

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



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**

**PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ LA VACHE EN UTILISANT UN PROTOCOLE SIMPLIFIE**

Présenté par

**SILMI Amina**

**Devant le jury :**

<b>Président(e) :</b>	KAIDI R.	Professeur	Université de BLIDA1
<b>Examineur :</b>	KALEM A.	MCB	Université de BLIDA1
<b>Promoteur :</b>	ADEL D.	MCB	Université de BLIDA1

**Année : 2018/2019**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure1</b> : le fonctionnement de l'ovaire .....	3
<a href="http://www.medjouel.com/wp-content/uploads/2018/02/BA-TD-2-embryologie-appareil-g%C3%A9nital-de-la-femme.pdf">http://www.medjouel.com/wp-content/uploads/2018/02/BA-TD-2-embryologie-appareil-g%C3%A9nital-de-la-femme.pdf</a>	
<b>Figure2</b> : schéma présentatif d'ovogenèse.....	4
<a href="http://mdevmd.accesmad.org/mediatek/mod/page/view.php?id=10464">http://mdevmd.accesmad.org/mediatek/mod/page/view.php?id=10464</a>	
<b>Figure3</b> : Schéma des différents stades folliculaires de l'ovaire chez la vache.....	8
<a href="https://www.dictionnaire-medical.net/term/10515,1,xhtml">https://www.dictionnaire-medical.net/term/10515,1,xhtml</a>	
<b>Figure 4</b> : folliculogénèse basale et folliculogénèse terminale.....	10
<a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Folliculog%C3%A9n%C3%A8se">https://fr.wikipedia.org/wiki/Folliculog%C3%A9n%C3%A8se</a>	
<b>Figure 5</b> : croissance terminale recrutement sélection dominance ovulation jours.....	10
<a href="https://slideplayer.fr/slide/3403584/">https://slideplayer.fr/slide/3403584/</a>	
<b>Figure 6</b> : schéma générale de l'ovogenèse .....	11
<a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Ovogen%C3%A8se">https://fr.wikipedia.org/wiki/Ovogen%C3%A8se</a>	
<b>Figure 7</b> : représentation schématique de la croissance de l'ovocyte en relation avec le stade de la folliculogénèse.....	11
<a href="http://acces.ens-lyon.fr/biotic/procreat/clonage/html/CompetenceOvocyte.htm">http://acces.ens-lyon.fr/biotic/procreat/clonage/html/CompetenceOvocyte.htm</a>	
<b>Figure 8</b> : schéma représentatif du recrutement, sélection, dominance et atresie folliculaire.....	13
<a href="http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/2011/11/la_fonction_ovarienne-2016.pdf">http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/2011/11/la_fonction_ovarienne-2016.pdf</a>	
<b>Figure 9</b> : résultat de la superovulation sur le CJ.....	19
<a href="https://slideplayer.fr/slide/3405892/">https://slideplayer.fr/slide/3405892/</a> (MAPLETOFT R. et al., 2002)	
<b>Figure 10</b> : chronologie du développement embryonnaire j0-j9.....	22
(In Winterberger-Torres et Sevellec 1987)	
<b>Figure11</b> : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 1.....	23

(WRIGHT J. M., 2010)

**Figure 12:** J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 2.....23

(WRIGHT J. M., 2010)

**Figure 13 :** J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 3.....24

(WRIGHT J. M., 2010)

## LISTE DES ABREVIATIONS

**TE** : Transfert Embryonnaire

**CJ** : Corps Jaune

**SO** : Superovulation

**PG** : Prostaglandine (PGF2a)

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone

**LH** : Luteinising Hormone

**PMSG** : Pregnant Mare Serum Gonadotropin

**eCG** : equine Chorionic Gonadotropin

**TOT** : le nombre moyen total d'embryons

**TRA** : le nombre moyen d'embryons transférables

**GR1** : le nombre moyen d'embryons de qualité 1

**DG** : le nombre moyen d'embryons dégénérés

**UFO** : le nombre moyen d'ovocytes non fertilisés

## REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant qui a donné le courage, la volonté et la patience pour faire ce travail.

Je remercie mon promoteur : Mr. ADEL Djalal pour ses conseils et encouragements.

Je tiens à remercier aussi les membres de jury :

Mr KAIDI Rachid Professeur, pour nous avoir honoré de présider le jury.

Mr KALEM Amar maitre de conférences B, pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions également tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce modeste travail plus particulièrement mon cher ami AZZOUG Kouceila.

## Dédicace

Je dédie ce travail :

Ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance ;

Ceux qui ont attendu avec patience les fruits d'une bonne éducation ; mes parents

Celle qui m'a donné la vie, symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur, réussite, ma chère adorable MAMAN ;

Celui qui m'a donné la vie, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes l'année d'études, a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, me donner de l'aide et me protéger, mon chère PAPA ;

Que dieu garde mes chers parents et les protège ;

Ma chère adorable sœur : ASSIA

Mon frère : ABDELGHANI

A mon homme qui m'a offert tout le bonheur, la force, l'encouragement et beaucoup d'espérance de réussite M.ASIL

Mes chers tantes qui mon soutenu moralement durant mon cursus ;

Mes chers collègues : HOUDA, KOUCEILLA, ANIA, HANNA, MAROUA, YAHIA.

Mon promoteur : Dr ADEL Djalal

Tous ce qui m'est chers ;

Tous ceux qui m'aiment ;

Tous ceux que j'aime ;

A tous les enseignants qui ont donné beaucoup d'effort pour notre réussite.

## Résumé

Les principaux objectifs du transfert embryonnaire sont une meilleure utilisation des femelles à fort potentiel génétique, et une diffusion simplifiée de cette génétique. Dans l'optique de la production d'embryons par un protocole simplifié, deux vaches de race Holstein de donneuses ont été constituées pour ce traitement selon l'hormone utilisée stimufol (lysophilisat pFSH et pLH ) à 20% , à des doses constantes . Le traitement s'est étendu sur trois jours à partir de J10 du cycle (JO = chaleurs de référence), le travail s'est déroulé au niveau de la station expérimentale de l'institut vétérinaire Blida. On a commencé par le suivie des chaleurs afin de déterminer les chaleur de référence puis le traitement de superovulation simplifié en utilisant trois injections constantes de stimufol à 24h d'intervalle. La réponse au stimulus est interprétée par l'obtention en moyenne de 18 CJ pour 3 vaches ; la première vache avec 25CJ, la deuxième 18CJ et la troisième 11CJ.

Cette technique nécessite la maitrise ; du cycle, de la méthodologie de la récolte et la disposition du matériels adéquat. Le résultat de cette étude était réussie du point de vue du nombre de CJ obtenus, le nombre d'embryons était nulle il n'y a eu que des non fécondés et cela pourrait être lié à plusieurs facteurs tel que l'alimentation, environnement, hygiène, état de santé de l'animal, le stress, insémination retardée et le non-respect du protocole décrit.

### **Mots clés :**

Chaleurs, Superovulation, follicules, corps jaune, embryons.

## ملخص

الأهداف الرئيسية لنقل الأجنة هي استخدام أفضل للإناث ذات الإمكانيات الوراثية العالية ،  
ونشر مبسط لهذه الوراثة. في ضوء إنتاج الأجنة عن طريق بروتوكول مبسط ، تم تشكيل اثنين  
العلاج وفعال لهرمونات الميسر تخدم في التحفيز من الأبقار من سلالة هولشتاين من المانحين لهذا  
ماي أقتال رادم على علاج العارشن مت. نتائج تاعرج يف ، 20 % تبسنب (pLH و pFSH lysophilisate)  
من اليوم 01 من الدورة (JO = حرارة الإشارة) ، وتم تنفيذ العمل في المحطة التجريبية للمعهد  
لتحديد الحرارة المرجعية وعلاج الإباضة الفائق المبسط البيطري الجديدة. تم اتباع الحرارة  
بإستخدام ثلاث حقن ثابتة من المنيبات 42 ساعة. يتم تفسير الاستجابة للحافز من خلال  
11CJ. قتل اثل او 18CJ قين اثل او ، 25CJ عمى لوالا قرق بلا. بتارقب 3 قنمل 18 CJ ال حصول على متوسط  
قساردا هذه قجيتن تناك. عيفاكلا داوملا طيطختو داصحلا قيجهم ، هذه التقنية تتطلب إتقانها ؛ دورة  
التي تم الحصول عليها ، وكان عدد الأجنة صفراً ولم يكن هناك سوى مخصب ويمكن أن يرتبط ذلك CJ ناجحة من حيث عدد  
لتلقيح بعدة عوامل مثل النظام الغذائي ، والبيئة ، النظافة ، حالة الحيوان ، الإجهاد ، تأخر  
وعدم التمثال لبروتوكول الموصوف.

كلمات البحث:

مع ارتفاع درجات الحرارة ، الإباضة ، بيصليات ، الجسم الأصفر والأجنة.

## summary

The main objectives of embryo transfer are a better use of females with high genetic potential, and a simplified diffusion of this genetics. In view of the production of embryos by a simplified protocol, two cows of the Holstein breed of donors were constituted for this treatment according to the hormone used stimufol (lysophilisate pFSH and pLH) at 20%, in constant doses. The treatment was spread over three days from day 10 of the cycle (OJ = heat of reference), the work was carried out at the experimental station of the veterinary institute Blida. The heat was followed to determine the reference heat and the simplified superovulation treatment using three constant injections of stimufol 24 hours apart. The response to the stimulus is interpreted by obtaining an average of 18 CJs for 3 cows; the first cow with 25CJ, the second 18CJ and the third 11CJ. This technique requires mastery; cycle, harvesting methodology and adequate material layout. The result of this study was successful in terms of the number of CJ obtained, the number of embryos was zero there were only non-fertilized and this could be related to several factors such as diet, environment, hygiene, animal health condition, stress, delayed insemination and non-compliance with the described protocol. Keywords : Heats, superovulation, follicles, corpus luteum, embryos.

## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction générale.....1

### CHAPITRE I : FOLLICULOGENESE

1-Oogénèse .....3

2-activité cyclique .....4

2-1/ phase lutéale.....4

2-2/ phase folliculaire .....5

3- Folliculogénèse .....5

A/ multiplication.....5

B/ croissance .....6

B-1/les différents stades des follicules.....6

B-2/ notion de recrutement-sélection-dominance.....8

B-3/ les vagues folliculaires.....9

C/ maturation .....10

4) atresie folliculaire .....12

5) ovulation .....13

### CHAPITRE II : LA SUPEROVULATION

1) Le moment idéal pour appliquer le protocole de superovulation.....14

2) Les protocoles de super ovulation.....14

a) Utilisation de l'équine chorionique gonadotrophine « ECG ».....14

b) b/Utilisation de la « Follicle Stimulating Hormone » (FSH) .....15

1/ protocole standard.....	15
1-a) alternatives possibles au protocole standard .....	15
- Administration quotidienne FSH.....	15
- Utilisation d'une solution FSH pure .....	16
- Diminution de la fréquence administration FSH .....	16
3) Le protocole d'optimisation à la superovulation .....	17
a) Utilisation progestérone .....	17
b) Utilisation FSH.....	17
c) Utilisation ecG.....	17
d) Ablation manuelle des follicules .....	18
4) Variabilité des réponses des donneuses à la superovulation .....	18
5) L'insémination de la femelle donneuse.....	19

### **CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS**

1) Matériel .....	20
2) Méthodologie de la Collecte des embryons.....	21
2-a) collecte des embryons par lavage des cornes utérines .....	21
2-b) utilisation d'un second lavage utérine.....	22
3) Sélection des embryons viables : critères IETS.....	22
4) Transfert embryons frais .....	25

### **PARTIE EXPERIMENTAL**

1-Objectif de l'étude .....	27
2- Matériels et méthode	
• Les étapes à suivre .....	27
• Zone d'étude et période de travail .....	27
• Animaux .....	28
A) Matériels.....	28
• Contention de la vache .....	28
• Examen clinique de la vache .....	28
• Matériels utilisés dans la super ovulation .....	28
• Préparation et nettoyage de la région périnéale .....	29

• La récolte des embryons .....	29
• Observation des embryons .....	30
B) Méthodologie du travail .....	31
• Suivie des chaleurs .....	31
• La superovulation .....	31
• L'insémination artificielle .....	32
• La récolte .....	32
• Classification des embryons.....	34
• Protocole simplifié de la super ovulation utilisé.....	34
3- Résultat de la récolte.....	36
4- Discussion .....	38
5- Conclusion.....	40
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	41

## Introduction générale

Le transfert embryonnaire ou transplantation embryonnaire, consiste à collecter sur un animal vivant, nommé « donneur », des embryons après que cet animal ait subi un traitement de superovulation. Ces embryons sont ensuite transférés à des femelles nommées « receveuses » dont le cycle sexuel a été synchronisé avec l'animal « donneur ». Ce transfert peut être effectué à l'état frais, c'est-à-dire directement, ou après congélation pour un transfert ultérieur (MALAFOSSE A., 1997).

Le premier transfert embryonnaire réussi avec succès sur des animaux date de plus d'un siècle. Il fut réalisé par Walter HEAPE dans l'espèce lapine en 1890 à l'Université de Cambridge. En 1897, il publia un article indiquant que les embryons d'une race peuvent se développer dans le tractus génital d'une lapine de race différente, sans que ces derniers ne soient affectés par l'environnement utérin. Cette expérience marqua le début d'une nouvelle ère dans le monde de la reproduction animale (HEYMAN Y., 2010).

Ce n'est qu'en 1951 dans le Wisconsin qu'est né le premier veau issu d'un transfert embryonnaire. A cette époque, le transfert était réalisé de manière chirurgicale. Puis au milieu des années 1970, des méthodes de transfert embryonnaire non chirurgicales ont commencé à se développer. Ces méthodes ont permis de simplifier le transfert, menant à des activités commerciales et à une industrie de l'embryon, principalement dans l'espèce bovine (HEYMAN Y., 2010).

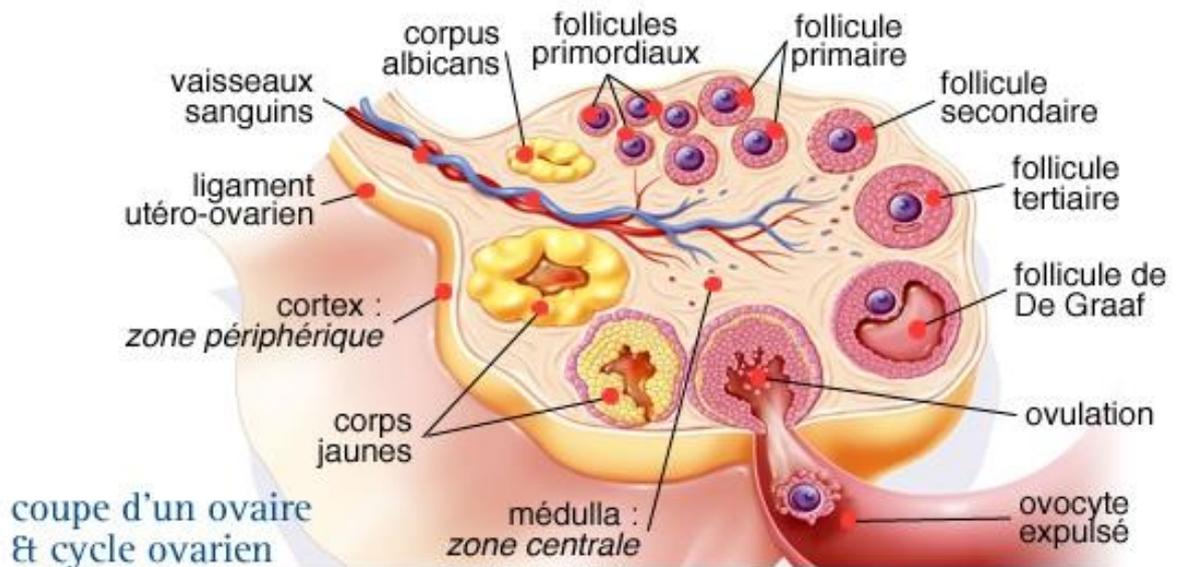
Des chercheurs français ont contribué à l'élaboration d'une méthode de transfert embryonnaire non chirurgicale. Ces recherches sur le transfert embryonnaire bovin ont été conduites à l'INRA par le Pr Charles THIBault au milieu des années 1970. Son équipe a ainsi proposé une méthode transvaginale pour réaliser les transferts embryonnaires bovins (HEYMAN Y., 2010). En effet, initialement transférés par voie chirurgicale jusqu'en 1980, les embryons le sont maintenant par une méthode dite « cervicale », consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus par voie vaginale, ce qui a été à l'origine du réel développement du transfert embryonnaire (PONSART C. et al., 2006). Aujourd'hui, les transferts embryonnaires dans l'espèce bovine sont réalisés par des personnes professionnelles de manière presque, en suivant un protocole précis auquel chaque équipe peut apporter des modifications. Il y a donc une méthode universelle, mais chaque équipe réalisant un transfert embryonnaire peut y apporter une touche personnelle.

Le transfert embryonnaire est aussi utilisé aujourd'hui dans les schémas de sélection, ce qui donne la possibilité d'augmenter et d'accélérer la diffusion génétique des meilleures femelles, au même titre que l'insémination artificielle permet d'accélérer la diffusion génétique des meilleurs taureaux.

De différents protocoles hormonaux nécessaires à la mise en place d'un transfert embryonnaire ont été utilisés appelant à des doses différentes d'hormones stimulantes, d'une assistance matin et soir du vétérinaire, un traitement onéreux d'hormones. Dans un but économique des recherches amené à un protocole simplifié tout en diminuant le nombre d'injection d'hormones et l'utilisation de doses constantes. L'objectif de ce travail est d'interpréter la réaction de superovulation et comparer les résultats à celui obtenu dans les protocoles classique.

## CHAPITRE I : FOLLICULOGENESE

L'ovaire des mammifères est le siège de modifications histologiques et hormonales importantes. Celles-ci témoignent ou participent à 4 événements essentiels de la reproduction à savoir : la **croissance** des follicules, la **régulation** du nombre de follicules ovulatoires, l'**ovulation** et la **formation** du corps jaune. (Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, 144, 223-235).

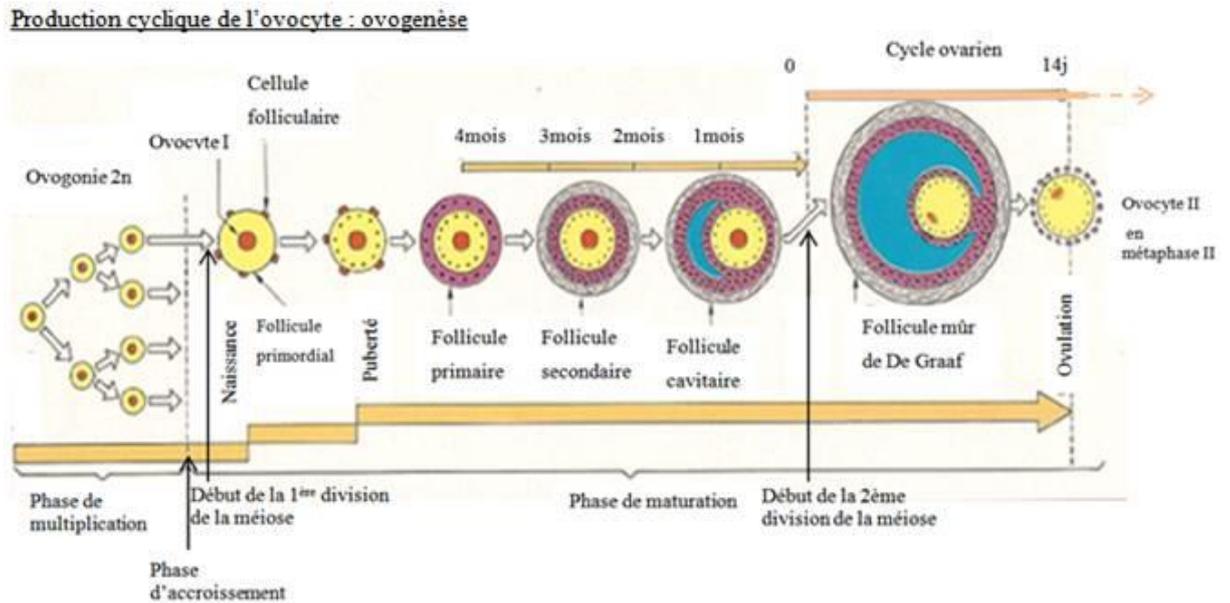


**Figure1 :** le fonctionnement de l'ovaire(<http://www.medjouel.com/wp-content/uploads/2018/02/BA-TD-2-embryologie-appareil-g%C3%A9nital-de-la-femme.pdf>)

### 1) Ovogénèse

L'ovogénèse est définie comme étant l'ensemble des processus conduisant à la formation et au développement des gamètes femelles ou ovules et les rendant aptes à être fécondés par les spermatozoïdes »(DERIVAUX et ECTORS 1986). Mais selon Norris et Lopez, 2011, l'ovogénèse est définie comme l'ensemble des mécanismes permettant aux cellules germinales de l'embryon de se diviser, se développer en follicules jusqu'à atteindre le stade de follicule primordial. Chez l'ensemble des mammifères, le tissu gonadique a pour origine embryonnaire le mésoderme. Les cellules germinales primordiales proviendraient de la différenciation de l'épithélium du sac de Yolk (une région de l'épiblaste adjacente à l'ectoderme) pendant la vie embryonnaire ou peu après (NORRIS ET LOPEZ, 2011). Ces cellules germinales migrent le long du mésentère dorsal de l'embryon en cours de formation jusqu'aux

crêtes génitales qui exercent un chimiotactisme positif, où elles deviennent alors des ovogonies (MONNIAUX et Al, 2009)



**Figure2 :** schéma présentatif d'ovogenèse

(<http://mdevmd.accesmad.org/mediatek/mod/page/view.php?id=10464>)

## 2) activité cyclique

Les bovins femelles présentent une activité ovarienne cyclique, à mettre en lien avec les chaleurs qui apparaissent en moyenne tous les 21 jours en l'absence de gestation. Cette manifestation régulière du comportement de chaleurs, fait apparaître la notion de cycle œstrien.

Le cycle ovarien se décompose en deux phases en prenant l'ovulation comme point de départ. Après l'ovulation, on a une première phase de prédominance du ou des corps jaunes, appelée phase lutéale qui dure 17 jours en moyenne. Puis on a une seconde phase de régression des corps jaunes, mais surtout de croissance folliculaire, appelée phase folliculaire ou préovulatoire, qui dure 4 jours.

### 2-1) Phase lutéale

Cette phase correspond à la lutéogenèse et à la lutéotrophie, elle est la plus longue et débute immédiatement après l'ovulation (MONTMEAS L., 2013). Elle s'achève par le début de la lutéolyse et le recrutement du ou des follicules cavitaires qui ovuleront au début du cycle suivant.

Cette phase lutéale qui dure 17 jours en moyenne peut être divisée en deux phases correspondantes à deux phases du cycle œstrien. Durant les 4 premiers jours, on parle de metœstrus qui correspond à la période de croissance du corps jaune qui atteint sa taille maximale. Ensuite, tant que le corps jaune est présent et fonctionnel, on parle de dioœstrus, cette phase a une durée de 13 jours (BALL P. J. H. and PETERS A. R., 2004).

## 2-2) Phase folliculaire

Cette phase pré-ovulatoire débute à la lutéolyse et dure 4 jours. C'est durant cette période qu'a lieu la croissance terminale d'un ou plusieurs follicules de De Graaf destinés à ovuler (MONTMEAS L., 2013). Pendant que le corps jaune régresse, on parle de pro-œstrus pendant 3 jours. Le 4ème et dernier jour de cette phase folliculaire correspond à l'œstrus, période durant laquelle la femelle est réceptive sexuellement (BALL P. J. H. and PETERS A. R., 2004). L'œstrus aboutit alors à l'ovulation qui marque le début d'un nouveau cycle sexuel.

## 3) Folliculogénèse

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule, depuis le moment où il sort de la réserve jusqu'à sa rupture (MONTMEAS L., 2013) mais la mise en place du potentiel folliculaire se fait bien avant la naissance chez les mammifères. Le nombre maximal de cellules gamétiques contenues dans l'ovaire est atteint après une première phase de **multiplication** aux environs du centième jour de gestation chez la vache et décroît progressivement ensuite jusqu'à la naissance. A cette première phase succède une phase de **croissance et une phase de maturation**, cette dernière concernant surtout l'ovocyte. Cette évolution ne concerne qu'un nombre réduit de follicules, la plupart d'entre eux subissant l'atrésie (Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, 144, 223-235.)

### A) multiplication

Les cellules germinales souches se multiplient entre le 60e et le 170e jour de gestation (ERICKSON, 1966a ; RUSSE, 1983 ; WANDJI et al., 1992). Se forme ainsi pendant la gestation un stock de 2 millions d'ovogonies qui, une fois la phase mitotique terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase 1: elles se transforment ce faisant en ovocyte primaire. Cette phase de multiplication est, chez la plupart des mammifères, terminée avant ou peu après la naissance. L'importance du stock folliculaire ainsi constitué dépend de

l'espèce (16.000 chez la brebis, 235.000 chez la vache) de la race, de l'individu, de l'âge, du niveau hormonal ou du statut de reproduction (BETTERIDGE et al., 1989 ; DRIANCOURT et al., 1991a ; RUSSE 1983 ; ERICKSON, 1966b ; PETERS, 1976 ; ERICKSON et al., 1976 ; CAHILL, 1981) . Cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal. Chez la vache, le nombre de follicules primordiaux a été estimé à 40.000 vers l'âge de 2 à 3 ans et à 2500 entre 12 et 14 ans (ERICKSON, 1966b).

## **B) croissance**

Cette phase de croissance ne concerne que 10 % du stock folliculaire. Comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et celui de l'ovulation, Cette phase se caractérise par des modifications qui concernent tout à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme. (MONNIAUX et al., 1983 ; LUSSIER et al., 1987 ; HULSHOF et al., 1994).

Cette croissance folliculaire préovulatoire comprend trois étapes : recrutement, sélection et dominance.

Concernant le développement terminal, on parle de « **vagues folliculaires** » car le développement des follicules se fait par vagues. Chez la vache, il y en a en moyenne 3 par cycle.

La première vague folliculaire commence le jour 1 du cycle, c'est-à-dire le lendemain de l'ovulation. Les vagues suivantes commencent à des moments du cycle variés selon les individus, sachant que plus le cycle est long chez une femelle plus le nombre de vagues est important (STEVENSON J. F., 2007).

Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordial, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaire et de De Graaf représentant les follicules antraux (MONNIAUX et al., 1983 ; LUSSIER et al., 1987 ; HULSHOF et al., 1994)

### **B-1)- Différents stades de follicules**

Des plus petits au plus gros, on trouve les follicules primordiaux, les follicules primaires, secondaires, tertiaires et les follicules De Graaf (MONTMEAS L., 2013).

Les follicules primordiaux sont de très faible dimension (20  $\mu$ m), et chaque follicule primordial est constitué d'un ovocyte primaire bloqué en première division méiotique. Ils sont

très nombreux dans la période néonatale et la majorité d'entre eux dégénère par la suite (BARONE R., 2001).

Au stade follicule **primaire**, l'ovocyte présente une ébauche de zone pellucide (BARONE R., 2001). Le volume du follicule s'est un peu accru, et l'ovocyte est entouré d'une couche de cellules cubiques ou cylindriques (MONTMEAS L., 2013).

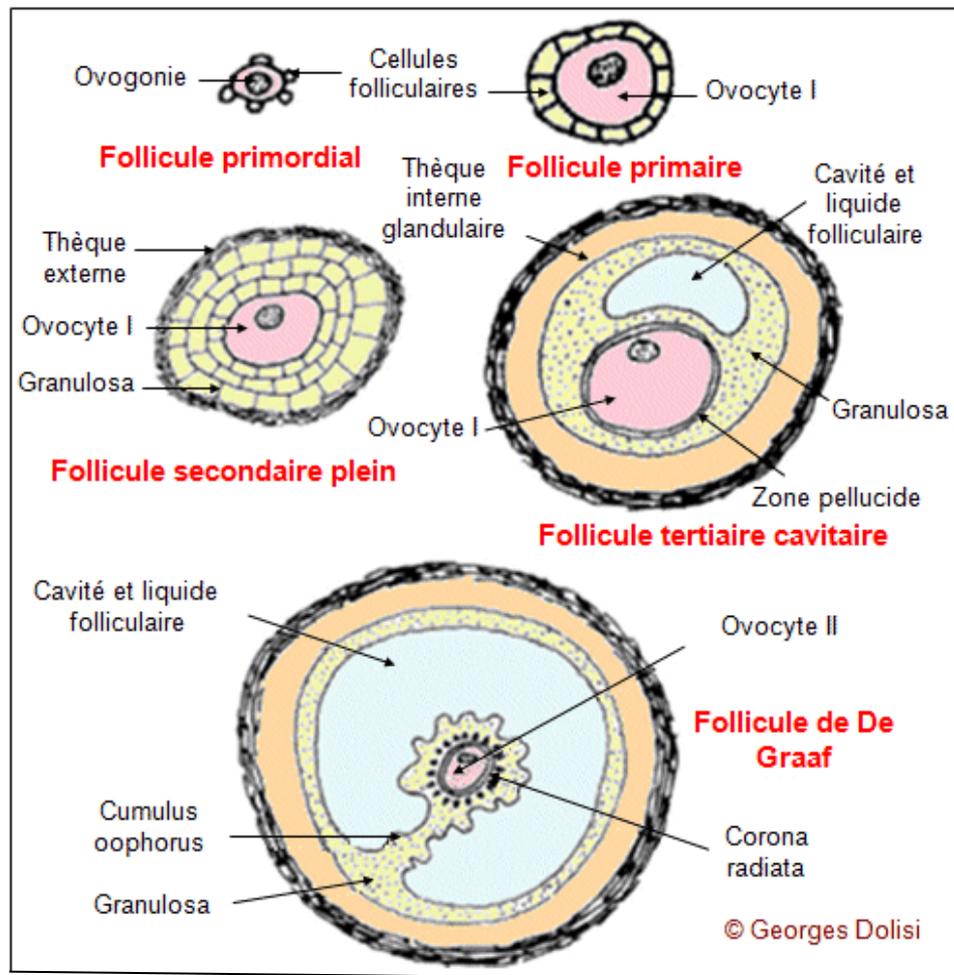
Au stade de follicule **secondaire**, l'ovocyte atteint sa taille maximale. Les cellules présentes autour de l'ovocyte se multiplient activement pour former un amas de plus en plus important, la granulosa qui a un rôle nourricier pour le gamète femelle (MONTMEAS L., 2013). A ce stade, la zone pellucide est bien visible, et une étroite zone de transition est apparue entre elle et l'ovocyte (BARONE R., 2001).

Les follicules **tertiaires** ou follicules à antrum, ont une cavité remplie de liquide folliculaire sécrété par les cellules de la granulosa sous l'action de la FSH. A ce stade, les thèques internes et externes sont bien différenciées (MONTMEAS L., 2013). Ces follicules tertiaires ont donc l'aspect d'une vésicule sphérique emplie de liquide, et deviennent bientôt visibles à l'œil nu (BARONE R., 2001).

Les follicules de **De Graaf** sont les follicules mûrs, ou préovulatoires, les plus volumineux (12-19 mm de diamètre chez la vache), et ils se distinguent par :

- Une cavité (antrum) très volumineuse
- Une thèque interne richement vascularisée dont les cellules synthétisent des androgènes
- Une granulosa très développée, dont les cellules transforment en œstrogènes les androgènes produits par la thèque interne (MONTMEAS L., 2013).

Les follicules de De Graaf sont alors de gros follicules sur le point de libérer leur ovocyte par déhiscence (BARONE R., 2001)



**Figure3** : Schéma des différents stades folliculaires de l'ovaire chez la vache  
(<https://www.dictionnaire-medical.net/term/10515,1,xhtml>)

### B-2) Notion de recrutement, sélection et dominance

Le terme "recrutement" s'applique à tout follicule qui a dépassé le stade auquel habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiques (FORTUNE, 1994). Il concerne donc tout un ensemble de follicules entamant dans un environnement d'influence gonadotrope une maturation susceptible de les conduire à l'ovulation.

La sélection fait référence au processus par lequel parmi les nombreux follicules en croissance, seuls arriveront au stade préovulatoire des follicules en nombre caractéristique de l'espèce ou de la race. Cette notion trouve sa confirmation dans la constance du nombre d'ovulations malgré la diversité quantitative et qualitative de la population folliculaire entre individus. L'atrésie joue un rôle essentiel dans cette sélection.

Le follicule dominant a été défini comme une structure folliculaire qui croît à au moins 11 mm de diamètre et excède le diamètre des autres follicules au sein d'une même vague de

croissance (GINTHER et al. 1989a, 1989d). le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression de follicules en croissance ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (SIROIS et FORTUNE, 1990 ; Ko et al. , 1991) et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (ROUILLE et al., 1989 ; GONG et al., 1993).

### **B-3)-Les vagues folliculaires**

Chez la vache et la jument, au contraire, on en observe également pendant la phase dioestrale du cycle (FORTUNE, 1994).

Certaines de ces études ont décrit la croissance folliculaire comme un phénomène continu indépendant du stade du cycle (DONALDSON et HANSEL, 1968 ; CHOUDARY et al., 1968 ; MARION et al., 1968 ; DUFOUR et al., 1972 ; SPICER et ECHTERKAMP, 1986). D'autres ont, par contre, démontré la présence d'au moins deux périodes de croissance et/ou de régression au cours du cycle, la première apparaissant au début de la phase lutéale et évoluant vers l'atrésie, la seconde apparaissant en fin de phase lutéale, au moment de la lutéolyse, et aboutissant à l'ovulation (RAJAKOSKI, 1960 ; SWANSON et al., 1972 ; MATTON et al., 1981 ; IRELAND et ROCHE , 1987)

Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules tertiaires antraux de diamètre égal ou supérieur à 2 mm, c'est l'étape de recrutement. Durant cette étape, la croissance des follicules est dépendante de la FSH. Puis, au-delà d'un diamètre de 8 mm environ, un follicule est sélectionné parmi les follicules recrutés. Ce follicule acquiert des récepteurs à la LH et peut continuer sa croissance tandis que les autres follicules recrutés s'atrésient. Il s'agit de la phase de sélection. Enfin, ce follicule finit sa croissance sous l'influence de la LH et finit par atteindre une taille d'environ 15 mm C'est la phase de dominance. Dans le cas où un corps jaune est présent, le follicule dominant s'atrésie et une nouvelle vague démarre. Si un corps jaune n'est pas présent, le follicule dominant peut alors terminer sa croissance et ovuler (LAIZEAU, 2003).

Si trois vagues sont observées, elles débutent en général aux 2èmes, 9ème et 16ème jours du cycle. Si 2 vagues sont observées, elles débutent en général au 2ème et 11ème jour du cycle, ce qui explique la variation de longueur des cycles parfois observée (LAIZEAU, 2003).

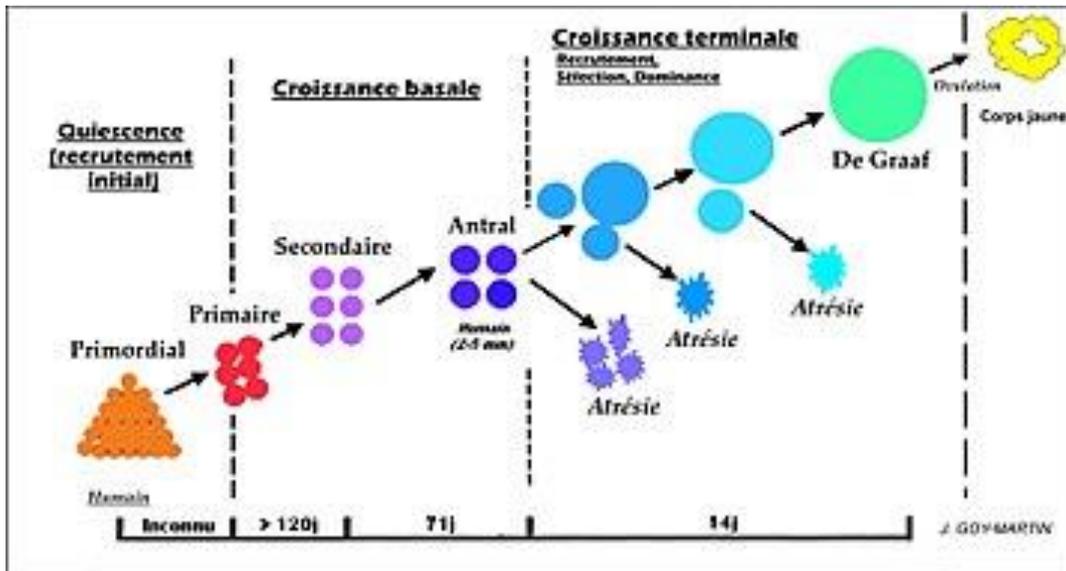


Figure 4 : folliculogénèse basale et folliculogénèse terminale(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Folliculog%C3%A9n%C3%A8se>)

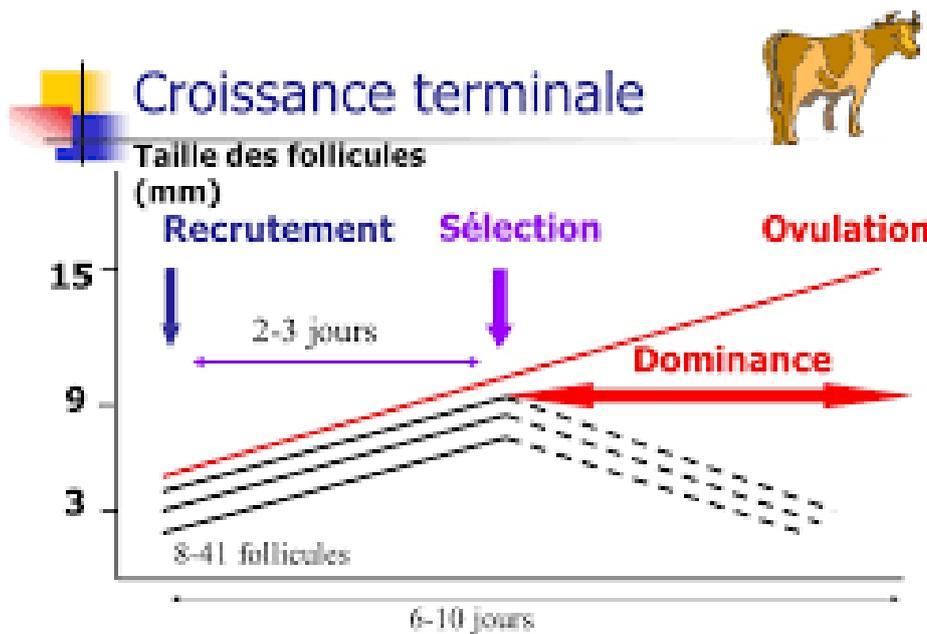


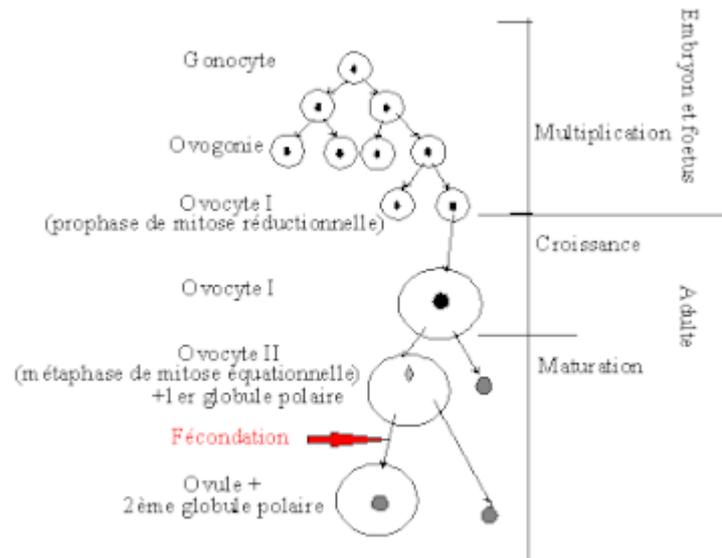
Figure 5 : croissance terminale recrutement sélection dominance

Ovulation par jours (<https://slideplayer.fr/slide/3403584/>)

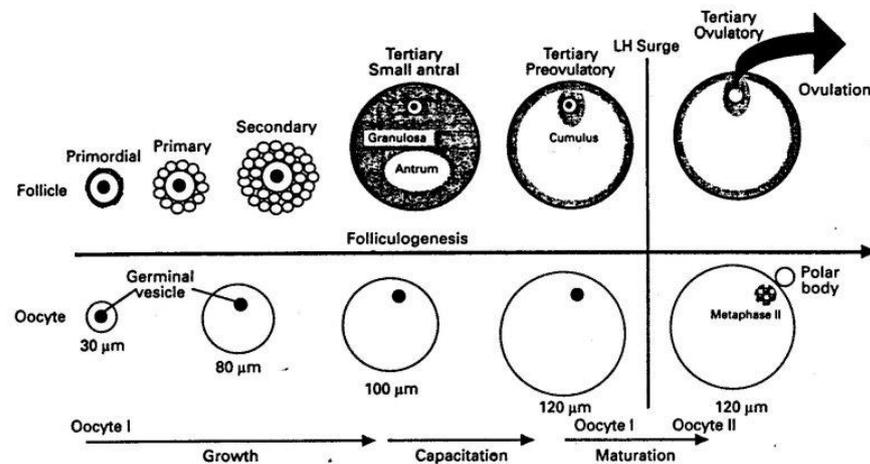
### C/ maturation

Elle concerne surtout l'ovocyte. Cette phase représente l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte de l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, à assurer la formation du pronucléaire paternel et

maternel et à permettre, grâce à ses réserves (ARNm, ribosomes, protéines élaborés pendant la phase de croissance), le début du développement embryonnaire. Elle est induite par le pic ovulatoire.



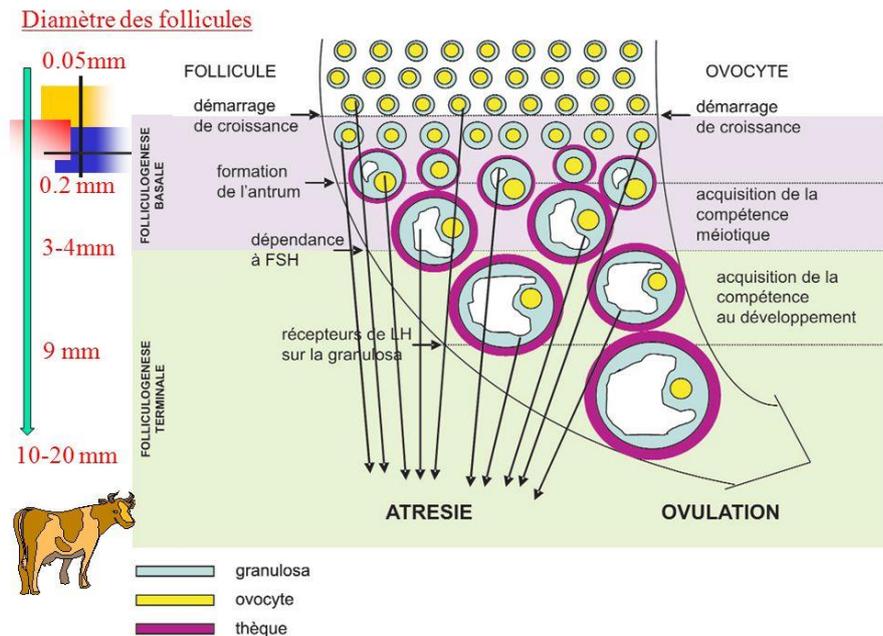
**Figure 6:** schéma générale de l'ovogenèse  
(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Ovogen%C3%A8se>)



**Figure 7 :** représentation schématique de la croissance de l'ovocyte en relation avec le stade de la folliculogénèse. (<http://acces.ens-lyon.fr/biotic/procreat/clonage/html/CompetenceOvocyte.htm>)

#### **4/L'atrésie folliculaire**

Encore appelée involution folliculaire, elle constitue le devenir de la majorité (99.9 %) des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle joue donc indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation. Sa durée, ses causes et son mécanisme sont encore mal connus faute d'une détection précoce et fiable. Cytologiquement, elle n'est identifiable que chez les follicules primaires, secondaires ou tertiaires par la mise en évidence de pycnose (grains de chromatine condensée) (HIRSHFIELD, 1989 ; ERICKSON, 1966a) ou d'apoptose (corps apoptotiques) dans les cellules de la granuleuse (HUGHES et GOROSPE, 1991) ou par l'identification de processus dégénératifs (opacification) au niveau de l'ovocyte (KRUIP et DIELEMAN, 1982). Biochimiquement, elle s'accompagne d'une augmentation des concentrations en enzymes lysosomales et en glycosaminoglycans ainsi que d'une diminution des concentrations en œstradiol (MARINA et al., 1991). La granuleuse disparaît progressivement et le cumulus se dissocie. L'ovocyte dégénéré reste la dernière cellule identifiable. Sur le plan fonctionnel, la distinction entre les follicules atrétiques ou non peut être réalisée par la détermination du rapport de leurs concentrations en œstradiol/progestérone (IRELAND et ROCHE, 1982), ou mieux encore, par le rapport de leurs concentrations en œstradiol/ocytocine (MEIDAN et al., 1992). La réceptivité à l'hormone LH des follicules de la vague préovulatoire est comparable à celle des follicules des vagues metoestrales ou dioestrales mais leur concentration en oestrogènes et androgènes est plus élevée (DRIANCOURT et al., 1990 ; IRELAND et ROCHE, 1982). Différentes études ont précisé le moment préférentiel d'apparition de l'atrésie (HIRSHFIELD, 1991 ; LUSSIER et al., 1987). Elles sont basées sur l'analyse du temps nécessaire pour doubler le nombre de cellules des granuleux visibles au travers de la plus grande coupe d'un follicule (notion de génération ou cycle cellulaire). Deux faits essentiels ont ainsi été identifiés. La durée des cycles diminue avec leur nombre.



**Figure 8** : schéma représentatif du recrutement, sélection, dominance et atresie folliculaire. [http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/2011/11/la\\_fonction\\_ovarienne-2016.pdf](http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/2011/11/la_fonction_ovarienne-2016.pdf)

## 5/Ovulation

L'ovulation est la libération d'un ou plusieurs gamètes femelles aptes à être fécondés après rupture d'un ou plusieurs follicules pré ovulatoires. La rupture du follicule ne se fait pas par augmentation de la pression interne mais grâce à la fragilisation des parois (MONTMEAS L., 2013).

Afin d'optimiser le moment de l'accouplement ou de l'insémination, il est important de déterminer le moment de l'ovulation par rapport aux comportements de chaleurs de la femelle, qui sont les seuls signes visibles pour l'éleveur. Chez la vache, l'ovulation a lieu 24 à 30 heures après le début de l'œstrus en moyenne. Donc en pratique, si l'éleveur observe une femelle en chaleurs le matin, il l'insémine le soir suivant (ou le matin suivant si les chaleurs sont le soir).

Après l'ovulation, le follicule subit des transformations morphologiques et fonctionnelles qui conduisent à l'apparition du corps jaune.

## **CHAPITRE II : LA SUPEROVULATION**

Les principaux facteurs limitant l'utilisation du transfert embryonnaire à ses débuts étaient la variabilité dans la réponse au traitement de SO et le temps ainsi que les efforts requis pour les traitements et la détection des chaleurs. Cependant, bien que la variabilité dans les réponses des femelles donneuses soit toujours présente, les évolutions des protocoles ont permis de s'affranchir de la nécessité de détecter les chaleurs, et ont permis d'inséminer une femelle à un temps fixé par le protocole (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

### **1) Le moment idéal pour appliquer le protocole de superovulation**

Pendant des années, les praticiens commençaient le protocole à la moitié du cycle de l'animal (8-12 jours après l'œstrus), de manière traditionnelle, car c'est à ce moment-là qu'a normalement lieu l'émergence de la deuxième vague folliculaire. Il a été démontré que la réponse au traitement était meilleure lorsque les injections de FSH commencent précisément au moment de l'émergence d'une vague folliculaire, plutôt qu'un ou deux jours plus tard. Il est donc nécessaire de synchroniser le moment de l'émergence de la vague chez les animaux sur lesquels le protocole de superovulation doit être appliqué (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012). En effet, plus de follicules sont recrutés et plus d'ovulations ont lieu quand le traitement débute la veille ou le jour de l'émergence d'une vague folliculaire (MAPLETOFT R. et al., 2002). Le praticien doit donc maîtriser le cycle de l'animal avant de mettre en place un protocole de superovulation (SO).

### **2) Les protocoles de superovulation**

Depuis l'apparition du commerce de transfert d'embryons bovins, les protocoles de traitements de SO sont en constante évolution avec l'objectif d'obtenir un grand nombre d'embryons viables pour chaque donneuse.

#### **a/Utilisation de l'« equine Chorionic Gonadotropin » (eCG)**

Anciennement nommée PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), l'eCG est extraite de sérum de jument et est utilisé pour provoquer une superovulation. Le principal inconvénient de l'eCG est sa double activité FSH-LH qui induit des réponses de superovulation moyennes (VAN SOOM A. et al., 2008).

Les protocoles traditionnels de superstimulation consistaient en une seule injection d'eCG. L'eCG est une molécule qui a une longue demi-vie (plus de 40 heures), ce qui représente un avantage certain au niveau pratique car une seule administration suffit pour induire une superstimulation de l'ovaire. Cependant, il y a un inconvénient non négligeable qui est que l'eCG entraîne une augmentation des follicules larges au moment de la collecte, ce qui affecte l'efficacité de la collecte et la qualité des embryons (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

## **b/Utilisation de la « Follicle Stimulating Hormone » (FSH)**

### **1) Le protocole standard**

Contrairement à l'eCG, la demi-vie de la FSH est bien plus courte, 5 heures seulement, ce qui nécessite des administrations fréquentes pour induire la superstimulation des ovaires. C'est pourquoi des injections intramusculaires biquotidiennes permettent de meilleures réponses que des injections quotidiennes. De plus, les injections sont réalisées à doses décroissantes tout le long du protocole (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012). Il est important de bien respecter les deux injections de FSH par jour et les horaires. En effet, une étude a montré qu'un retard de 6,5 heures pour la dernière injection de FSH supprimait la majeure partie de l'efficacité de la superstimulation (VOS P. et al., 2004).

#### **1-a) Les alternatives possibles au protocole standard**

##### **✓ Une administration quotidienne de FSH**

Une étude a montré l'influence de la voie d'administration de la FSH. En effet, lorsque l'on fait deux injections par jour, celles-ci sont réalisées par voie intramusculaire, alors que si on ne fait qu'une seule injection par voie intramusculaire on n'a pas de résultats satisfaisants. Cette étude a montré par contre que si on ne fait qu'une seule injection de FSH par jour mais par voie sous-cutanée, cela donnait des résultats sensiblement équivalents aux deux injections intramusculaires (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

De la même manière, les résultats d'une étude ont permis de montrer qu'une seule injection quotidienne de FSH diluée dans une solution d'acide hyaluronique (5 ou 10 mg/ml) permettait d'avoir un nombre d'embryons transférables semblable aux traditionnelles injections biquotidiennes (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

### ✓ **L'utilisation d'une solution de FSH pure**

Une comparaison a été faite entre deux groupes de génisses Simmental. Un groupe contrôle recevait 8 injections de Stimufol® sur 4 jours (protocole traditionnel). Dans le second groupe, 5 injections de Stimufol® étaient remplacées par 5 injections de solution pure en FSH. Les résultats montraient qu'il n'y avait pas de différences entre les deux groupes deux jours après l'IA concernant le nombre de follicules ovulés et le développement embryonnaire précoce. Mais sept jours après l'IA le nombre de blastocystes était plus faible dans le groupe ayant reçu de la FSH pure comparé au groupe contrôle. Ces résultats semblaient donc indiquer que l'utilisation de FSH pure pour la superovulation était moins favorable au développement embryonnaire précoce entre J2 et J7 (HAVLICEK V. et al., 2013). L'utilisation de FSH pure n'est donc pas la meilleure alternative et ne peut remplacer les produits commerciaux tels que le Stimufol®.

### ✓ **Une diminution de la fréquence d'administration de FSH**

Des recherches ont également évalué si le nombre d'injections de FSH pouvait être encore plus allégé dans le protocole de SO, afin de limiter les manipulations des animaux et les contraintes pour l'éleveur surtout en élevage allaitant. Un groupe contrôle, de race Blonde d'Aquitaine, a reçu une dose totale de 650 UI de FSH de manière dégressive sur quatre jours avec des injections biquotidiennes, alors que le groupe expérimental, de race Blonde d'Aquitaine également, a reçu cette même dose de 650 UI de FSH de la manière suivante : 162,5 UI en intramusculaire et 325 UI en sous-cutané (région rétro-scapulaire), et 48 heures plus tard 162,5 UI de nouveau en sous-cutanée dans la même région. Autre différence entre les deux groupes, le groupe contrôle recevait deux injections de 0,15 mg de prostaglandines 12h avant et au moment du retrait de l'implant CIDR® (dispositif intravaginal à base de progestérone), alors que le groupe expérimental n'en recevait qu'une de 0,15 mg au moment du retrait de l'implant CIDR®. Les deux groupes étaient inséminés de la même façon, et les embryons collectés 7 jours plus tard. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes, aussi bien pour le nombre total d'embryons collectés que pour le nombre d'embryons transférables (FUENTES S. and DE LA FUENTE J., 2010). Cette étude prouve qu'il peut être possible d'alléger le protocole de SO en diminuant le nombre d'injections de FSH, trois au lieu de huit, ce qui n'est pas négligeable surtout pour les éleveurs allaitant

## **2) Les protocoles d'optimisation à la superovulation**

Plusieurs études ont prouvé qu'il peut être utile de préparer les animaux au protocole de SO avec l'utilisation d'hormones.

### **a) Utilisation de progestérone**

Une méthode d'optimisation consiste en la pose d'un implant auriculaire de progestérone un à trois jours avant le commencement du protocole standard de SO. Les résultats indiquent que cette méthode est bénéfique car elle permet d'augmenter le taux de conception (76,2% contre 61,9%) et d'augmenter également le nombre d'embryons viables (3,7 contre 1,7) (MENARD D. P. et al., 2000). Une autre équipe de chercheurs français a également montré les effets bénéfiques d'un ajout de progestérone au protocole de SO, sur une durée légèrement plus longue. En effet, une supplémentation de 5 jours en progestérone débutant deux jours avant la première injection de FSH permettrait d'augmenter la production d'embryons en réponse à la SO. Ils ont aussi montré que la production embryonnaire est fortement affectée par des facteurs individuels, comme la parité, le rang de la collecte, et par l'origine génétique de la donneuse qui semble influencer principalement la réponse à la super stimulation (GOVIGNON A. et al., 2000).

### **b) Utilisation de FSH**

Pour améliorer la réponse à la superstimulation, de petites doses de FSH peuvent être administrées deux fois par jour durant les deux jours précédant le début du traitement de SO (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

### **c) Utilisation d'eCG**

Une étude préliminaire a cherché à savoir si l'ajout d'eCG avant le protocole de SO avait un effet quelconque sur la production embryonnaire de génisses. C'est au moment du retrait de l'implant de progestérone, servant à synchroniser les œstrus, qu'est injecté 300 UI d'eCG dans un groupe, et une solution saline dans le groupe contrôle, avant de poursuivre le schéma classique de SO. Les embryons sont collectés sept jours après l'IA, par lavage de l'utérus, et l'influence du traitement est évalué sur le nombre moyen total d'embryons (TOT), le nombre moyen d'embryons transférables (TRA), le nombre moyen d'embryons de qualité 1 (GR1), le nombre moyen d'embryons dégénérés (DG) et le nombre moyen d'ovocytes non fertilisés (UFO).

L'eCG semblerait augmenter la qualité des embryons, sans qu'aucune explication ne soit avancée. En effet, le nombre d'embryons de qualité 1 est plus important pour le groupe de génisses ayant reçu cette hormone. Les autres paramètres étudiés ne présentent pas de différence significative. Il est conclu que l'utilisation d'eCG durant le cycle avant la SO pourrait être un moyen d'améliorer la qualité des embryons produits par les génisses, mais le mécanisme d'action reste inconnu. D'autres études sont nécessaires pour connaître la dose optimale à utiliser (GOVIGNON A. et al., 2001).

Des études ont montré qu'une administration de 500 UI d'eCG tend à augmenter la réponse superovulatoire en race allaitante. De plus, chez les donneuses répondant faiblement habituellement, l'eCG permet d'augmenter la production d'embryons. La principale hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène serait que ce prétraitement avec de l'eCG engendrerait une augmentation du nombre de follicules recrutés dans la vague de croissance folliculaire (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

#### **d) Ablation manuelle des follicules**

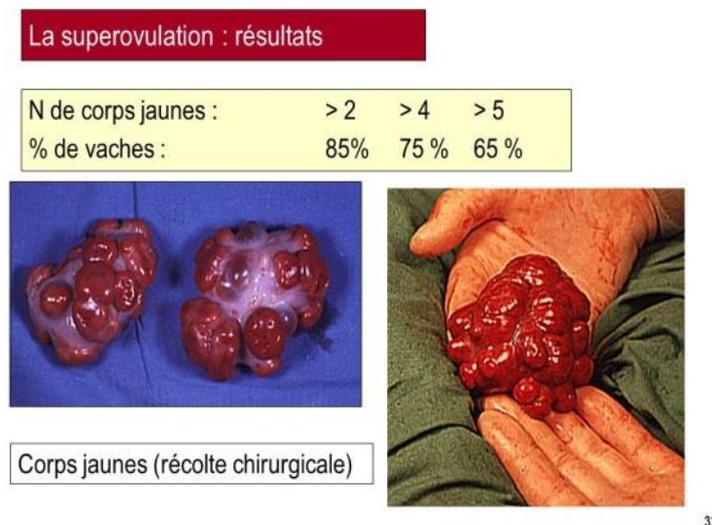
Il existe une méthode qui permet de synchroniser des femelles voire d'initier une superstimulation sans utiliser d'hormones.

Cette méthode consiste en l'élimination de l'effet inhibiteur du follicule dominant par une ablation échoguidée de ce follicule. Les études ont en effet montré qu'il suffit de supprimer les deux plus gros follicules présents pour supprimer les effets d'un follicule dominant. Ainsi, la superstimulation peut être initiée 1 à 2 jours plus tard, au moment de l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire. Bien que cette méthode ait prouvé son efficacité, son utilisation est plus appropriée dans des conditions de centre de production d'embryons car elle nécessite un certain équipement (échographe) et des personnes expérimentées (BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012).

#### **4) Variabilité des réponses des donneuses à la superovulation**

L'objectif des traitements de superovulation chez les bovins est d'obtenir un maximum d'embryons viables et transférables avec une forte probabilité d'induire une gestation chez les receveuses. Les réponses des animaux aux protocoles de superovulation ne sont pas constantes. En effet, la variabilité des réponses ovariennes peut être expliquée par plusieurs différences entre chaque animal traité :

- 1) Différences dans la préparation des gonadotropines.
- 2) Différences de lots des produits commerciaux.
- 3) Différences de doses utilisées.
- 4) Différences dans la durée du traitement.
- 5) Différences dans le moment de la mise en place du protocole par rapport au cycle de la femelle.
- 6) Des utilisations d'hormones supplémentaires, comme la pré-synchronisation. D'autres facteurs de variabilité sont également à considérer.
- 7) Ce sont les facteurs inhérents à l'animal et son environnement.



**Figure 9** : résultat de la superovulation sur le CJ

(<https://slideplayer.fr/slide/3405892/>) (MAPLETOFT R. et al., 2002)

## 5) L'insémination de la femelle donneuse

De manière général, l'insémination se fait de manière artificielle (IA) lorsque les chaleurs sont détectées ou lors du moment stipulé par le protocole de synchronisation. Selon le protocole de SO utilisé, l'IA peut ainsi se faire après observation des chaleurs ou à l'aveugle Collecte des embryons.

### CHAPITRE III : LA RECOLTE DES EMBRYONS

La récolte des embryons bovins par voie cervicale est réalisée en général à J7 (JO : jour de début de l'oestrus). Cette période de récolte est la résultante de plusieurs facteurs:

- la chronologie du développement embryonnaire étant bien connue comme chez les bovins (HUMBLOT, 1981 ; PICARD, 1989b ; LN. R.A. et U.N.C.E.LA., 1990), il est admis qu'à J5 (JO = jour du début de l'oestrus) tout embryon qui suit un développement

normal atteint la corne utérine (Tableau II) ;

- pour des raisons sanitaires, la législation (O.LE. et LE.T.S.) impose que l'embryon soit transféré avant sa sortie de la zone pellucide (à partir du jour après le début des chaleurs) ;

- à J7 les embryons libres dans l'utérus n'ont pas encore sécrété la substance Indispensable au maintien de la gestation (NIBART et BOUYSSOU, 1981)

Cette substance va pouvoir être sécrétée après le transfert définitif sur des receveuses.

Au cours des 30 dernières années, le taux de récupération des embryons au cours des collectes est d'environ 65-75%. Cela indique que les techniques de collecte seraient suboptimales et que des embryons restent dans le tractus génital de la donneuse après la collecte (WOLGAST T. et al., 2008). C'est pourquoi des recherches sont effectuées afin d'améliorer ce taux lors de la phase de collecte.

#### 1) Matériels

Matériel Il se composera des éléments suivants :

- **Sondes dilatatrice** : d'une longueur de 60° cm, possédant une extrémité conique de 4 mm au sommet et de 7 mm à la base, elle permet de préparer le cas échéant le col à la pénétration de la sonde de récolte.

- **Sonde de récolte** : deux types sont disponibles. La première à **trois voies** est la sonde IMV (Cassou).INRA. Elle assure un circuit continu du milieu de collecte. Une voie permet de gonfler le ballonnet. Une autre permet d'injecter le liquide de récolte et la troisième assure la récupération du liquide injecté dans la corne. Cette sonde se compose d'un corps rigide de 56 cm de long et de 6 mm de diamètre. Il est muni d'un bouchon d'étanchéité postérieur et d'un ballonnet en caoutchouc à son extrémité antérieure. Le tuyau de récupération a une longueur de 160 cm et un diamètre de 3 mm. Il est muni à son extrémité d'une bille métallique destinée à en faciliter la progression dans la corne utérine. Il présente à son extrémité proximale des graduations qui permettent de juger du degré de pénétration dans la corne utérine. Il est percé dans sa partie terminale d'orifices. La seconde sonde est à **deux voies** (sonde de Han ; modèle allemand). Une voie permet de gonfler le **ballonnet**, tandis que la seconde permet d'injecter et de récupérer en alternance le liquide de récolte des embryons. La sonde a une longueur de 70 cm et un diamètre de 6 à 7 mm. Elle est munie d'un **mandrin interne** pour la rendre plus rigide et faciliter ainsi sa mise en place dans l'utérus.
- **Seringues** : l'une de 20 ml pour gonfler le ballonnet et l'autre de 50 ml pour injecter le liquide de récolte.
- **Liquides de récolte** Il faut prévoir par récolte 1 litre environ (250 à 500 ml par corne utérine) de PBS (Phosphate Buffered Saline). Certains auteurs utilisent une solution de Bovine Serum Albumine (BSA) à 0.4 % ou du PBS additionné de sérum de veau foetal (FCS) à 2%. Ces liquides seront placés dans un flacon stérile et maintenu à température de 37 °C.( La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine Année 2008-2009 Prof. Ch. HANZEN)

## 2) Méthodologie de la collecte

### 2-a) Collecte des embryons par lavage des cornes utérines

Le jour de la collecte, les embryons sont récupérés grâce à un lavage de chaque corne utérine avec environ 500 ml de solution DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). Pour cela, une sonde 3 voies est utilisée. Cette sonde permet à l'aide d'une seringue d'aspirer de la solution DPBS puis de l'injecter dans la tubulure qui va à l'utérus, grâce à un système manuel d'occlusion des tubulures.

La sonde introduite par la vulve, est mise en place de manière trans-cervicale. En effet, son extrémité arrive au-delà du col utérin et est placée dans une corne utérine. Dans un deuxième temps, la sonde sera déplacée et placée dans l'autre corne. Pour une installation correcte, le technicien palpe l'utérus grâce à une palpation transrectale et peut ainsi guider la sonde. La sonde est mise en place dans l'utérus de manière stérile. Lorsque la sonde est en place, un ballonnet est gonflé afin de stabiliser le système.

Lorsque le système est bien en place, le lavage de la première corne utérine débute. Le liquide est envoyé dans l'utérus grâce à la sonde, sonde qui permet de récupérer ce liquide dans l'utérus.

Lorsque le liquide de collecte est récupéré, ce dernier passe par un filtre sur lequel sont récupérés les embryons. Une fois le lavage de la première corne utérine terminé, le pistolet est mis en place dans la seconde corne utérine, et la même opération est réalisée.

Ensuite, les embryons sont récupérés sur le filtre afin d'être évalués puis lavés. Des recherches sont menées actuellement sur la manière d'améliorer la récupération des embryons chez la femelle donneuse.

### **2-b) Utilisation d'un second lavage utérin**

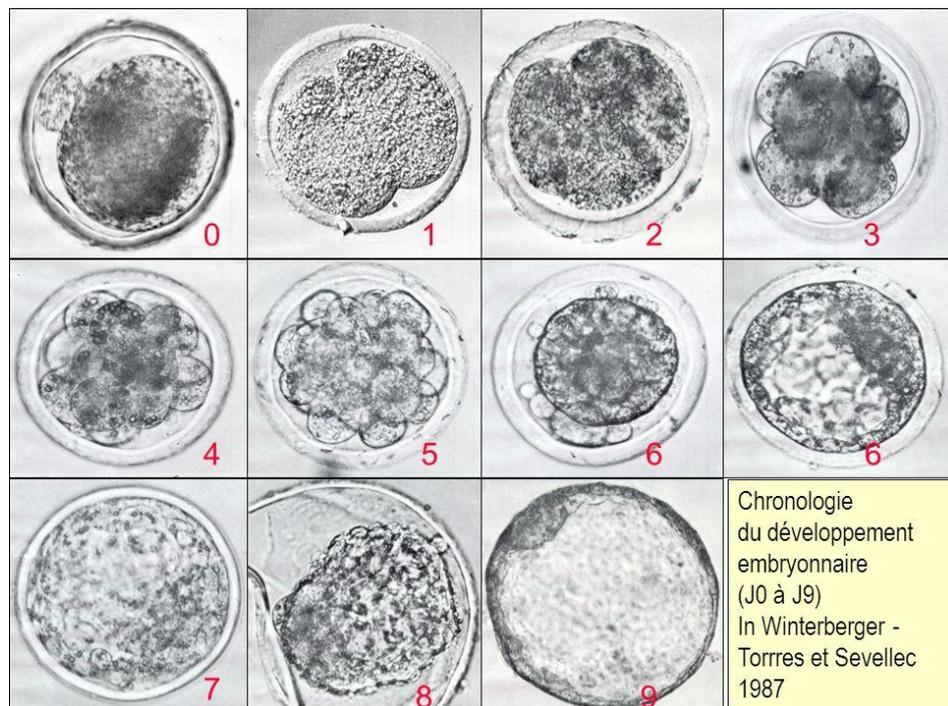
Les vaches qui présentent une très bonne réponse au traitement de SO semblent avoir des taux de récupération d'embryons augmentés après un double lavage, ce qui n'est pas le cas après un simple lavage. En effet, la technique du double lavage utérin augmente le taux de récupération d'embryons de 20%, et semble avoir un avantage certain surtout chez les donneuses avec les plus grands nombres de corps jaunes (BENDER R. W. et al., 2012).

Il semble même que des facteurs mécaniques, comme la marche, pourraient influencer de manière positive le nombre d'embryons récoltés avec le second lavage des cornes (LANDMAN B. et al., 2006). Ces découvertes mettent en évidence que les embryons ne sont pas récoltés en totalité par un lavage standard des cornes utérines.

### **3) Sélection des embryons viables : critères IETS**

Il existe des systèmes de classification standards décrivant le stade de développement embryonnaire et la qualité de l'embryon. La classification pour le stade de développement est

un système numérique gradué allant de « 1 » (ovocyte non-fertilisé ou embryon à une cellule) à « 9 » (blastocyste éclos) (ROBERTSON I. and NELSON R. E., 2010).

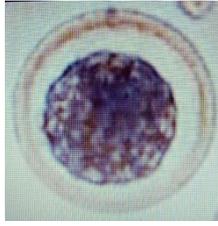


**Figure 10** : chronologie du développement embryonnaire j0-j9

(In Winterberger-Torres et Sevellec 1987)

Le système de classification de la qualité de l'embryon est lui aussi numérique, allant de 1 à 4 (ROBERTSON I. and NELSON R. E., 2010) :

- **Qualité 1** : qualité excellente ou bonne (Figure 11). La masse embryonnaire est sphérique et symétrique avec des blastomères individualisables uniformes en taille, couleur et densité. Les irrégularités devraient être relativement mineures, au moins 85% du matériel cellulaire doit être intact et l'embryon est viable. La zone pellucide doit être lisse et ne doit pas avoir de surfaces concaves qui pourraient favoriser une adhésion de l'embryon à la boîte de Pétri ou à la paillette.



**Figure11** : J6 du développement, Morula (stade 4),

Qualité 1 (WRIGHT J. M., 2010)

- **Qualité 2** : qualité acceptable (Figure 12). Des irrégularités de la masse embryonnaire sont modérées mais plus nombreuses. Ces irrégularités peuvent se situer au niveau de la forme de la masse embryonnaire ou au niveau de la taille, de la couleur et de la densité des cellules. Au moins 50% du matériel cellulaire est intact.



**Figure 12** : J6 du développement, Morula (stade 4),

Qualité 2 (WRIGHT J. M., 2010)

- **Qualité 3** : qualité pauvre (Figure13). Il y a présence d'irrégularités majeures dans la forme de la masse embryonnaire ou dans la taille, couleur et la densité des blastomères. Au moins 25% du matériel cellulaire est intact et l'embryon est viable.



**Figure 13** : J6 du développement, Morula (stade 4),

Qualité 3 (WRIGHT J. M., 2010)

- **Qualité 4** : embryon mort ou dégénéré. A ce stade, les embryons sont dégénérés, ou les embryons / ovocytes ne sont constitués que d'une cellule et sont donc non-viables

Il est reconnu que cette évaluation visuelle reste subjective et n'est pas une science exacte. De plus, d'autres facteurs interviennent comme les conditions environnementales, la santé de la receveuse et l'aptitude du technicien qui sont tout aussi importants que la qualité de l'embryon pour l'obtention d'une gestation après un transfert embryonnaire. Il existe plusieurs systèmes pour grader la qualité de l'embryon et certains systèmes sont plus sophistiqués que d'autres. Les personnes qualifiées qui graduent les embryons choisissent la méthode la plus appropriée en fonction de leur expérience. Généralement, seuls les embryons de qualité excellente ou bonne sont utilisés dans le commerce international.

De plus, il est important de grader la qualité d'un embryon, car cette qualité joue un rôle dans la réussite du transfert. Ainsi, en Finlande, les résultats de transferts d'embryons à l'état frais sont moins bons que les transferts d'embryons congelés. Cela peut être expliqué par le fait que 40% des embryons transférés à l'état frais sont des embryons de qualité II ou III, et le plus souvent également biopsies. De plus, la majorité des embryons congelés sont de qualité I et non biopsies. Or, la qualité de l'embryon et la réussite d'un transfert sont positivement corrélées, ce qui explique les résultats obtenus dans ce pays (LINDEBERG H. et al., 2008).

#### **4) Le transfert d'embryons frais**

Lorsque les embryons sont mis en place sur les receveuses aptes le même jour que la collecte, on parle de transfert d'embryons à l'état frais.

Le transfert de l'embryon se fait à l'aide de ce que l'on appelle une sonde, comme pour une insémination artificielle. L'objectif est de traverser le col avec cet outil sur lequel se

trouve la paillette, et d'implanter l'embryon dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune de la receveuse. La qualité des corps jaunes, et donc l'identification de la corne utérine qui recevra l'embryon doit être évalué au préalable afin de connaître le nombre de receveuses aptes à être gestantes.

Concernant l'étape de la mise en place de l'embryon, plusieurs paramètres influencent sa durée, et donc potentiellement la réussite d'une future gestation. En effet, si la durée de la mise en place à travers le col est supérieure à 60 secondes, le taux de gestation est de 20,5%, alors qu'il est de 56,7% si cette durée est inférieure à 60 secondes (JASKOWSKI J. M. and URBANIAK K., 2006).

Autre facteur important, la réalisation ou non d'une anesthésie épidurale influe sur la durée de la mise en place. Lorsqu'une telle anesthésie est réalisée, le transfert dure 58,6 secondes contre 42,1 secondes dans le cas contraire. Néanmoins, la durée reste en moyenne inférieure à 60 secondes et le confort de l'animal est plus grand. Le matériel utilisé pour la transplantation, plus précisément le type de sonde, a également une influence non négligeable. Il a été comparé un matériel plaqué or avec un matériel uniquement fait de métal non plaqué. Les transferts réalisés à l'aide de la sonde plaquée or étaient en moyenne 20 secondes plus rapides. (JASKOWSKI J. M. and URBANIAK K., 2006).

Comme la mise en place de l'embryon est réalisée à l'aide d'une sonde passée au travers du col de l'utérus, on peut être amené à penser que cela provoque une inflammation. C'est pourquoi l'utilisation d'un anti-inflammatoire a été étudiée. Une étude a montré que l'utilisation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien, en l'occurrence la Flunixin-Méglumine à la dose de 830 mg par animal en intramusculaire immédiatement après le transfert embryonnaire, n'induit pas d'amélioration statistiquement significative des taux de gestation (CZELADKO J. et al., 2009).

Outre la présence d'un corps jaune de bonne qualité chez une receveuse, d'autres paramètres peuvent entrer en compte afin de choisir la potentielle meilleure receveuse pour augmenter les chances d'obtenir une gestation.

## LA PARTIE EXPERIMENTAL

Chez les bovins, le transfert d'embryons s'est développé sur une base commerciale, le principal facteur qui détermine le nombre d'embryons transférables est le nombre d'ovulations induites, L'étude suivante est basée sur le choix du protocole de superovulation abrégée avec méthode de récolte classique.

### 1- Objectif de l'étude

Utiliser un protocole de superovulation simplifié dans le but de vérifier son efficacité, comparer les résultats obtenus à ceux cités par certains auteurs en utilisant un protocole classique.

Apprendre à maîtriser le cycle de la vache, palpation rectale des structures de l'appareil génitale avant et après superovulation, l'observation des chaleurs, insémination artificielle et connaître la méthodologie de la récolte ainsi la technique d'observation au microscope et classification des embryons en suivant les critères.

### 2- Matériels et méthodes

#### ▪ Les étapes à suivre

- choix de la donneuse par examen général et spécial
- Le suivie de la synchronicité des chaleurs
- Traitement de superovulation
- La récolte
- Observation et classification au microscope

#### ▪ Zone d'étude et période de travail

Le travail a été réalisé au niveau de la station expérimental de l'institut de science vétérinaire de l'université Blida 1, qui a été entamé le vingt février de l'année 2018 jusqu'au vingt-sept juin de l'année 2019. La ville est située à 47 km au sud-ouest d'Alger, et à 26 km au nord-est de Médéa, sur la bordure Sud de la plaine de la Mitidja à 22 km de la mer. La ville de Blida est située au pied du versant nord de l'Atlas blidéen et au Sud de la plaine de la Mitidja, à une altitude de 260 mètres. Elle est localisée sur un cône de déjection construit par l'oued Roumman-El Kebir. L'Atlas tellien protège la ville des vents secs du sud en provenance des Hauts Plateaux. Cette protection permet à la région de bénéficier d'un climat méditerranéen propice à l'agriculture.

▪ **Animaux :**

Deux vaches de race Holstein : une génisse âgée de deux ans ainsi une nullipare âgée de onze ans, elle héberge une stabulation entravé avec une bonne aération, alimentation à base de paille, concentré et prairie matin, l'attitude de l'animale était agressif et craintif.

Le choix des donneuses était basé sur le score qui était aux alentours de 2.75, un bassin avec une bonne conformation symétrique, absence de toute pathologie ; locomotrice, génitale, métabolique, des vaches cycliques.

**A) Matériels :**

**1- Contention de la vache**

- Pince mouchette
- Corde
- Le travail
- Gants de fouiller rectal
- Anesthésie épidural : lidocaïne 20 mg/ml



**Photo n°1 (personnel) : injection de la lidocaïne**

**2- Examen clinique de la vache**

- Stéthoscope
- Thermomètre

### 3- Matériels utilisés dans la super ovulation

- Les gants gynécologiques
- Alcool et coton
- Seringue 5 cc
- Hormone : FSH « Stimufol » solution injectable :

❖ on a utilisé FSH à 20% ; flacon de lyophilisat injectable de follitropine porcine et lutropine porcine (500 microgramme pFSH soit 0.05mg pour 100 microgramme soit 0.01mg PLH) et flacon de 10ml de solvant SMP (chlorure de sodium 90mg , parahydroxybenzoate de méthyle 10mg , parahydroxybenzoate de propyle 2.5mg ,eau pour préparations injectable,q.s.p 10ml)



Photo n°2 (personnel) : le produit de stimufol.

### 4- Préparation et nettoyage de la région périnéale

- Seau
- alcool ou Bétadine
- Eau
- Eponge

### 5- La récolte des embryons

- Des gants gynécologiques
- 4 seringues (1de 20 ml pour gonfler le ballonnet, 2 de 50ml pour injecter le liquide de récolte)
- Sonde de récolte : de Foley à deux voies ( une voie permet de gonfler le ballonnet , la seconde permet d'injecter et récupérer en alternance le liquide de récolte des embryons . Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre plus rigide).

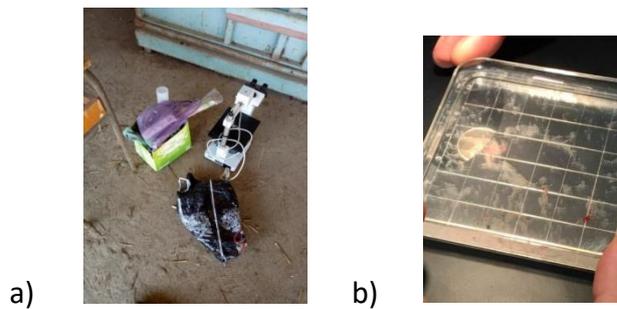
- Dilatateur cervical
- Filtre à embryon
- Bouteille en verre
- Chemise sanitaire
- Liquide de récolte : PBS (phosphat buffered saline) : (heps, D-glucose, Na-pyruvate, kanamycin, gentamicine) conservé 4°C à 20°C
- Le sérum physiologique



**Photo n°3(personnel):** A) la génisse utilisée B) matériels utilisés (gants à fouille rectale, bouteille en verre pour verser le liquide récolté, alcool pour désinfection, seringues, PBS, chemise, xylocaïne) C) seringues de 20 et 50 ml, BPS, sonde dilatatrice et sonde de récolte) D) réchauffer le liquide de récolte « BPS ».

### 6- Observation des embryons

- Microscope optique ; utilisation des objectifs \*40 et \*100
- Boite de pétrie avec quadrillage



**Photo n° 4 (personnel) :** a) le microscope optique b) boîte avec quadrillage pour l'observation du liquide récolté.

**B) Méthodologie du travail**

- **Suivie des chaleurs :**

**Table1 :** le suivie des trois cycles des vaches

Les vaches	Date des chaleurs		
Vache 1	23/0/12/2	14/01/201	05/02/201
	018	8	8
Vache 2	19/02/201	11/03/201	01/04/201
	9	9	9
Vache 3	28/02/201	/	/
	9		

- **La superovulation**

- désinfecter et injecter en IM sur l'encolure de pFSH selon le protocole observé dans le tableau 2 pendant 3 jours successifs.

- Injecter des Prostaglandines (PGF2 $\alpha$ ) le troisième jour du traitement pour détruire le corps jaune existant et déclencher les mécanismes hormonaux précurseurs de l'ovulation.

- **L'insémination artificielle**

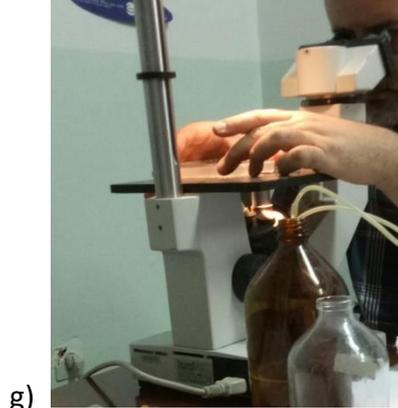


**Photo n°5 (personnel) : l'insémination artificielle**

- **La récolte (corne puis l'autre corne) de durée : 50min**

Le prélèvement des embryons est effectué 7 jours après la fécondation :

- l'animal placé dans un travail de contention, réaliser une épidurale 5ml de xylocaïne à 2%.
- le rectum est débarrassé des matières fécales et la région vulvaire lavée et désinfectée
- la sonde de récolte rincée au moyen de sérum physiologique puis recouverte d'une chemise sanitaire, elle est introduite dans le vagin en longeant le plafond pour éviter le méat urinaire, une fois arrivée au col, la chemise sanitaire rompu.
- Introduire la sonde à l'aide du mandrin dans l'une des cornes
- gonfler le ballonnet pour fixer la sonde
- Enlever le mandrin, Une totalité de 250 ml de PSB injecté pour chaque corne.
- Renverser dans le filtre d'embryon et la bouteille en verre le liquide récolté.
- Injection de la PGF2alpha et antibiotique pour compléter l'intervention.



**Photo n° 6 (personnel) :** a) contention de la vache dans le travail b) réalisation d'une épidurale c) introduction d'une sonde dilatatrice d) introduction d'une sonde de récolte d) injection et récolte du liquide (lavage des cornes) e) dépôt des embryons pour décanter pendant 20 à 30 min. f) siphonage du surnageant g) observation au microscope optique du fonds qui a été mis dans des boîtes de Pétri quadrillées.

- **classification des embryons**

A l'aide d'une loupe binoculaire (x4 à x100) pour déterminer le stade de développement de l'embryon.



**Photo n°7(personnel) :** composition de PGF2a

- **Protocole simplifié de la super ovulation utilisé**

**Table 2 :** le protocole simplifié de superovulation utilisé

Le jour	L'objectif
J0 : lundi le 05/02/2018	Chaleurs de référence
J10 : jeudi 15/02/2018	- FSH/LH
J11 : vendredi 16/02/2018	- FSH/LH
J12 : samedi 17/02/2018	- FSH/LH - PG
J13 : (j0) dimanche 18/02/2018	Observation des chaleurs de superovulation
J14 : (j1) lundi 19/02/2018	Insémination artificiel
J21 : (j7) lundi 20/02/2018	Récolte et observation des embryons

**Chaleur de référence** : le traitement de superovulation dans la phase pro œstrus c'est-à-dire 9 à 15 jours après une chaleur dite de référence, qui a été observée et une fois induite par la synchronisation de prostaglandine à 11 jour d'intervalle.

**Chaleur de superovulation** : obtenue par l'injection unique d'une prostaglandine après le début du traitement de PfsH.

**Table3** : traitement de la superovulation .

J0 : vendredi 01/04/2019	Chaleur de référence
J10 : dimanche 10/04/2019	- FSH/LH
J11 : lundi 11/04/2019	- FSH/LH
J12 : mardi 12/04/2019	- FSH/LH

**Table4**: traitement de superovulation au moyen de synchronisation avec la PGF2a

Le jeudi 16/05/2019	1 injection de la PG
Le lundi 27/05/2019	2 injections de la PG
Le dimanche 02/06/2019	Observation des chaleurs
Le samedi 15/06/2019	- injection FSH à 13h
Le dimanche 16/06/2019	- injection FSH à 10h
Le lundi 17/06/2019	- injection FSH à 9H et la PG
Le Mardi 18/06/2019	- observation des chaleurs a 9.30h
Le mercredi 19/06/2019	- IA à 13h
Le jeudi 27/06/2019	- La récolte à 15 h

### 3) Résultat

**Table5** : intervalle chaleur-PG sur 48h

<b>Vache /intervalle chaleur-PG</b>	<b>&lt;48h</b>	<b>&gt;48h</b>
<b>Vache1</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Vache2</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Vache3</b>	<b>+</b>	<b>-</b>

- L'injection de la PG a été faite à 9h du matin, l'observation des chaleurs le jour qui suit à 9.30h du matin cela veut dire que l'intervalle PG-chaleur était de 24h (très tôt).

**Table 6** : nombre de corps jaunes par ovaires après superovulation

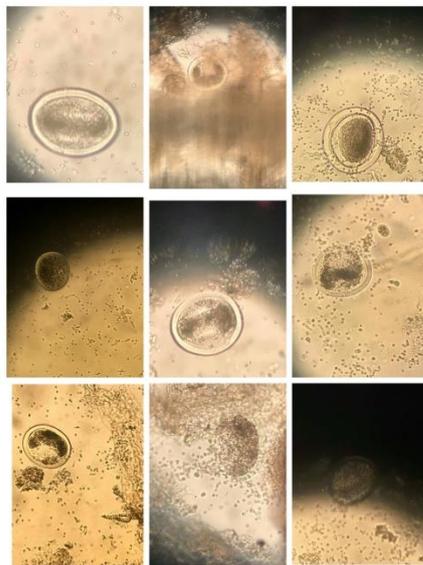
<b>CJ</b>	<b>Vache/nombre de</b>	<b>Ovaire Droit</b>	<b>Ovaire gauche</b>
	<b>Vache1</b>	<b>13</b>	<b>12</b>
	<b>Vache2</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
	<b>Vache3</b>	<b>6</b>	<b>5</b>

- Le nombre de CJ palpés varie d'une vache à l'autre :
  - Le traitement de superovulation a été pratiqué au 10jr après chaleurs de référence à 24h d'intervalle respecté.
  - Le traitement de superovulation a été pratiqué au 10jr après chaleurs de référence à 24h d'intervalle respecté mais pas d'utilisation de la PG le dernier jour du traitement.
  - Le traitement de superovulation a été pratiqué au 13jr après chaleurs de référence.

**Table7** : nombres et classification d'embryons récoltés

Vache/embryons récoltés	Embryons transférables	Embryons non transférables	Les non fécondés
Vache1	0	0	4
Vache2	/	/	/
Vache3	0	0	10

- Il n'y a eu aucuns embryons récoltés que des non fécondés à des taux variables.



**Photo n° 8 (personnel):** différents ovocytes non fécondés

#### **4) discussion**

##### **I. Traitements de superovulation**

La réponse au stimulus est interprétée selon les paramètres suivants :

###### **1- Intervalle PG-chaueur**

On a obtenu des chaleurs précoces car L'intervalle entre l'injection de prostaglandine et l'observation des chaleurs était de 24h, par conséquent des ovulation prématuré et vu qu'une seule insémination artificielle a été réalisé 28h après début de chaleurs ce qui peut expliquer l'une des raison de la non fécondation des ovocytes et donc l'obtention que des non fécondés lors de la récolte.

D'après les auteurs :

L'œstrus apparaît 35 à 48 heures après l'injection d'une prostaglandine soit environ 24 heures plus tôt que l'œstrus ainsi induit chez des animaux non superovulés. Ainsi, le début des chaleurs de superovulation est observé en moyenne 36 à 44 heures après l'injection d'une PGF suite à celle de PMSG et entre 33 et 48 heures si la superovulation a été induite au moyen de pFSH (Ponsart et Humblot 2002 In Livre des Prostaglandines)

La date de réalisation de l'injection de PG est importante puisqu'elle conditionnera le moment de l'IA., La plupart des protocoles prévoient 2 IA à réaliser respectivement à 12H (plus ou moins 2 à 3 heures) après le début des chaleurs observées et 24H. Si une seule IA est réalisée (dose du taureau chère), celle-ci est à réaliser dans la mesure du possible entre 17 et 19H après le début des chaleurs.

La dose de prostaglandine injectée est sans influence sur la vitesse de la lutéolyse. L'effet lutéolytique est donc comparable chez les femelles superovulées et non superovulées et ne dépend ni de la prostaglandine ni de la dose injectée. En phase œstrale proprement dite, la progestéronémie est supérieure à celle observée chez des animaux non superovulés. Elle n'est pas imputable à une lutéolyse incomplète mais résulte du fait que les follicules qui se sont développés en grand nombre sécrètent toujours un peu de progestérone, certains d'entre eux se sont par ailleurs en partie lutéinisés sous l'effet de la composante LH des hormones de superovulation. Une progestéronémie excessive pourrait être liée à des ovulations prématurées, phénomène plus souvent rencontré chez les génisses (HANZEN 2008)

## **2- Nombre de CJ**

On a pu obtenir 25, 18,11CJ successivement sur trois génisses expérimentées donc une bonne réponse au traitement « stimufol » à trois injections à faible doses.

D'après l'auteur (COLLEAU et al. 1998). On estime d'une manière générale que 85 % des donneuses répondent à un traitement de superovulation c'est-à-dire présentent plus de deux corps jaunes. 75 % présentent plus de 4 corps jaunes et 65 % en ont plus de 5. Le nombre de corps jaunes peut aisément être estimé après abattage de l'animal. Par endoscopie, la corrélation est de 0.89 et de 0.6 quand le diagnostic est réalisé par palpation manuelle des ovaires. On estime à 7.8 le nombre total moyen d'embryon produit après superovulation. Le nombre moyen d'embryons transférables est de 5.6 soit 72 %, 71 % étant de qualité 1 et 29 % de qualité 2.

### **II- Nombre d'embryons**

Aucuns embryons transférables et non transférables obtenu on a eu que des non fécondés qui sont donc éliminés alors que normalement selon HANZEN ;

Le nombre moyen d'embryons transférables a été respectivement de 4.6 et de 3.7. Le nombre moyen de lactations des animaux récoltés a été de 2.5. 93 % des récoltes ont concerné des vaches primipares (20 %) ou pluripares (73 %). Le nombre moyen d'embryons transférables obtenu s'est avéré supérieur pour les vaches en 2ème (4.6) voire 3ème lactation (4.9) que pour les génisses (4.1), primipares (4.1) ou les vaches plus âgées (3.8 à 4.8). L'intervalle moyen entre les récoltes a été de 111 jours. (HANZEN 2008-2009)

## 5) Conclusion

Dans notre étude la réponse au traitement de superovulation par un protocole simplifié à donner de bon résultat de point de vu de nombre CJ obtenu, en revanche le nombre d'embryons récoltés était nul. Plusieurs obstacle rencontré durant le travail, à savoir la non coopération des éleveurs et difficulté de détection des chaleurs. Les génisses avec entretien médiocre, alimentation faible, animaux mal traités et stressés, animaux d'expérimentation pour les étudiant qui peuvent tous palper ce qui a induit des pathologies génitales tel que pneumo vagin, endométrite.

Cette technique est intéressante de point de vue économique car elle permet de réduire le gaspillage folliculaire induit par l'atrésie, la sélection de la génétique et donc l'amélioration du troupeau, cependant elle nécessite un matériels adéquat qui est onéreux, des conditions d'élevage et d'entretien optimale. Cette technique reste un bon choix d'amélioration des performances d'élevage.

## LES REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Ann Zootech (1992)41, 341-346 ELSEVIER/INRA

Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, 144, 223-235.

BETTERIDGE et al., 1989 ; DRIANCOURT et al., 1991a ; RUSSE, 1983 ; ERICKSON, 1966b ; PETERS,1976 ; ERICKSON et al., 1976 ; CAHILL, 1981

Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, 144, 223-235.

Betteridge G.P.; Tallon J.L.; Staines M.P.; Buckley R.G.; Bryan H.L.; Stevenson LC. 1986. Internal report on the tensile properties of four forage grasses. 228 Physics and Engineering Laboratory, DSIR, Lower Hutt, Wellington. Easton H.S. 1989. Variability of leaf shear strength in perennial ryegrass. New Zealand journal of agricultural research 32~1-6

DRIANCOURT M.A., GOUGEON A., ROYERE D. et coll. La fonction ovarienne. Dans: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C, Levasseur MC. Eds. Ellipses INRA, 1991a, 273-298.

BARONE R., 2001

Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil urogénital. Foetus et ses annexes. Péritoine et topographie abdominale. 3ème édition. Vigot. 396 p.

BALL P. J. H. and PETERS A. R., 2004

The ovarian cycle. Reproduction in cattle, 3rd edition. Blackwell Science, pp. 23–46.

BENDER R. W. et al., 2012

BENDER R. W., HACKBART K. S., CARVALHO P. D., SANDOVAL G. B., SOUZA A. H., DRESCH A. R., VIEIRA L. M., GUENTHER J. N., WILTBANK M. C. Use of double-flush technique to improve embryo recovery results in superovulated high producing dairy cows. Proceeding du 28ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, SaintMalo (France), p. 106. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aeteproceedings-2012/file> [Consulté le 102/02/2019]

BO G. A. and MAPLETOFT R. J., 2012

Recent advances in the control of follicular development and superovulation protocols in cattle. Proceeding du 28ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France), pp. 57–68. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aeteproceedings-2012/file> [Consulté le 02/02/2019]

COLLEAU et al. 1998) Colleau J.J., Heyman Y., Renard J.P., 1998. INRA Prod. Anim., 11, 41-

CZELADKO J. et al., 2009.

CZELADKO J., ZNANIECKI R., JACKOWSKA M., BUKOWSKA D., OLECHNOWICZ J., JASKOWSKI J. M. Does Flunixin meglumin change the relation between pregnancy rate and a time of passage the transfer gun through uterus cervix into the place of embryo deposition in recipient heifers ? Proceeding du 25ème colloque de l'AETE, 11-12 septembre 2009, Poznan (Pologne), p. 156. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/82-aeteproceedings-2009/file> [Consulté le 02/02/2019]

DONALDSON et HANSEL, 1968 ; CHOUDHARY et al., 1968; MARION et al., 1968 ; DUFOUR et al., 1972 ; SPICER et ECHTERKAMP, 1986

HANSEL W. Cystic corpora lutea en normal and cystic Graafian follicles in the cow. Austr.Vet.J.,1968, 44, 304-308

Derivaux et Ectors, 1986

Physiologie de la Reproduction animale TOME 1 (de 3)- 187 pages

DRIANCOURT et al., 1990 ; IRELAND et ROCHE 1982

DRIANCOURT M.A., BODIN L., BOOMAROV O., THIMONNIER J ., ELSEN J.M. Number of mature follicles ovulating after a challenge of human chorionic gonadotrophin in different breeds of sheep at different physiological stages. J.Anim.Sci.,1990, 68, 719-724.

ERICKSON 1966a ; RUSSE, 1983 ; WANDJI et al., 1992

Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. J.Reprod.Fert.,1966a, 10, 97-105.

ERICKSON , 1966b

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

FORTUNE, 1994

Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol.Reprod.*,1994, 50, 225- 232.

GINTHER et al. 1989a, 1989d

GINTHER O.J., KASTELIC J.P. , KNOFF L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim.Reprod.Sci.*,1989a, 20, 187-200.

GOVIGNON A. et al., 2000

GOVIGNON A., ROHOU A., PONSART C., DELCROIX P., HUMBLLOT P. Sources of variation of embryo production after superovulation in prim holstein dairy cows. Proceeding du 16ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2009, Santander (Espagne), p. 158. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aeteproceedings-2000/file> [Consulté le 02/02/2019]

GOVIGNON A. et al., 2001

GOVIGNON A., PONSART C., DRIANCOURT M. A., FLORIN B., ROHOU A., HUMBLLOT P. PMSG priming during the cycle preceding superovulation improves embryo quality in dairy heifers. Proceeding du 17ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), p. 126. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aeteproceedings-2001/file> [Consulté le 02/02/2019]

HIRSHFIELD, 1989 ; ERICKSON 1966a

Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol.Reprod.*,1989, 40, 181-190

HUGHES et GOROSPE, 1991

Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 1991;129, 2415-2422.

HIRSHFIELD, 1991 ; LUSSIER et al., 1987

Development of follicles in the mammalian ovary. *Intern. Rev.Cytol.*1991, 124, 43- 101.

HANZEN2008-

2009 [http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R30 Embryons invivo 2009.pdf](http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R30_Embryons_invivo_2009.pdf)

HAVLICEK V. et al., 2013

HAVLICEK V., HOELKER M., TEFAYE D., BECKERS J. F., BREM G., BESENFELDER U. Effect of the modified superovulation protocol on the embryo development in cattle. Proceeding du 29ème colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2013, Istanbul (Turquie), p. 146. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/86-aeteproceedings-2013/file> [Consulté le 02/02/2019]

Hanzen 2008-2009

La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine Année 2008-2009

<http://www.medjouel.com/wp-content/uploads/2018/02/BA-TD-2-embryologie-appareil-g%C3%A9nital-de-la-femme.pdf> consulté le 04/01/2019.

<http://mdevmd.accesmad.org/mediatek/mod/page/view.php?id=10464>) Modifié le: mardi 15 décembre 2015, 08:44 pris le 04/01/2019

<https://www.dictionnaire-medical.net/term/0515,1,xhtml> consulté le 04/01/2019

[http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/la\\_fonction\\_ovarienne-2016.pdf](http://physiologie.envt.fr/wp-content/uploads/la_fonction_ovarienne-2016.pdf) consulté le 05/01/2019

<https://slideplayer.fr/slide/3403584/> consulté le 05/01/2019

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Ovogen%C3%A8se> consulté le 05/01/2019

<http://acces.ens-lyon.fr/biotic/procreat/clonage/html/CompetenceOvocyte.htm> [Consulté le 05/01/2019]

<http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/MEM13-7.dir/MEM13-7.pdf> [Consulté le 10/03/2019]

<https://slideplayer.fr/slide/3405892/> [consulté le 10/03/2019]

In Winterberger-Torres et Sevellec 1987 [consulté le 10/03/2019]

IRELAND ET ROCHE, 1982

Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormone, steroids in follicular fluid and gonadotrophin receptors. *Endocrinology*, 1982, 111:2077.

JASKOWSKI J. M. and URBANIAK K., 2006

Does the time needed to pass different transfer guns through the cervix and uterine body influence the pregnancy results in recipient heifers ? Proceeding du 22ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse), p. 128. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete proceedings-2006/file> [Consulté le 02/02/2019]

KRUIP et DIELEMAN, 1982

Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Develop.*, 1982, 22, 465-473.

LAIZEAU, 2003

Facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache laitière de race Montbéliarde. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 178 p

LANDMAN B. et al., 2006

LANDMAN B., RAMIREZ O., HAZELEGER W., MERTON S., MULLAART E. Optimization of flushing procedures for embryo recovery in dairy cattle. Proceeding du 22ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse), p. 138. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete proceedings-2006/file> [Consulté le 02/02/2019]

LINDEBERG H. et al., 2008

LINDEBERG H., KAIMIO I., HANNILA M. L. Influence of an embryo or the recipient on pregnancy rate after embryo transfer in dairy cattle. Proceeding du 24ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 196. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete proceedings-2008/file> [Consulté le 02/02/2019]

MONNIAUX et al., 1983 ; LUSSIER et al., 1987 ; HULSHOF et al., 1994

Aspects génétiques de la transplantation d'embryons chez les bovins, Journées d'information UNCEIA - ITEB. La reproduction des bovins, ITEB, pp. 95–104.

MARINA et al., 1991

MARIANA J.C., MONNIAUX D., DRIANCOURT M.A., MAULEON P. Folliculogenesis. In : Cupps P.T. (Eds.) : Reproduction in domestic animals. Academic Press, San Diego, 119-171.

MEIDAN et al., 1992

Biosynthesis and release of oxytocin by granulosa cells derived from preovulatory bovine follicles. Effects of forskolin and insulin-like growth factor-1. Biol. Reprod., 1992, 46, 715-720.

MALAFOSSE A., 1997

Intérêt de l'insémination artificielle et du transfert d'embryon dans l'amélioration génétique des bovins. Le Point Vétérinaire, 28 (185), pp. 9–16.

MENARD D. P. et al., 2000

MENARD D. P., MARTINEZ-BELLO J. D., IGLESIAS A. It is possible to increase the number of viable embryos using progestagen ear implants 1-3 days before standard superovulation with low response cows or low fertility cows. Poceeding du 16ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne), p. 186. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aeteproceedings-2000/file> [Consulté le 02/02/2019]

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire ; © Jean-Philippe Pelletier, 2013. Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire, 2000, 144, 223-235

MAPLETOFT R. et al., 2002

MAPLETOFT R., STEWARD K. B., ADAMS G. P. Superovulation in perspective. Proceeding du 18ème colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2002, Rolduc (Pays-Bas), pp. 120–128. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/75-aeteproceedings-2002/file> [Consulté le 02/02/2019]

NIBART et BOUYSSOU, 1981

Le transfert d'embryons chez les bovins *Ree. Méd. Vét.*, 1981 , 157 (1) : 71-87

Norris et Lopez, 2011

Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 2 **Page Count:** 240 1st Edition.

PINARD P., 1981

La transplantation d'embryons chez les bovins. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 294p

PASQUIER P., 1988

La transplantation embryonnaire en France dans l'espèce bovine. Le stage de formation IMVINRA. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 132 p.

PONSART et HUMBLOT 2002

In Livre des Prostaglandines

PONSART C. et al., 2006

PONSART C., MARQUANT LE GUIENNE B., GERARD O., GUYADER-JOLY C., FRERET S., HUMBLOT P. Reproduction assistée chez les bovins. Insémination et transfert d'embryons : perspectives. *Le point Vétérinaire*, 37 (spécial : Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et postpartum), pp. 26–31.

RAJAKOSKI, 1960 ; SWANSON et al., 1972 ; MATTON et al., 1981 ; IRELAND et ROCHE, 1987

The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinol.*, 1960, Suppl 52:1-68.

ROUILLER et al., 1989 ; GONG et al., 1993

ROUILLIER P., MATTON P., GUILBAULD L., GRASSO F., LUSSIER J.G. Influence of a dominant follicle on atresia and estradiol release by ovarian follicles during superovulation in cattle. *Theriogenology*, 1989, 33, 313 (Abstract).

SIROIS et FORTOUNE, 1990 ; KO et al., 1991

Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 1990, 127, 916-925.

KO J.C.H., KASTELIC J.P., DEL CAMPO M.R., GINTHER O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J.Reprod.Fert.*, 1991, 91, 511-519

STEVENSON J. F., 2007

Clinical reproductive physiology of the cow. Current therapy in large animal theriogenology, 2nd edition, Saunders Elsevier, pp. 258–269.

THIBIER M., 2014

The european embryo transfer industry in cattle - a challenge in 1984, a success in 2014 - and well supported and reported by the AETE. Proceeding du 30ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne), pp. 31–44. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/87-aeteproceedings-2014/file> [Consulté le 02/02/2019]

TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE [file:///C:/Users/DELL-10/Documents/Dr%20ADEL%20mémoire%20flash%20disque/pdf%20superovulation/Nouveau%20dossier%20superovulation2/La TE%20tres%20important.pdf](file:///C:/Users/DELL-10/Documents/Dr%20ADEL%20mémoire%20flash%20disque/pdf%20superovulation/Nouveau%20dossier%20superovulation2/La%20TE%20tres%20important.pdf)

VOS P. et al., 2004

VOS P., GROENENDAAL H., VAN GASTEL A., ALGRIANY O., DIELEMAN S. J. Impact of the accuracy of the time interval between FSH injections on follicular quality in superovulated cows. Proceeding du 20ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), p. 190. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/77-aeteproceedings-2004/file> [Consulté le 02/02/2019]

VAN SOOM A. et al., 2008

VAN SOOM A., IMBERECHTS H., DELAHAUT P. H., THIRY E., VAN ROY V., WALRAVENS K., ROELS S., SAEGERMAN C. Sanitary control in bovine embryo transfer : where practice meets science. Proceeding du 24ème colloque AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), pp. 95–116. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 02/02/2019]

WILMUT et WHITTUGHM et al. (1972)

Germplasm cryopreservation. Two basic techniques currently rule the field of oocyte and embryo

cryopreservation. The first to be developed was the slow freezing technique (Whittingham 1971,

Whittingham et al. 1972, Wilmut 1972, Willadsen et al ... 1998, Takagi et al. 2001)

WOLGAST T. et al., 2008

WOLGAST T., DETTERER J., REUSS W., SCHMIDT T., MEINECKE-TILLMANN S. Improvement of embryo recovery rates by modified flushing techniques in holstein cattle at a commercial embryo transfer station. Proceeding du 24ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 240. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 02/02/2019]

WRIGHT J. M., 2010

Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes (Appendix D), Manual of the International Transfer Society, 4th edition, pp. 131–140.