embryons totaux ou de transférables) peuvent varier du simple au triple en fonction de l'origine paternelle (Manciaux et *al.*, 1999 ; Govignon et *al.*, 2000) (Ponsart et *al.*, 2004).

6. Suppression de la sélection et de la dominance : induction de la superovulation

La FSH induit le recrutement, la présence d'un niveau basal de LH est indispensable.

La croissance des follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production folliculaire d'œstradiol et d'inhibine.

La sélection est obtenue lorsque les concentrations plasmatiques en FSH atteignent des valeurs inférieures à celles capables d'induire le recrutement. En effet, la sélection peut être bloquée par l'injection de petites doses de FSH. Ce traitement conduit ainsi à une polyovulation.

Le but des traitements de superovulation est d'augmenter le nombre de follicules préovulatoires en augmentant le recrutement et en supprimant la sélection et la dominance (Gayrard V, 2007).

L'administration en début de phase folliculaire d'hormones gonadotropes (PMSG ou FSH partiellement purifiée) provoque une superovulation. Il est ainsi possible d'observer des taux moyens d'ovulation de 20 chez la vache. L'apport de gonadotropines exogènes permet donc de déborder les mécanismes de contrôle naturels de taux d'ovulation par :

- Une diminution de la taille des follicules au recrutement (1,5 mm chez la vache) ;
- Une réduction de l'atrésie des follicules lors de la sélection (mais les follicules déjà atteints par l'atrésie au début du traitement ne sont pas sauvegardés) ;
- Une diminution de la taille des follicules lors de l'ovulation (Thibault et Levasseur, 2001).

Les schémas suivants expliquent l'usage de la FSH à doses décroissantes dans les traitements de superovulation :

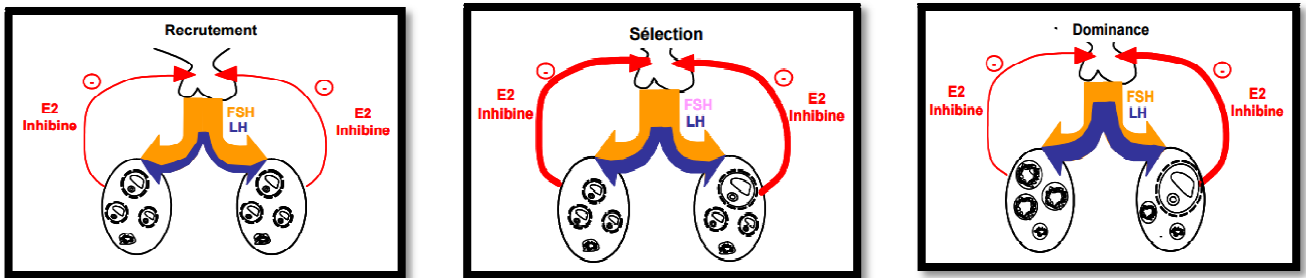


Figure 5 : Sécrétion des hormones gonadotropes (LH, FSH) et des facteurs de rétrocontrôle (œstradiol et inhibine) au cours des phases de recrutement, sélection et dominance (Gayraud , 2007).

7. Traitements classiques de superovulation

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

En France, le traitement utilisé dans la quasi-totalité des superovulations est basé sur l'utilisation de FSH-p (FSH d'origine porcine) répartie en 8 injections en doses décroissantes à 12 heures d'intervalle. Une injection de cloprosténol (PGF2 α) (0,5 à 1 mg par voie intramusculaire) est réalisée à la 5ème injection de FSH-p.

En dépit des améliorations obtenues grâce à l'utilisation systématique de préparation de FSH purifiées (augmentation du nombre d'embryons produits et diminution de la variabilité des réponses) au lieu de PMSG, la variabilité de la réponse au traitement de superovulation reste le facteur le plus limitant des programmes de superovulation (Humblot et *al.*, 1994).

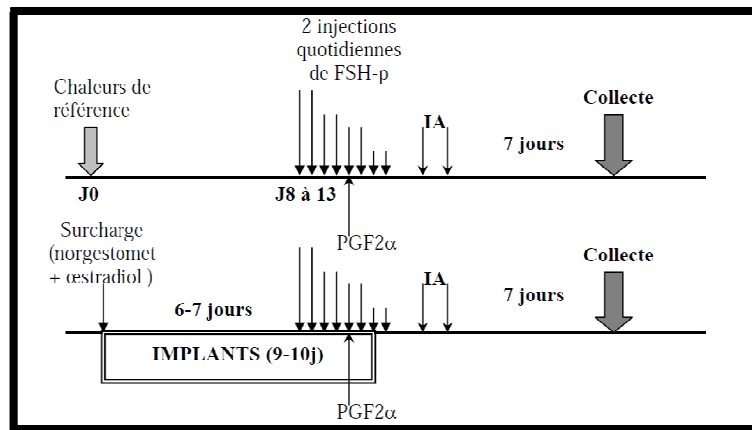


Figure 6 : Schéma de traitement de superovulation par FSH-p (en phase lutéale d'un cyclenaturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes) (d'après Nibart, 1991).

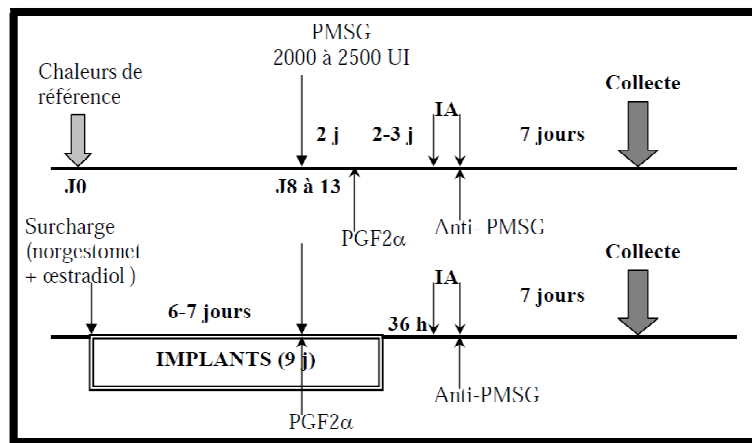


Figure 7 : Schéma de traitement de superovulation par PMSG (en phase lutéale d'un cycle naturel ou au cours d'un cycle maîtrisé par des implants de progestagènes) (d'après Nibart, 1991).

8. Traitement de superovulation utilisant une seule injection de FSH

Une étude préliminaire menée par **Paulo D. Carvalho et al.** en 2014, sur l'usage d'une seule injection de FSH bovine recombinante à longue action (*long-acting recombinant bovin FSH -LARbFSH-*), pour superovuler des vaches Holstein, a été effectuée sur 56 génisses de la même race, âgées entre 12 et 15 mois, dans le but de comparer les résultats d'un traitement de superovulation avec une seule injection de FSH bovine recombinante (rbFSH type A et B) et un traitement avec la Folltropin (FSH extraite de l'hypophyse de porc).

Sans choisir une période précise du cycle, les praticiens ont commencés d'abord par extraire tous les follicules de taille ≥ 5 mm par ponction écho-guidée avec la technique de

Bergfelt et al., 1994. Ils ont ensuite séparé au hasard les génisses en 4 groupes (n=14 par traitement).

Environ 36 heures après l'ablation des follicules, des dispositifs intravaginaux à P4 ont été déposés, puis les traitements de superovulation ont commencé.

- Les génisses du groupe 1 ont reçu une dose totale de 300 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V) séparée en huit injections IM à dose décroissante (3.0, 3.0, 2.0, 2.0, 1.5, 1.5, 1.0, et 1.0 mL) à 12H d'intervalle, soit 2 injections par jour pendant 4 jours.
- Les génisses du groupe 2 (A50-LArbFSH) ont reçue de 50 mg de LArbFSH (type A) en une seule injection IM.
- Les génisses du groupe 3 (A100-LArbFSH) ont reçue 100 mg de LArbFSH (type A) en une seule injection IM.
- Les génisses du groupe 4 (B50-LArbFSH) ont reçue 50 mg de LArbFSH (type B) en une seule injection IM.

48 et 72 heures après dépôt des éponges intravaginales, toutes les génisses ont été injectées 2 fois par la PGF2 α (en concomitance avec la 5^{ème} et 7^{ème} injection du groupe 1).

Le retrait des éponges a eu lieu 84 H après le dépôt (en concomitance avec la dernière injection du groupe 1). 24 H après, l'ovulation a été provoquée en utilisant 2500 UI de hCG (human chorionic gonadotropin) en IM, et les génisses ont été inséminées 2 fois après 12 et 24 H.

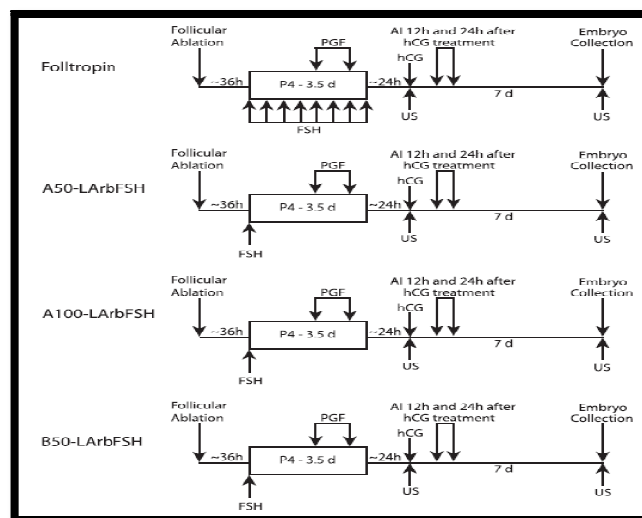


Figure 8 : Représentation schématique des protocoles suivis par Paulo D. Carvalho et al., 2014.

A J7 après le traitement par l'hCG, les ovocytes et embryons ont été récoltés par la technique (non-chirurgicale) du lavage de l'utérus en utilisant 1.5 L de milieu de récolte. Le

cathéter de lavage est passé par le col, et le ballonnet, qui se trouve à son extrémité crâniale, est gonflé avec de l'air en étant dans le corps utérin, pour permettre le lavage du corps et des deux cornes utérines en même temps. Le liquide récolté a été directement déversé dans un filtre à embryon, pour que les embryons soient observés, par la suite, sous une loupe binoculaire, et classés selon les normes de *The International Embryo Society*, en classant les embryons de classe 1, 2, et 3 comme viables, et ceux de 1 et 2 comme congelable.

L'hypothèse posée au début de l'étude par P.D. Carvalho et al. 2014 est que la réponse au traitement, ainsi que le nombre d'embryon de bonne qualité ; lors d'un traitement de superstimulation et superovulation en utilisant une seule injection de FSH bovine recombinante à longue action (LArbFSH) ; seraient similaire à ceux du traitement classique utilisant des extraits hypophysaires standards (FSH).

Les résultats de cette étude sont comme suit:

1. Les génisses du groupe 3 (A100-LArbFSH) et 4 (B50-LArbFSH) ont présentées la même réponse à la superstimulation et superovulation que celles du groupe 1 (Folltropin).
2. La proportion des génisses considérées comme superovulées était la même entre le groupe 1 et les groupes 3 et 4, et
3. Les génisses des groupes 3 et 4 ont produits un nombre d'embryons transférable similaire à celles du groupe 1.

Tableau 1 : Effet du traitement utilisé sur le % de génisses superovulées, % d'ovulation, le nombre de follicules, le nombre de CJ, le nombre d'ovocytes fécondés, d'embryons transférables et le % d'embryons transférables. (Carvalho et al., 2014).

	Folltropin	A50-LArbFSH	A100-LArbFSH	B50-LArbFSH
% génisses superovulées	100 (14)	28.6 (4)	85.7 (12)	92.9 (13)
% d'ovulation	76	38.7	88	80.8
Nombre de follicule (min-max)	25.7 (7-51)	5.9 (0-11)	16.6 (2-39)	18.9 (4-37)
Nombre de CJ (min-max)	19.1 (7-32)	2.6 (0-11)	15.9 (2-42)	16.1 (2-39)
Nombre d'ovocytes fécondés	8	2	6.4	9.5
Nombre d'embryons transférables	6.5	0.8	4.3	7.6
% d'embryons transférables	78	37.5	44.7	66.1

9. Technique de récolte 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) (Laizeau, 2003).

Les embryons sont collectés par voie cervicale. Une technique chirurgicale est possible mais n'est pas très utilisée (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) (Laizeau, 2003).

10. Classification des embryons récoltés :

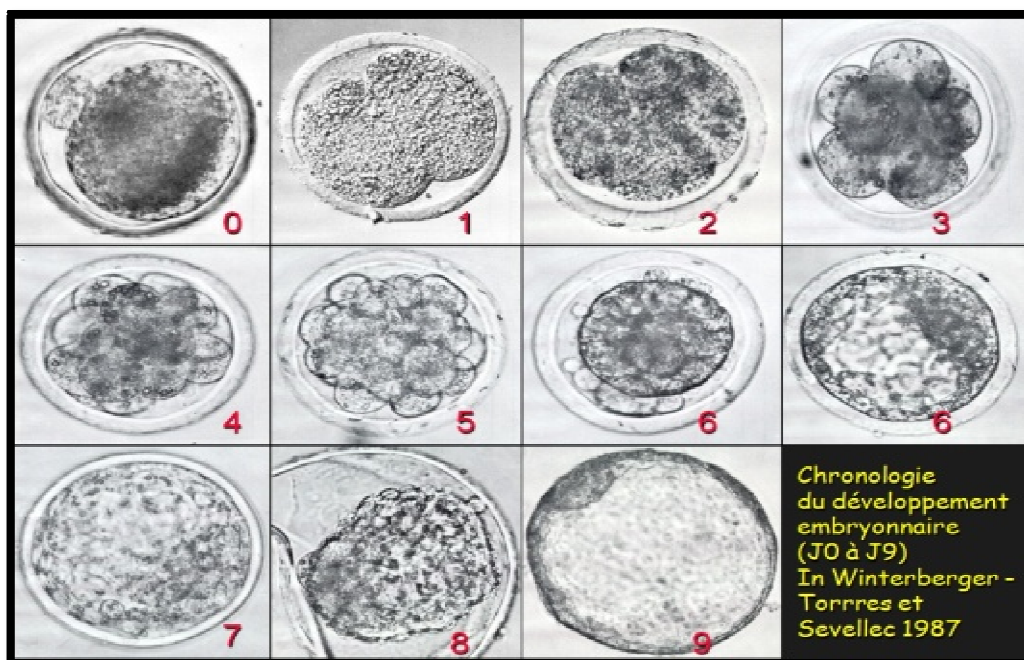


Figure 9 : différents stades du développement embryonnaire de J0 à J9 (Torres et Sevellec 1987 adaptée par Ch. HANZEN 2008)

J2 : Stade 4 blastomères

J3 : Stade 8 blastomères

J4 : Stade 16 blastomères

J5 : Stade 40 blastomères

J6₁ : Stade 80 blastomères

J6₂ : Stade jeune blastocyste (formation du blastocoele)

J7 : Stade blastocyste (Agrandissement du blastocoele, et poursuite de l'amincissement de la zone pellucide)

J8 : Stade blastocyste (Rupture de la pellucide)

J9 : Embryon : blastocyste libéré de sa pellucide (Début de migration de l'endoderme)

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

Classification	Qualité	Description
1	Excellent	-Embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable. - Blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact.
	Bon	-Embryon un peu en retard dedéveloppement par rapport à son jour decollecte, - ou embryon semblable àl'embryon excellent mais asymétrique, - ou exclusion de quelquesblastomères 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 cellules échappées dans l'espace périvitellin, des vésicules, des cellules dégénérées, blastomères de taille variable. - Aspect plus clair ou plus sombre que normal
3	Médiocre	- Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes, des vésicules grosses et nombreuses ; - Mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viab1e.
4	Mort ou dégénéré	- Arrêt de développement à un stade précoce. - Cellules dégénérées.

11. Paramètres métaboliques :

Dans une étude menée, sur 92 animaux (19 génisses, 65 vaches en lactation et 8 vaches tarées), par **Jean-Sébastien Laizeau** en 2003 sur les facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache laitière. Il a utilisé le protocole de superovulation classique à 8 injections IM biquotidiennes à doses décroissantes.

Il s'est intéressé aux paramètres métaboliques car il existe des différences significatives en fonction du statut physiologique de l'animal. Il a fait des prélèvements sanguins des vaches à différents moments.

- Prise de sang réalisée avant le traitement de superovulation
- Prise de sang réalisée le lendemain de la dernière injection de FSH
- Prise de sang réalisée le jour de la collecte.

Pour les génisses, les seules différences significatives qui ont pu être relevées entre les bonnes et les mauvaises productrices d'embryons/ovocytes non fécondés ou donneuses d'embryons transférables concernaient la concentration en urée et en β -hydroxy-butyrat le jour de la collecte qui étaient plus élevées chez les meilleures.

Pour les vaches en lactation, concernant la production d'embryons/ovocytes non fécondés, les meilleures avaient une concentration en triglycérides avant le traitement de superovulation plus faible, une concentration en insuline et en urée plus faibles, et une concentration en AGNE plus élevée le jour des chaleurs. De plus, les meilleures donneuses d'embryons transférables avaient des concentrations en urée plus faibles, quel que soit le moment du prélèvement. Elles avaient également une concentration en triglycérides avant traitement plus faible.

Pour les vaches tarées, seule la concentration en leptine le jour des chaleurs a été plus élevée pour les meilleures donneuses d'embryons transférables.

Le paramètre métabolique le plus intéressant à doser chez les génisses et les vaches en lactation est l'urée.

12. Relation entre BCS et production d'embryons

Jun-Kyu Son et al., ont étudié la relation entre le score corporel (BCS) et le nombre d'embryons transférables produits par des vaches laitières hautes productrices de races améliorées (Relationship between Estrous Expression Rate, BCS and Transferable Embryos in Holstein Donor Cows).

Ils ont pu constater que lorsque le BCS était ≤ 2.5 , le nombre total des ovocytes récoltés était de $7.3 + 1.9$, qui est bien plus bas que les nombres de $15.4 + 2.8$, et $15.4 + 2.1$ obtenues quand les BCS étaient respectivement de 2.75 et ≥ 3.0 . Le BCS est largement utilisé en tant que moyen d'évaluation, pas seulement du nombre d'ovocyte récoltés, mais aussi du statu nutritionnel des vaches, et il a été reporté que des scores bas influencerai la reproduction négativement (Markusfeld et al., 1997).

Le nombre d'embryons transférables était de $5.2 + 1.4$ quand le BCS était ≤ 2.5 , ce qui était aussi plus faible que les nombres $6.0 + 2.1$ et $8.5 + 1.8$ obtenues quand les BCS étaient respectivement de 2.75 et ≥ 3.0 , toutefois, la différence entre ces résultats est insignifiante.

Même si les résultats de cette étude montrent une différence insignifiante des nombres d'embryons transférables suivant le BCS, ils montrent cependant une différence importante du nombre d'embryons produits et récoltés.

Puisque la production d'embryons est affectée par le statut nutritionnel des femelles donneuses, avant et après le traitement de superovulation, il est important de faire un suivi régulier et rigoureux du score corporel, à l'œil nu, en conséquence de maintenir un bon statut nutritionnel. Pour ce faire, il serait intéressant de faire une bonne gestion d'élevage pour que le BCS ne baisse pas au-dessous de 2.5 .

Tableau 3 : effet du score corporel sur la production d'embryon

BCS	Nombre de vaches	Rendement d'embryons	
		Nombre total d'ovocytes	Nombre d'embryons transférables
≤ 2.5	7	$7.3 + 1.9$	$5.2 + 1.4$
2.75	7	$15.4 + 2.8$	$6.0 + 2.1$
≥ 3.0	8	$15.4 + 2.1$	$8.5 + 1.8$

1. Introduction

Depuis les premières études sur le traitement de superovulation et transfert embryonnaire, chercheurs et praticiens ont toujours recherché un protocole nécessitant le moins de manipulation et de stress pour les femelles donneuses, sans pour autant compromettre la qualité des embryons récoltés. Le développement de protocoles hormonaux synchronisés qui permettent une IA programmée a eu un impacte considérable sur les résultats des programmes de production d'embryons, et a facilité la gestion des donneuses (Bo et *al.*, 2008). De plus, des stratégies permettant la réussite de la superovulation en baissant la fréquence des traitements peut réduire la manipulation des donneuses de 75 %, et donc réduire le cout par embryon produit (Looney et *al.*, 2012). Plusieurs études se sont basées sur la baisse du nombre d'injections de FSH nécessaires pour un traitement de superovulation de donneuses d'embryons, leurs résultats étaient intéressants et très variés, certaines sont arrivées à une injection sous-cutanée de FSH par jour (Walsh et *al.*, 1993), ou une injection sous-cutanée de FSH diluée dans un gel gélatineux salin (Looney et *al.*, 1981), ou encore une seule injection IM de FSH diluée dans du polyvinylpyrrolidone (Yamamoto et *al.*, 1994), dans du hyaluronan ou dans un gel hydroxide (Kimura et *al.*, 2007).

Dans le même contexte, notre objectif dans ce projet est d'essayer de diminuer la manipulation des donneuses, dans le but d'éviter de les stresser davantage. Pour ce faire, nous avons suivis deux protocoles différents en utilisant les mêmes extraits hypophysaires, le premier classique à 8 injections intramusculaires biquotidiennes à doses décroissantes, et l'autre simplifié à 3 injections intramusculaires quotidiennes.

2. Matériels

2.1. Elevage

Etable :

L'élevage de vaches laitières hautes productrices, appartenant au centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique, est situé au sud de la wilaya d'Alger, plus exactement à Baba-Aali, Birtouta.

Les étables sont en dur et bien aérées confortables pour un élevage laitier (Figure 10.1 : les étables vues du ciel – Google Maps / Figure 10.2 : l'étable vue de l'intérieur).



Figure 10.1 : les étables vues du ciel – Google Maps

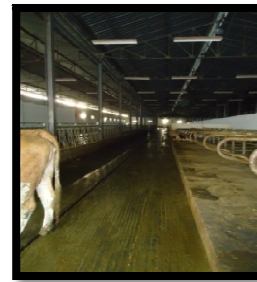


Figure 10.2 : l'étable des vaches laitières

Vaches :

90 vaches de 3 grandes races améliorées (Montbéliarde, Holstein et Fleckvieh) ont été importées de France par le CNIAAG.

Nous n'utiliserons dans notre étude que 5 donneuses choisies parmi ces vaches. Elles sont primipares, de deux races : Normande (Figure 11.1) et Fleckvieh (figure 11.2), d'un BCS variant entre 2.75 et 3.



Figure 11.1 : Donneuse Normande



Figure 11.2 : Donneuse Fleckvieh

2.2. Hormones et milieux

a- **FSH** :

Nous avons utilisé pour les deux protocoles 1 et 2 (Cf : méthode), de la pFSH STIMUFOL 20% ; REPROBIOL (SPRL) (lyophilisat injectable de follitropine porcine et de lutropine porcine) contenant un flacon de lyophilisat et un flacon de 10 ml de solvant.

Lyophilisat et solvant pour solution injectable : Lyophilisat

Follitropine (pFSH) 500 µg

Lutropine (pLH) 100 µg

Solvant

Parahydroxybenzoate de méthyle (E218) 10000µg

Parahydroxybenzoate de propyle (E216) 2500µg

Excipient QSP 1 flacon de 10 ml

b- **Prostaglandine (PGF₂α)** :

Prostaglandine Enzaprost T, CEVA Santé Animal. Solution injectable Dinoprost (5mg).

Flacon de 30 ml.

c- **PRID** :

PRID Delta est un dispositif intravaginal imprégné de progestérone utilisé pour la maîtrise de la fertilité des bovins. Une fois appliqué, PRID® DELTA ; produit par CEVA ; procure une libération contrôlée des 1.55 g de progestérone naturelle en garantissant le confort et l'absence d'efforts pour plus de résultats.

d- **PBS (Phosphate Buffered Saline)** :

IMV EUROFLUSH: Milieu de collecte pour embryons.

Milieu de protection des embryons avec détecteur de pH changeant de couleur lors de chaque changement de pH et une formule unique d'antibiotiques – contient de la BSA – 1 litre.

2.3. Matériels de l'IA et de récolte

2.3.1. Matériels d'IA

a- Containers d'azote :

Pour la préservation de la viabilité des spermatozoïdes, les paillettes de semence sont congelées en passant par plusieurs étapes, la dernière étant de les plonger dans de l'azote liquide à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour le transport, et après le choix de la paillette à utiliser, cette dernière est mise dans des containers contenant de l'azote liquide à la même température de congélation (Annexe 2).

b- Thermos :

Un thermos contenant de l'eau chauffée à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, doit la maintenir à cette température pour décongeler les paillettes (Annexe 2).

c- MiniCutter :

Utilisé pour découper la paillette de semence avant l'insémination (Figure 12).



Figure 12 : Minicutter

d- Paillette de semence :

Les paillettes contiennent 0.25 ml de semence de taureau sélectionné (Figure 13).

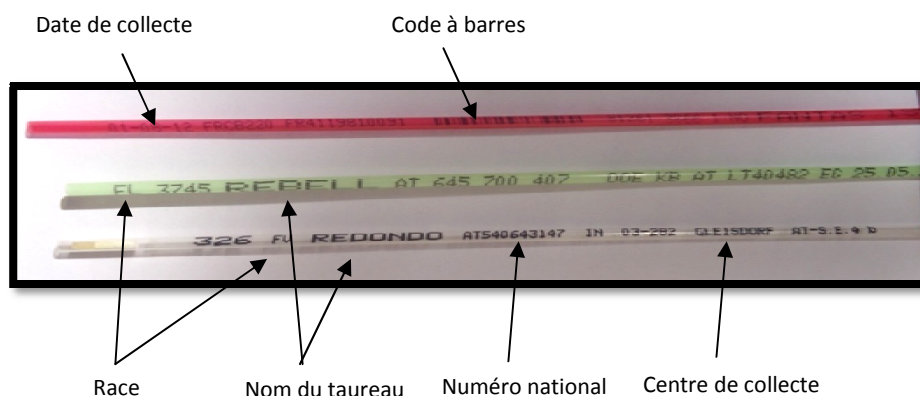


Figure13 : Paillettes de semence

e- Pistolet d'insémination :

Mandrin en métal 54 cm , et gaine de protection sanitaire (changé à chaque vache), pour insémination artificielle intra-utérine profonde.

f- Gants et gel lubrifiant :

Gants gynécologiques de fouille rectale, et gel lubrifiant pour faciliter la pénétration du bras au niveau du rectum, et éviter de léser la muqueuse rectale.

2.3.2. Matériels de récolte

a- Laboratoire ambulante :

Le laboratoire ambulante du CNIAAG est un camion, bien équipé dans sa benne avec une paille, une loupe binoculaire, un réfrigérateur, une plaque chauffante, un bain marie, des containers d'azote, des tiroirs pour le rangement du matériel, et pleines d'autres commodités nécessaires pour l'IA et le Transfert d'embryon (Annexes 4.1 et 4.2).

b- Echographe :

Echographe DRAMINSKI iScan Ultrasound scanner (Figure: 14).

Utilisé pour le suivi de la cyclicité et pour vérifier la réponse ovarienne au traitement de superovulation avant la récolte.



Figure 14 : Echographe

c- Sonde de récolte :

Sonde à 2 voies Woerlein CH 18 non stérile – réutilisable 30'' / 75 cm, pour récolte d'embryons, une voie d'entrée du milieu de collecte et une voie pour gonfler le ballonnet, avec mandrin (Figure 15).

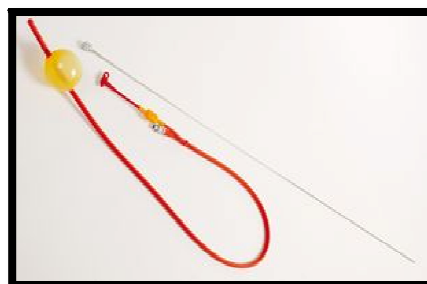


Figure 15 : Sonde de récolte à 2 voies avec mandrin

d- Dilatateur cervical :

D'une longueur de 60 cm, possédant une extrémité conique de 4mm au sommet et de 7mm à la base, il permet de préparer le cas échéant le col à la pénétration de la sonde de récolte (généralement utilisée chez les génisses).

e- Flacons de récolte :

Flacons de 1 litre, pour y mettre le liquide de récolte contenant les embryons.

f- Microscope optique inversé :

Microscope inversé Hund (Helmut Hund GmbH, Germany) (Figure 16).

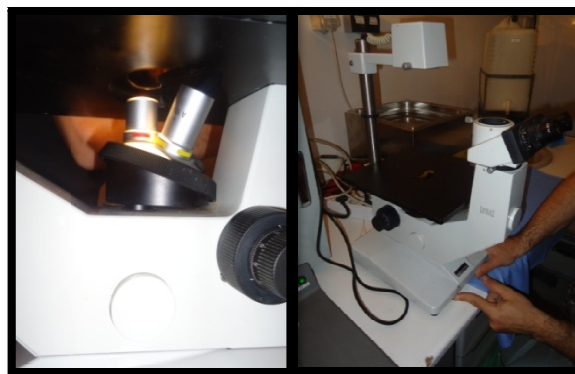


Figure 16 : Microscope inversé

g- Anesthésique :

Lydocaïne 2%, (Xylocaïne ND), 5cc.

h- Bain marie :

Contient de l'eau à 37°C pour chauffer le PBS et les flacons de récolte avant la récolte.

i- Plaque chauffante :

Pour maintenir le liquide de récolte à 37°.

j- Seringues :

Seringues de 50 ml, pour l'injection et collecte du liquide de récolte PBS. Seringue de 20 ml pour l'injection d'air dans le ballonnet. Seringue de 2.5ml pour l'injection de la xylocaïne.

k- Boîtes de pétri :

Pour l'observation des embryons sous microscope optique inversé, boîtes de pétri rondes de 60 mm de diamètre (quadrillées) et des boîtes rondes de 35 mm de diamètre.

3. Méthode

Sur un plan pratique, il est essentiel chez la vache de pouvoir apprécier le niveau d'activité ovarienne avant l'administration d'un traitement de stimulation par FSH ; car la finalité de l'administration d'un traitement de stimulation ovarienne dans l'espèce bovine est d'améliorer le rendement des programmes de MOET (Multy Ovulation and Embryo Transfert) (Monniaux D., 2010).

3.1. Suivi de la cyclicité

Objectif : Sélection des donneuses.

Pour pouvoir choisir les vaches élites du total (90) importées par le CNIAAG, nous avons effectué un suivi rigoureux de leurs cyclicités.

Nous avons fait une première inspection, suivie de trois visites/examens espacés de 11 jours, car selon **BAJEMA (1982)**, au cours du post partum, les vaches peuvent avoir des cycles courts et d'autres longs. Le programme est comme suit :

- Faire d'abord une visite pour inspecter l'état des lieux.
- Objectif visite 1 : 06-01-2016 :
 - ✓ Contrôler l'involution utérine des vaches (> 30 jours post partum).
 - ✓ Contrôler la reprise de l'activité ovarienne (fouillet rectal + échographie).
 - ✓ Note du BCS.
- Objectif visite 2 : 17-01-2016 :
 - ✓ Contrôler la cyclicité ovarienne.
 - ✓ Contrôler l'involution utérine des vaches non concernées par le premier examen (< 30jours post partum à la visite 1).
 - ✓ Vérifier l'emplacement anatomique de la matrice (choix qui faciliterait la récolte d'embryon) (fouillet rectal).
 - ✓ Note du BCS.
- Objectif visite 3 : 27-01-2016 :
 - ✓ S'assurer de la cyclicité des vaches.
 - ✓ Diagnostic des endométrites cliniques (Speculum).
 - ✓ Note du BCS.

Pour affiner la sélection, nous avons fait des prélèvements sanguins, qui n'ont concernés que le lot de production d'embryon dans le but de faire un bilan des paramètres

biochimiques : AGNE, β -HB, Glycémie, et Urémie (réalisé par une équipe travaillant en parallèle sur un autre projet de fin d'étude).

Après la sélection, les éleveurs ont observé et noté les chaleurs pendant trois cycles.

D'après l'ordre chronologique d'apparition des chaleurs, nous avons commencé les protocoles.

Dans cette étude, nous travaillerons sur 5 vaches.

3.2. Traitement de superovulation et récolte

3.2.1. Traitement de superovulation

Nous avons suivi deux protocoles :

- Protocole 1 : à 8 injections : les vaches sont traitées avec une solution de 500 μ g de pFSH diluée dans 10 ml de solvant, pendant 4 jours, par des injections biquotidiennes espacées de 12 heures, à doses décroissantes (de 2.5 ml à 0.5 ml).
 1. Sur chaleurs naturelles.
 2. Sur chaleurs induites : avec progestagène.
- Protocole 2 : à 3 injections : les vaches sont traitées avec une solution de 500 μ g de pFSH diluée dans 9 ml de solvant, pendant 3 jours, par des injections quotidiennes espacées de 24 heures, à doses constantes (3ml).
 1. Sur chaleurs naturelles.
 2. Sur chaleurs induites : avec progestagène.

L'IA a été faite systématique en concordance avec la 5^{ème} injection du protocole 1, et avec la 3^{ème} du protocole 2.

Nous avons procédé aux injections suivant le programme dans les tableaux/diagrammes suivants :

Tableau 4 : Vache 1 Fleckvieh : 5360 : protocole 1.1 :	
Jours	Traitements
J1	FSH (2 ml) matin et soir
J2	FSH (1,5ml) matin et soir
J3	FSH (1 ml) matin et soir + Prostaglandine (3ml)le matin
J4	FSH (0,5ml) matin et soir
J5	IA matin et soir
J12	Récolte

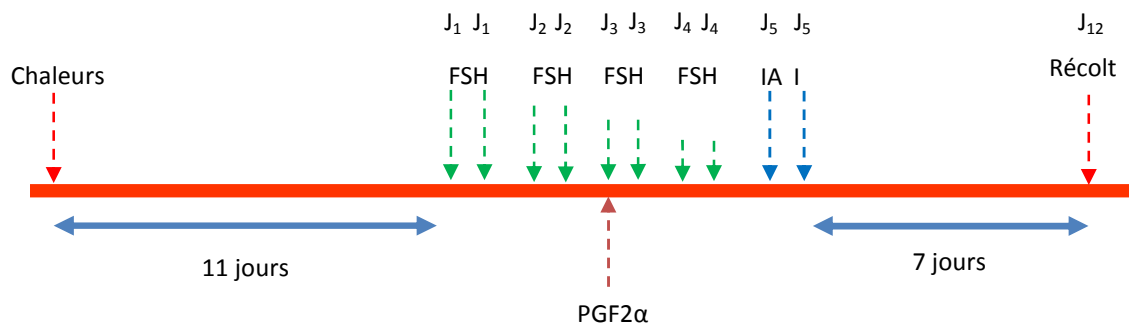


Figure 17 : Diagramme de superovulation du protocole 1.1.

Tableau 5 : Vache 2Fleckvieh : 6325: protocole 1.2 :	
Jours	Traitements
J0	Mise en place du PRID
J7	FSH (2 ml) matin et soir.
J8	FSH (1.5 ml) matin et soir.
J9	FSH (1 ml) + Prostaglandine (3ml)+ Retrait du PRID le matin + (1 ml) soir.
J10	FSH (0.5 ml) matin et soir.
J11	IA matin et soir
J18	Récolte

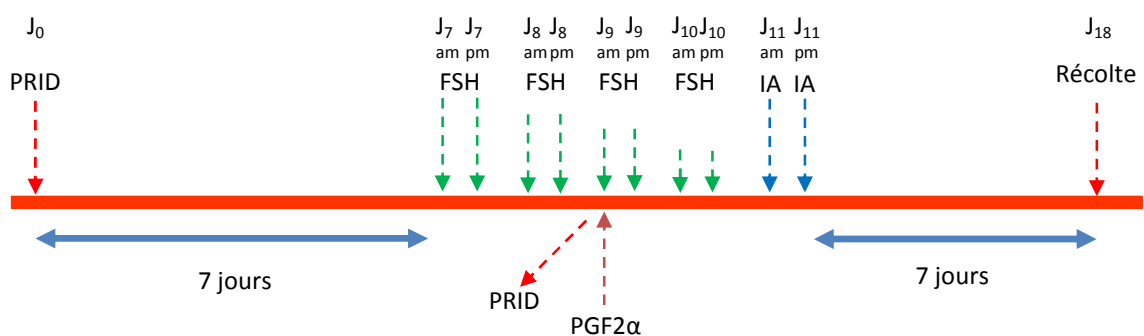


Figure 18 : Diagramme de superovulation du protocole 1.2.

Tableau 6 : Vache 3 Fleckvieh : 4248: protocole 2.1. :	
Jours	Traitements
J1	FSH (3 ml) le matin
J2	FSH (3 ml) le matin
J3	FSH (3 ml) + Prostaglandine (3ml) le matin
J5	IA matin et soir
J12	Récolte

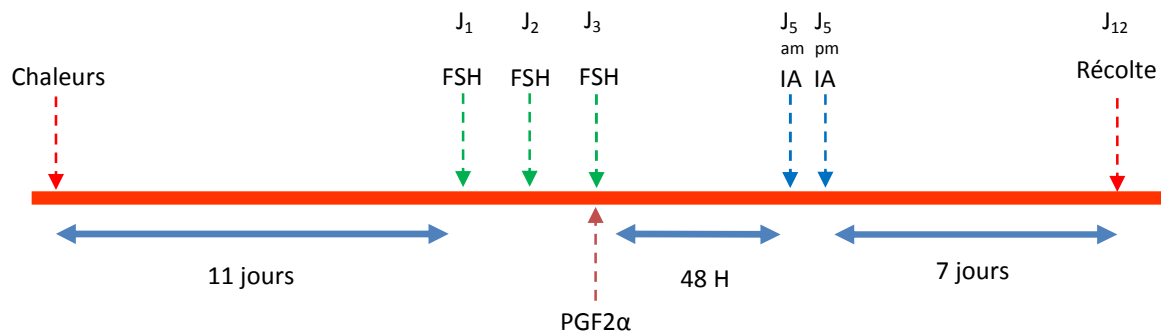


Figure 19 : Diagramme de superovulation du protocole 2.1.

Tableau 7 : Vache 4 Normande: 0455 : protocole 2.1:	
Jours	Traitements
J 1	FSH (3 ml) le matin
J2	FSH (3 ml) le matin
J3	FSH (3 ml) + Prostaglandine (3ml) le matin
J5	IA matin et soir
J12	Récolte

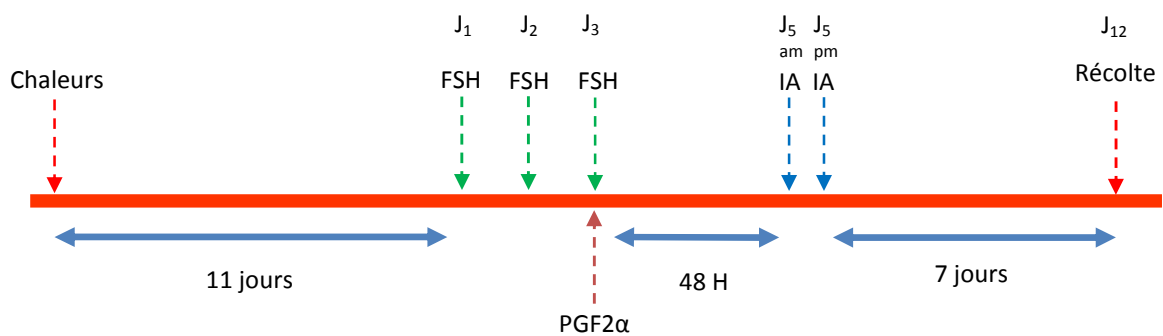


Figure 20 : Diagramme de superovulation du protocole 2.1.

Tableau 8 : Vache 5 Normande : 2132 : protocole 2-2 :	
Jours	Traitements
J0	Mise en place du PRID
J7	FSH (3 ml) le matin
J8	FSH (3 ml) le matin
J9	FSH (3 ml) + Prostaglandine (3ml) + Retrait du PRID le matin
J11	IA matin et soir
J18	Récolte

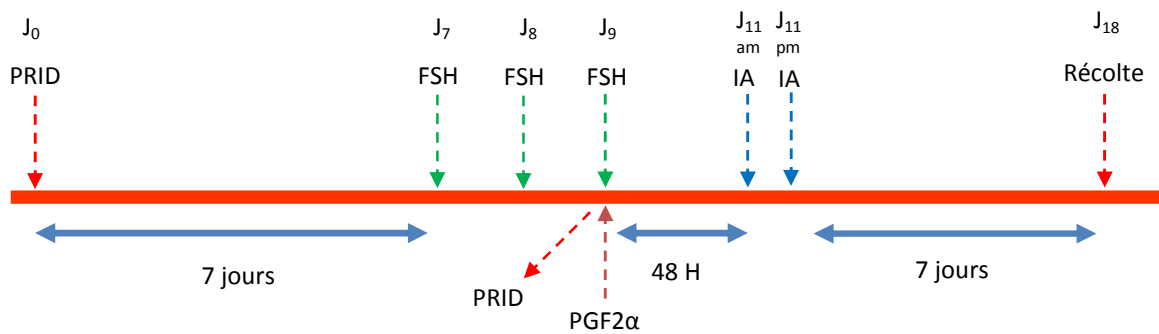


Figure 21 : Diagramme de superovulation du protocole 2.2.

3.2.2. Récolte

Avant de commencer la récolte, nous avons effectué une palpation transrectale pour apprécier la réponse ovarienne au traitement. Le résultat était à chaque fois confirmé par échographie (Figures 29).

La récolte s'est effectuée suivant la méthode non chirurgicale (transcervicale):

- Contention de la vache.
- Epidurale basse (Figure 22).
- Fixation de la queue vers l'avant.
- Nettoyage et désinfection de la zone périnéale avec une solution antiseptique (Annexe 5).
- Introduction de la sonde avec le mandrin entre les lèvres vulvaires à un angle de 45° dans un premier temps (éviter le méat urinaire), redressement et pénétration à col fermé (Figure 23).
- Introduction dans la corne utérine droite.
- Positionnement du ballonnet à ± 4 cm en avant de la bifurcation utérine.
- Fixation de la sonde par gonflement du ballonnet avec 15 ml d'air (Annexe 6).
- Retrait du mandrin.
- Rinçage : Injection de 250 ml de PBS / corne (progressivement : 2x20ml + 2x30ml + 2x40ml + 1x50ml + 50 ml (20 ml PBS + 30ml air) (car l'injection d'une aussi grande quantité à la fois peut causer une rupture des vaisseaux sanguins) (Figure 24).
- Récupération de la même quantité de PBS, contenant les structures collectées, par la même voie (Figure 25).
- Verser le liquide collecté dans les flacons de récolte, préalablement nettoyés au PBS et chauffés au bain marie à 37°C (1 flacon par corne).
- Dégonflement du ballonnet, remplacement du mandrin, sortie de la corne et introduction dans l'autre corne.
- Rinçage de la corne gauche (reprendre les étapes de la corne droite).
- Retrait du flexible (la sonde).
- Instillation d'antibiotiques en intra utérine.
- Injection de la PGF2 α en IM pour la reprise de la cyclicité.

Recherche d'embryons :

- Juste après collecte du liquide, dépôt des flacons de récolte sur une plaque chauffante à 37°C (Figure 26).
- Décantation pendant 20 à 30 minutes pour l'obtention d'un précipité contenant les structures récoltées.
- Extraction du surnageant (Garder 1 cm de PBS dans le flacon).
- Séparation du précipité dans des boîtes de pétri quadrillées.
- Observation sous microscope optique inversé au plus faible grossissement (Figure 27).



Figure 22 : Epidurale basse



Figure 23 : Introduction de la sonde avec mandrin, à un angle de 45°



Figure 24 : Rinçage : injection du PBS



Figure 25 : Rinçage : récolte du PBS



Figure 26 : Liquide de récolte sur plaque chauffante

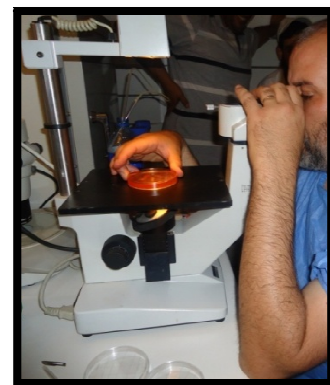


Figure 27 : Observation sous microscope optique

4. Résultats :

4.1. Suivi d'élevage :

Suite aux visites d'examen, nous avons constaté que les vaches souffrent d'acidose ruminale, diagnostiqué par l'examen des bouses, de boiteries, et de quelques cas d'endométrites cliniques. L'hygiène était médiocre à la deuxième visite (Annexe 7), ce qui a accentué les cas de boiterie.

Vu l'état dégradé des lieux, nous avons émis quelques recommandations qui ont été prises en considération de suite par les éleveurs, le changement a été vite remarqué au cours de nos visites de suivi (16/02/2016, et 08/03/2016)(Annexe 10):

- Amélioration du BCS avec une moyenne de 2.95 très proche de l'objectif qui est de 2,75 retenu pour les vaches laitières au-delà de 60 JPP (**Drame et al., 1999**) (pic de lactation BCS=2,5) et avant tarissement (voir diagramme ci-dessous).
- Diminution considérable des cas de boiteries.
- Cas des endométrites cliniques : traitement par Ceftiofure.
- Une très bonne amélioration de l'état générale des vaches.
- Amélioration de l'hygiène en général.

Tableau 9 : Evolution du BCS pendant les visites du suivi.

N° de Vache	Evolution du BCS				
	06/01/2016	17/01/2016	27/01/2016	16/02/2016	08/03/2016
Vache 1 : 5360	2.75	3	3	3	2.75
Vache 2 : 6325	3.5	3.5	3.25	3	3
Vache 3 : 4248	3.25	3	3	3	2.75
Vache 4 : 0455	2.5	2.75	2.5	3	2.75
Vache 5 : 2132	2.5	2.5	2.25	2.5	2.75
Moyenne BCS	3.25	2.95	2.8	2.9	2.8
	2.95				

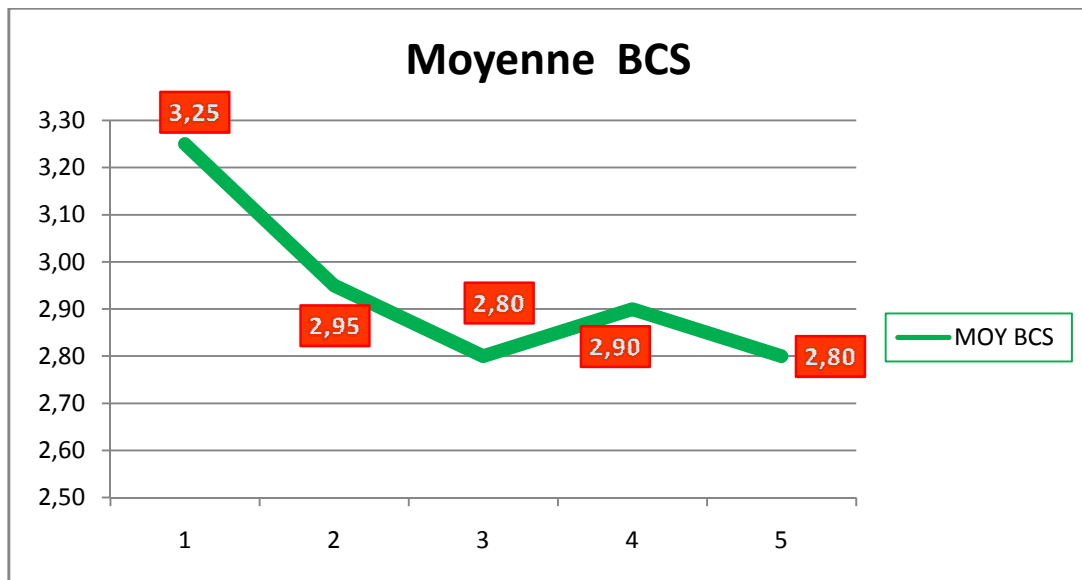


Figure 28 : Diagramme de l'évolution de la moyenne des BCS des 5 vaches donneuses

4.2. Suivi de la cyclicité :

Tableau 10 : structures palpées sur l'ovaire pendant les visites du suivi de la cyclicité

	Suivi de la cyclicité					
	06/01/2016		17/01/2016		27/01/2016	
5360	2Fol	RAS	RAS	RAS	Fol	Lisse
6325	Granuleux	Granuleux	RAS	Fol+CJ en regression	CJ	CJ
4248	-	-	RAS	RAS	RAS	CJ
0455	CJ	Fol	RAS	Petit Fol	Lisse	CJ
2132	RAS	CJ	RAS	CJ	Lisse	Lisse

Examen des ovaires : évolution des structures palpées (Follicule et CJ) tout au long des trois visites du suivi.

4.3. Réactions ovariennes aux traitements et résultats de récolte :

Tableau 11 : Réaction ovarienne au traitement.

	Réaction ovarienne aux traitements
Total vaches traitées	5
Total des CJ	50
Moyenne des CJ	10

Tableau 12 : Réaction ovarienne au traitement selon le protocole suivi.

	Protocole 1	Protocole 2
Nombre de vaches traitées	2	3
Nombre de CJ	26	24
Moyenne CJ/vache	13	8

La réaction ovarienne est en moyenne de 10CJ/vache (Figure 29).

La réaction au protocole 2 est légèrement inférieure à celle du protocole 1, avec une moyenne de 13 pour ce dernier, et de 8 pour le protocole 2.

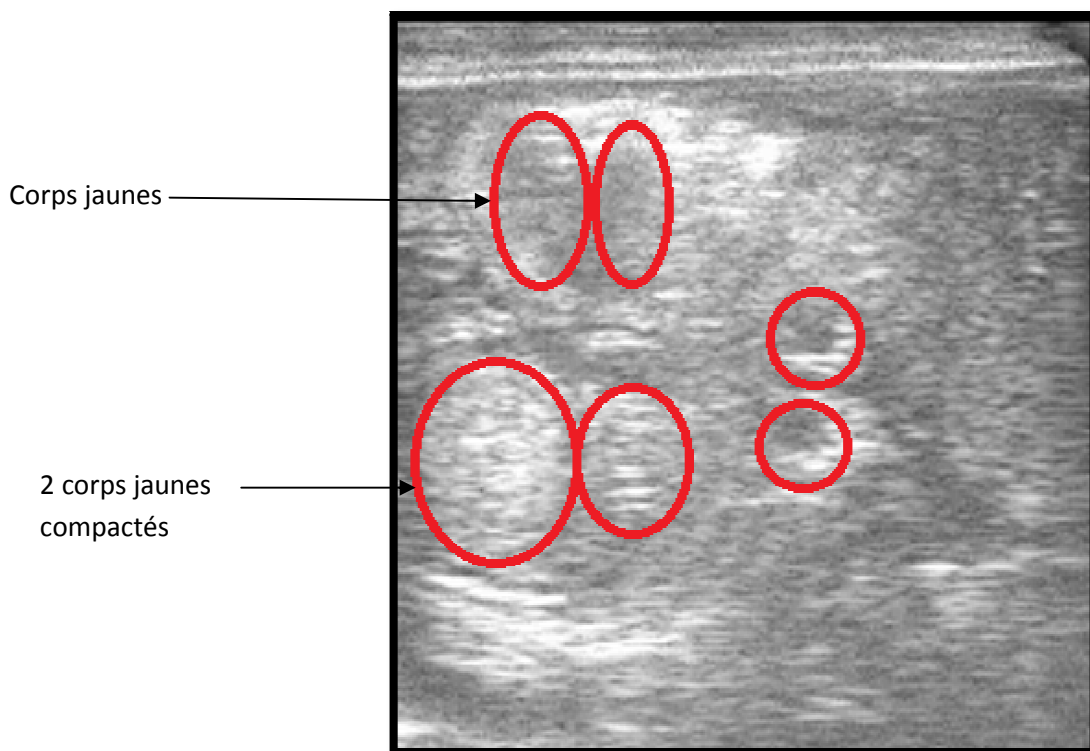


Figure 29 : Réaction ovarienne au traitement (corps jaunes compactés)

Tableau 13 : Résultats de la récolte

	Protocole 1	Protocole 2
Nombre de vaches traitées	2	3
Nombre de vaches collectées	1	2
Nombre d'embryon récolté	1	0
Nombre d'ovocytes récoltés	8	0

8 ovocytes (Figure 30.1) et un embryon ont été récoltés de la vache traitée par le protocole 1 (1.2). L'embryon était dégénéré (Figure 30.2). Aucune structure n'a été récoltée des vaches traitées par le protocole 2.

La vache 1, traitée par le protocole 1, n'a pas été récolté, car la réponse ovarienne était faible (Annexe 9). La vache 4, traitée par le protocole 2, n'a pas été récolté car la pénétration du col était impossible, malgré l'usage d'un dilateur cervicale, et il était impossible de réessayer le lendemain car elle a eu une cervicite (Annexe 8).

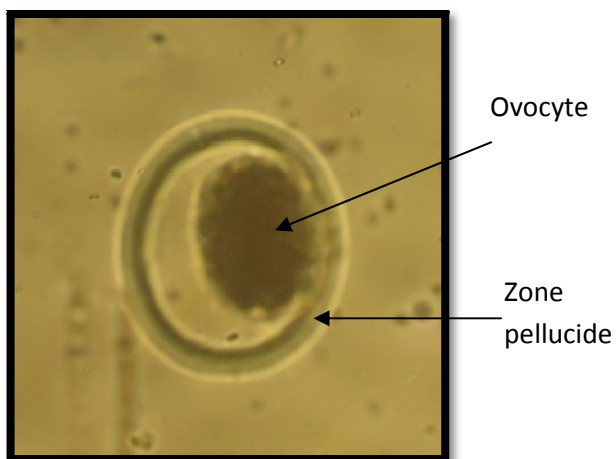


Figure30.1 : Ovocyte

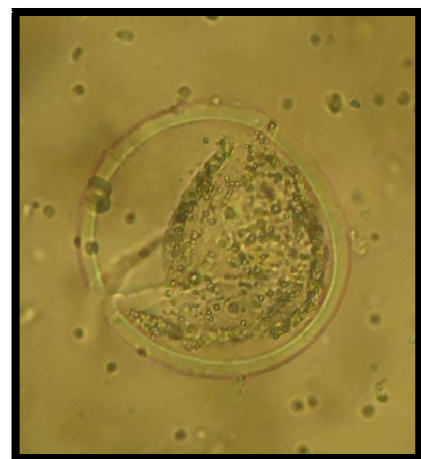


Figure 30.2 : Embryon dégénéré

Tableau 14 : Note BCS au début du traitement.

N° de Vache	BCS au début du traitement
Vache 1 : 5360	2.75
Vache 2 : 6325	3.25
Vache 3 : 4248	2.5
Vache 4 : 0455	2.75
Vache 5 : 2132	2.75
Moyenne des BCS	2.8

Le BCS des 5 vaches varie entre 2.75 et 3.25, avec une moyenne de 2.8, le jour du début du traitement.

5. Discussion

La réaction ovarienne était bonne en moyenne, elle était de 10 CJ/ vache. Cette réaction est légèrement supérieure à celle obtenue par **Adel en 2003**, et **Ferrouk et al., en 2008** chez la vache Cheurfa, qui était respectivement de 7 CJ et 5 CJ en utilisant le protocole de superovulation à 8 injection (protocole 1).

La réaction ovarienne au protocole 1 à 8 injections était meilleur que celle du protocole 2 à 3 injections. Elle était respectivement de 13 et 8.

Le nombre d'embryons collectés était de 1, et il était dégénéré, et le nombre d'ovocytes était de 8. Ce résultat est considéré médiocre comparé à celui obtenu par **Behidji et Kellou en 2011** qui était d'une moyenne de 15.5 embryons.

Ce résultat est obtenu malgré les bonnes notes de BCS, qui variaient entre 2.75 et 3.25. Ces notes correspondent bien à celles retenues par **Jun-Kyu Son et al., en 2012**, qui montrent que le nombre d'ovocytes était de 15.4 ± 2.8 , et 5.4 ± 2.1 , et le nombre d'embryon était de 6.0 ± 2.1 et 8.5 ± 1.8 , lorsque le BCS était respectivement de 2.75 ou ≥ 3.0 .

Nos résultats n'étaient pas à la hauteur de nos attentes, cela est probablement lié aux:

- Conditions d'élevage : en effet, nous avons remarqué durant nos visites de suivi que l'alimentation des vaches n'était pas constante, des pénuries du concentré de bonne qualité étaient souvent notées. Le fourrage à base de vesce avoine était mélangé à la paille de blé, et l'ensilage de maïs contenait beaucoup de grains de maïs. Ce changement brutal et continu de la qualité de l'aliment a causé des acidoses ruminales. L'effet de ce changement sur l'état général des vaches est très visible sur l'évolution des moyennes de BCS en dents de scie tout au long du suivi, précédée par une chute brutale d'une moyenne de 3.25 à 2.95 (Cf. diagramme figure 28). Même si la moyenne du BCS au début du traitement était bonne, les changements avaient déjà affecté le métabolisme des vaches.
- Paramètres métaboliques : les résultats des paramètres biochimiques - AGNE – des trois vaches récoltées (prélèvement au début du traitement et le jour de la récolte), étaient comme suit :
 - ✓ **Vache 2 : 6325** : 1.40 mmol/L et 2.92 mmol/L.
 - ✓ **Vache 3 : 4248** : 1.06 mmol/L et 1.03 mmol/L.
 - ✓ **Vache 5 : 2132** : 1.31 mmol/L et 1.28 mmol/L.

Ces résultats sont bien trop élevés par rapport à ceux retenus par **Jean-Sébastien Laizeau**, qui sont de 0.123 ± 0.060 mmol/L avant le début du traitement, et 0.159 ± 0.071 mmol/L le jour de la récolte. Ceci signifie que les vaches étaient en bilan énergétique négatif.

Vu les perturbations continues dans les conditions d'élevage, et l'évolution instable du BCS, nous n'avons pas pu avoir des récoltes avec des embryons viables, même si les réactions ovariennes aux traitements de superovulation étaient moyennes.

6. Conclusion

Le protocole de superovulation le plus utilisé au monde, est le protocole à 8 injections biquotidiennes à doses décroissantes de FSH, or, plusieurs études et recherches ont pour but de prouver que ce nombre important d'injections n'était pas nécessaire. Ces études ont pour objectif d'aboutir à des protocoles simplifiés pour éviter de stresser d'avantage les femelles donneuses.

L'incertitude de prévision et la forte variabilité de la réaction ovarienne aux traitements de superovulation malgré les essais de différentes hormones ou d'astuces thérapeutiques rendent difficile l'affirmation de la supériorité d'un traitement sur l'autre. Dans notre essai, l'usage de deux protocoles à injections quotidiennes et biquotidiennes montre des réactions ovariennes très variées. Celles du protocole à trois injections (quotidiennes) semble être moyennement bonnes comparée aux réactions au protocole à huit injections (biquotidiennes).

7. Recommandations

- Améliorer les conditions d'élevage des vaches donneuses d'embryons.
- Essayer de maintenir un BCS moyen et à évolution stable.
- Eviter au maximum le stress alimentaire.
- Eviter le bilan énergétique négatif avant et pendant le traitement de superovulation.
- Faire un suivi plus rigoureux de la cyclicité et des chaleurs des vaches avant le début du traitement, afin d'éliminer les vaches à cycles irréguliers.
- Sélectionner des vaches moins agressives pour éviter le stress.
- Travailler sur un cheptel plus important.

Références :

Adel, 2003 : mémoire de magister : étude comparatives de deux extraits hypophysaires dans la production d'embryon chez le bovin.

Armstrong DT., 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39, 7, 24.

Bajema, 1982. Artificial selection and the development of evolutionary theory (Benchmark papers in systematic and evolutionary biology ; 4), Hutchinson Ross; First Edition.

Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP; 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifer. *Theriogenology*;42:895–907.

Bó GA, Guerrero DC, Adams GP, 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*;69:81–7.

BOSIO Laurent, 2006. Relations entre fertilité et évolution de l'état corporel chez la vache laitière : Le point sur la bibliographie.

Braw-Tal R and Yossefi, 1997. Studies invivo and invitro on the initiation of follicle growth in the bovin ovary. *J-reprod fertile* 109, 165-71.

Briant C., D. Guillaume, P.-L. Toutain, M.-R. Blanc, 2007. La superovulation chez la jument avec les hormones gonadotropes : le point sur la situation et nouvelles données ; *INRA Prod. Anim.* 20, 275-294.

Cambarous Y., Pvolland-Nail, 1997. Les Gonadotropines INRA.

Carvalho Paulo D., Katherine S. Hackbart, Robb W. Bender, Giovanni M. Baez, Ana R. Dresch, Jerry N. Guenther, Alex H. Souza, Paul M. Fricke, 2014. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology* 82; 481–489.

Derivaux J., Ectors F., 1986. Reproduction chez les animaux domestiques, Cabay.

Drame ED, Hanzen C, Houtain JY, Laurent Y, Fall A, 1999 - Profil de l'état corporel au cours du postpartum chez la vache laitière – *Ann Med Vet*; 143 : 265-270.

Drion P., Beckers J.F., Derkenne F, Hanzen Ch., 2000. Le développement folliculaire chez la vache – Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du postpartum.

Ectors F., J.F Beckers, F.J Ectors, A.Delval, K. Touati, 1989. Multiplication des embryons chez les bovins – possibilités actuelles et futures, Chaire d'obstétrique et des troubles de la reproduction. Centre I.R.S.I.A. Cerad Section III, Faculté de médecine vétérinaire, U. La. – Cureahem.

Ennuyer M., 2000. Les vagues folliculaires chez la vache – Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction. Le point vétérinaire, vol. 31, n° 209, 377-383.

Ferrouk Mustapha, Gharbi Ismail, Adel Djallal, Lafri Mohamed, Touati Kamel, Kaidi Rachid And Djamel Guetarni, 2008. Production and transfer of embryos in Algerian “Cheurfa” bovine breed African Journal of Agricultural Research Vol. 3 (4), pp. 320-323.

Gayrard V., 2007. Physiologie de la reproduction MAMMIFERES.

Hulshof S.C.J, Fuguereido J.R, Beckers J.F, Bevers M.M, Vendenhurk R, 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal ovaries. Vet Quarterly 16(2):78-80.

Humblot P., Rodrigues J.L., Nibart M., Silvestrini Tiezzi F.L., Jeanguyoy N., Thibier M., 1994. Effet du mode de synchronisation des cycles sexuels sur la réponse hypophysaire et la fonction ovarienne après superovulation chez la vache. Elev. Insem. 261, 7-18.

Hyttel P., Fair T., Colleson H., and Greve T., 1997. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47, 23-32.

INRA-UNCEIA, 1990. Blastographie. Elev. Insem. 235, 39 pages.

Jun-Kyu Son, Yeon-Sub Jung, Sang-Rae Cho, Kwang-Soo Baek, Ho-Beak Yoon, Hyun-Joo Lim, Eung-Gi Kwon, Sang-Bum Kim and Changyong Choe, 2012. Relationship between Estrous expression Rate, BCS and Transferable Embryos in Holstein Donor Cows. J. Emb. Trans. Vol. 27, N° 4, pp. 237-243.

Kimura K, Hirako M, Iwata H, Aoki M, Kawaguchi M, Seki M., 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. Theriogenology;68:633–9.

LAIZEAU Jean-Sébastien, 2003. Thèse de doctorat vétérinaire : Facteurs de variation de la production d’embryons chez la vache laitière de race Montbéliarde. Ecole nationale vétérinaire d’Alfort, Faculté de médecine de Creteil.

Leborgne, Tanguy et al., 2013. Reproduction des animaux d’élevage (troisième édition).

Looney CR, Boutte BW, Archbald LF, Godke RA. 1981. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. Theriogenology;15:13–22.

Looney CR, Pryor JH, 2012. Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. Anim Reprod 2012;9:404–13. Looney CR, Pryor JH. Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. Anim Reprod;9:404–13.

Monniaux D., C. Rico , H. Larroque , R. Dalbiès-Tran, C. Médigue , F. Clément , S. Fabre, 2010. L’hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse à une stimulation ovarienne chez les bovins.

Nibart M. et Humblot P., 1994. Les gonadotropines : utilisations des hormones gonadotropes chez les bovins.

Nibart M., 1991. Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage. Rec. Med. Vet. 167, 261-290.

PELLETIER J-P, 2013. Mémoire de Masters : Superovulation chez la vache laitière : Impact de la progestéronémie.

Ponsart C., B. Marquant-Leguienne, P. Humblot ; 2004. Les biotechnologies de l'embryon bovin, évolution et perspectives.

Russe T. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. Bibl. anat. 24, 77-92.

Saumande J., 1995. La production d'embryons chez les bovins : Quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ?, Physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, INRA Prod. Anim. 8 (4), 275-283.

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

Thibault C., M-C Levasseur, 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme, INRA.

Walsh JH, Mantovani R, Duby RT, Overstrom EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, et al. 1993. The effects of once or twice daily injections of pFSH on superovulatory response in heifers. Theriogenology;40:313–21.

Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, Suzuki T., 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. Theriogenology; 41:747–55.

Yanagimachi R., 1994, Mammalian fertilization, lu: **Knobil E., Neil J.D.,** The physiology of reproduction – Second edition Reven Press 189-317. **N: Hanzen Ch, Hourtie O., Drin P.V., 2000.** Le développement folliculaire chez la vache: Aspects morphologiques et cinétiques. Aun. Med. Vet 144, 223-235.

Website:

www.reprology.com consulté le 20-12-2015.

www.escouflairepol.fr, consulté le 12-01-2016.

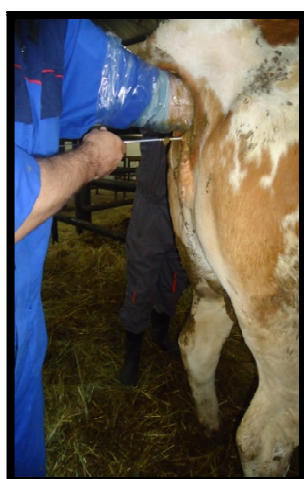
Annexes :



Annexe 1 : Injection de la FSH



Annexe 2 : Matériel d'IA



Annexe 3 : IA profonde



Annexe 4.1 : Laboratoire mobile



Annexe 4.2 : Beine du laboratoire mobile



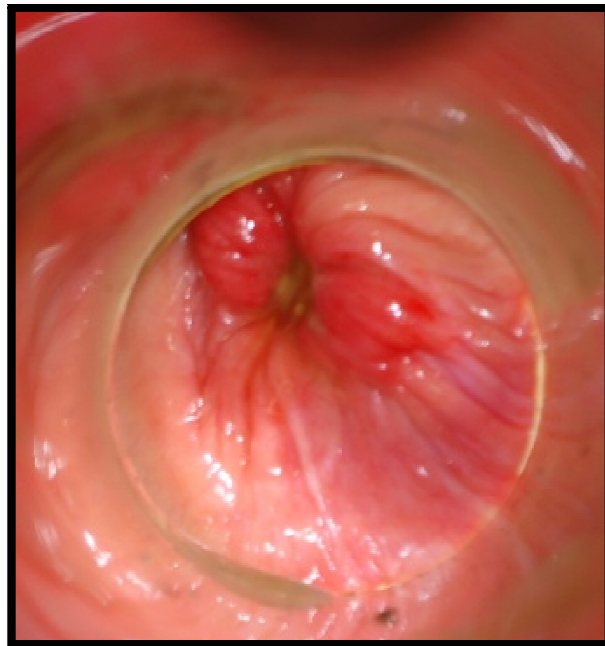
Annexe 5 : Désinfection de la région périnéale



Annexe 6 : Gonflement du ballonnet.



Annexe 7 : Hygiène de l'étable à la 2^{ème} visite



Annexe 8 : Cervicite de la vache 0455

Annexe 9 : Tableau récapitulatif des traitements de superovulation et récolte.

N° d'ID	Race	Protocole	Début du traitement	Date de IA	Date de récolte	Réponses ovariennes au traitement		BCS au début du traitement	Résultats de récolte	Remarques	
						OG	OD				
5360	FLV	1.1	28-04-2016	02-05-2016	09-05-2016	KF	1 CJ	2,75	-	Pas de récolte	
6325	FLV	1.2	19-05-2016	29-05-2016	05-06-2016	15 CJ + KFL	10 CJ	3,25	8 ovo. + 1emb. dég.	Vache agitée, récolte facile	
Protocole 1						26 CJ + 2 KFL					
0455	NOD	2.1	28-04-2016	02-05-2016	09-05-2016	5 CJ	5 CJ	2,5	-	Pénétration impossible (9-05)-Cervicite (10-05)	
4248	FLV	2.1	30-04-2016	04-05-2016	10-05-2016	3 CJ	1 CJ cavitaire	2,75	0	Vache très agitée	
2132	NOD	2.2	19-05-2016	29-05-2016	05-06-2016	6 CJ	4CJ	2,75	0	Vache calme, récolte facile	
Protocole 2						24 CJ					
Totaux						29 CJ + 2 KFL	21 CJ	Moy BCS	8 ovocytes + 1 embryon dégénéré	Réponses aux traitements satisfaisantes Résultats médiocres	
						50 CJ + 2 KFL		2,8			

Annexe 10 : tableau récapitulatif du suivi d'élevage des 5 vaches superovulées.

N° d'ID	Race	IU	BCS et Structures palpées sur les 2 ovaires										BCS 16/08/2016	BCS 08/03/2016
			06/01/2016			17/01/2016			27/01/2016					
			BCS	OG	OD	BCS	OG	OD	BCS	OG	OD	BCS		
5360	FLV	Bonne	2.75	2Fol	RAS	3	RAS	RAS	3	Fol	Lisse	Sp +	3	2,75
6325	FLV	Bonne	3.5	Granuleux	Granuleux	3,5	RAS	Fol+CJ en regression	3,25	CJ	CJ	Sp-	3	3
4248	FLV	En cour	3,25	-	-	3	RAS	RAS	3	RAS	CJ	Sp -	3	2,75
0455	NOD	Bonne	2.5	CJ	Fol	2,75	RAS	Petit Fol	2,5	Lisse	CJ	Sp -	3	2,75
2132	NOD	Bonne	2.5	RAS	CJ	2,5	RAS	CJ	2,25	Lisse	Lisse	Sp-	2.5	2,75

PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION
CHEZ LA VACHE

PRODUCTION D'EMBRYONS BOVINS

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

SOMMAIRE

EXPÉRIMENTAL