

UNIVERSITE "SAAD DAHLÈB" - BLIDA

Faculté agro-vétérinaire et biologie

Département des sciences vétérinaires

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de magister
en sciences vétérinaires

Option : Reproduction

Thème:

Etude comparative de deux extraits hypophysaires dans la
production d'embryons chez les bovins

Présenté par:

ADEL Djallal



Président

Examineur

Examineur

Examineur

Promoteur

Co-promoteur

GUETARNI D. MC (Université de Blida)

KAIDI R. MC (Université de Blida)

NIAR A. MC (Université de Tiaret)

FERROUK M. CC (Université de Blida)

LAFRI M. CC (Université de Blida)

TOUATI K. attaché scientifique auprès du doyen

(Faculté de médecine vétérinaire de Liège)

2003/2004



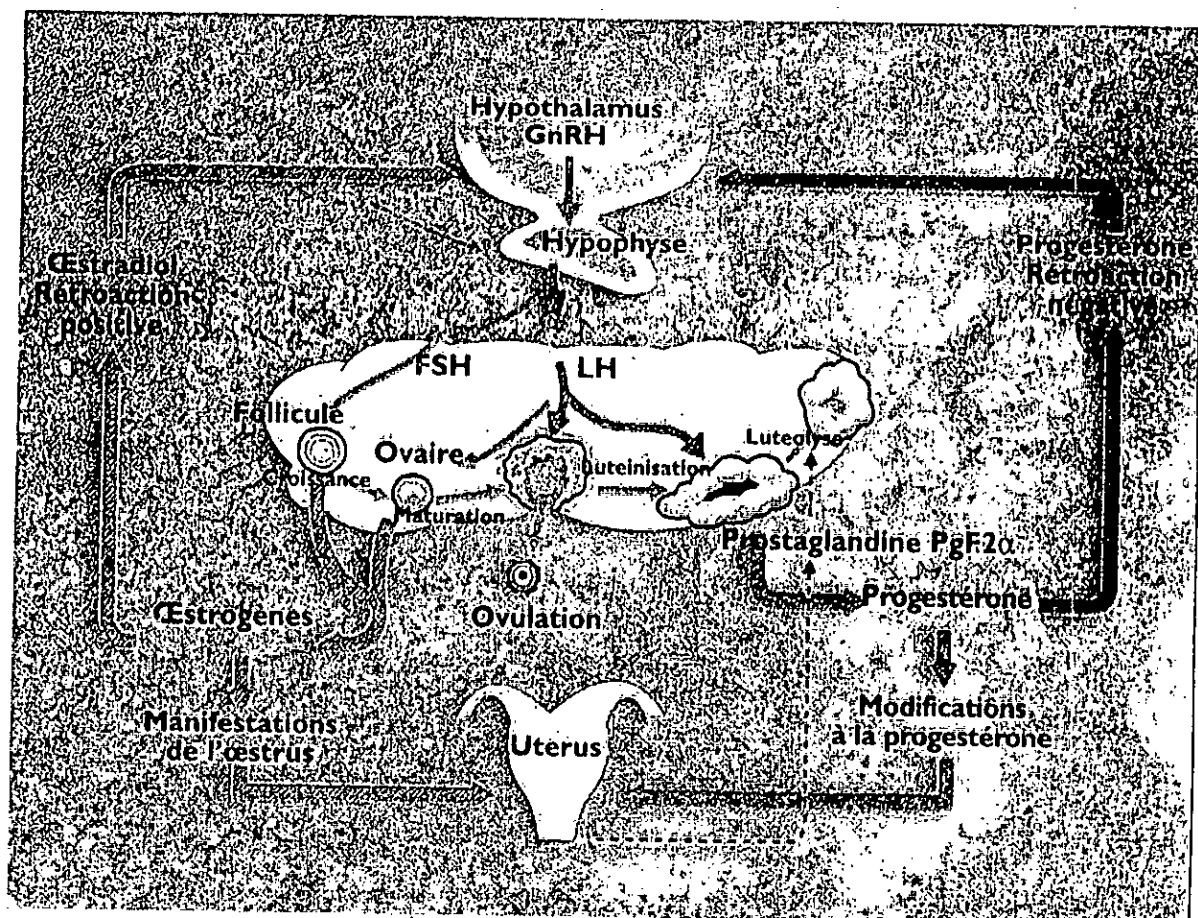


Figure 4 : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Peters et Ball, 1987)

II.4. Les différentes phases du cycle oestral chez la vache

II.4.1. Le proestrus

Correspond au développement sur l'ovaire d'un ou de plusieurs follicules, et à la sécrétion croissante d'oestrogènes, il dure en moyenne 3 jours. L'endomètre s'épaissit, se vascularise et se garni d'abondante glandes tubulaires. Dans le col, entrouvert, un mucus particulier (glairé cervicale) commence à se liquéfier.

II.4.2. L'oestrus

C'est les chaleurs, il correspond à la maturation d'un follicule et la sécrétion maximale d'oestrogènes et dure en moyenne 24h. Au niveau de l'utérus la congestion s'accroît, le col s'ouvre davantage et la glaire cervicale liquéfiée apparaît à l'extérieur des lèvres vulvaires. Les chaleurs se manifestent cliniquement par:

- une première phase où la vache mange peu, elle flaire les autres vaches et cherche à les chevaucher, sans se laisser chevaucher, la vulve est congestionnée et humide
- une deuxième phase est caractérisée par les mêmes manifestations mais accentuées, la vache beugle et cherche à chevaucher, et contrairement à la première phase elle se laisse chevaucher en s'immobilisant, on peut remarquer aussi à la traite une baisse de la production laitière.
- une dernière phase où la vache continue à flaire les autres vaches mais ne se laisse plus chevaucher.

II.4.3.Le metoestrus

Débuté par l'ovulation et se caractérise par la formation du corps jaune, il dure en moyenne 8 jours. Durant cette phase la muqueuse de l'endomètre est développée au maximum, les glandes utérines sécrètent un liquide blanchâtre: le lait utérin, le col se ferme, la glaire s'épaissit.

II.4.4.Le dioestrus

Une régression de l'endomètre est due à la chute du taux de progestérone, qui fait suite à la lyse du corps jaune sous l'influence de la prostaglandine F₂α, sécrétée par l'utérus. Le col se ferme hermétiquement grâce à un bouchon muqueux très épais.

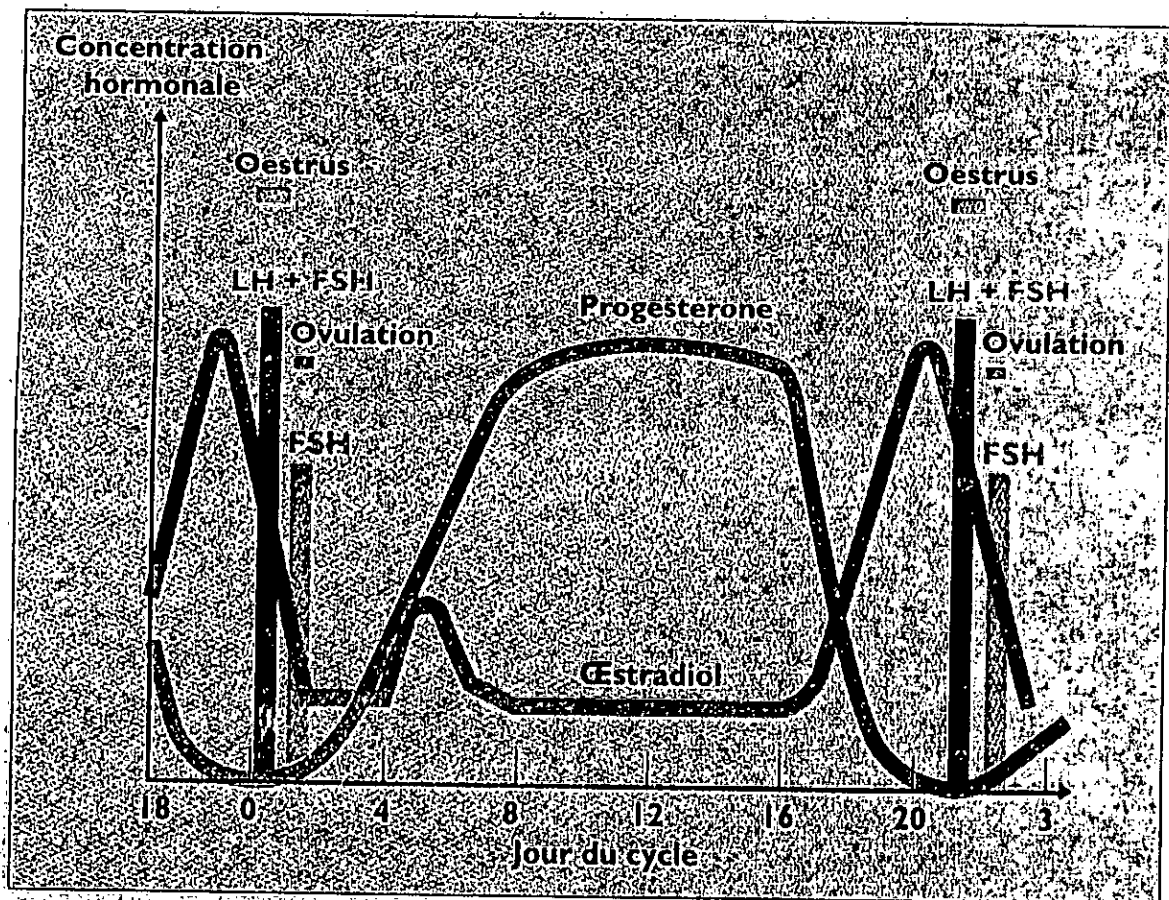


Figure 5 : Evolution des différentes hormones au cours du cycle chez la vache (Ennuyer 2000)

III. FECONDATION ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

III.1. Fécondation

Le spermatozoïde des mammifères n'est pas directement fécondant, un séjour de quelques heures dans les voies génitales femelles est nécessaire pour acquérir la fécondance. Au cours de ce laps de temps, il doit subir certains changements, qu'on qualifie de capacitation.

La capacitation consiste en un certains nombre de changements, aussi bien structurels que fonctionnels. Une fois débarrassé du plasma séminal, ces changements s'opèrent d'abord au niveau de la structure de la membrane plasmique, par perte de certaines protéines

membranaires et modification des autres structures de la membrane telle que les phospholipides et les radicaux glucidiques et glycoprotéiques.

D'autre part la mobilité du spermatozoïde capacité est fortement augmentée et sur le plan métabolique, une augmentation de l'activité respiratoire est observée grâce aux substrats énergétiques apportés par le milieu capacitant.

Une fois que les spermatozoïdes ont acquis la fécondance après capacitation, ils vont à la rencontre de l'ovule au niveau de la partie supérieure de l'oviducte où se produira, chez les mammifères, les différentes étapes de la fécondation. Chez la vache le cumulus entourant l'ovule pondu se disperse rapidement après l'ovulation ce qui permet aux spermatozoïdes d'être en contact direct avec la zone pellucide (Crozet, 1991). La fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide est assurée d'une part par la protéine zonale ZP3 de l'oeuf, et la glycosyltransférase du gamète mâle, la modification de l'activité de cette dernière empêche la fixation des gamètes.

Après la fixation des gamètes, des modifications membranaires se produisent au niveau du spermatozoïde, c'est ce qu'on appelle la réaction acrosomique et a pour conséquence de mettre à nu la membrane acrosomiale interne. Une fusion en plusieurs points de la membrane plasmique et la membrane acrosomiale externe donne lieu à la formation de plusieurs petites vésicules produisant des fenestrations permettant au contenu de l'acrosome d'être libéré. Le spermatozoïde se débarrasse de ces vésicules et pénètre obliquement la zone pellucide. Ce phénomène est facilité par la motilité spermatique et l'action de la hyaluronidase ainsi que l'acrosine qui est capable d'hydrolyser partiellement certaines glycoprotéines de la zone pellucide (Dunbar et al., 1985). Le spermatozoïde se retrouve ensuite dans l'espace périvitellin et entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte et la fusion des deux gamètes se produit, seul les spermatozoïdes ayant subi une réaction acrosomiale peuvent effectuer cette opération et ce grâce à la partie de la membrane plasmique restant au niveau du segment équatorial.

Une série de changements métaboliques et membranaires se produit suite à la fusion des gamètes conduisant à l'expulsion du deuxième globe polaire, l'exocytose des granules corticaux et quelques modifications corticales de l'ovocyte. Le noyau du spermatozoïde est incorporé dans le cytoplasme de l'œuf, les pronoyaux se forment et migrent vers le centre de l'ovocyte, le zygote est ainsi formé.

III.2. Développement embryonnaire précoce

L'ovulation survient chez la vache une trentaine d'heures environ après le début de l'œstrus. Il en résulte l'émission d'un ovocyte qui entre-temps a expulsé son premier globule polaire et se trouve bloqué au stade métaphase II. La rapidité d'expulsion (dans les 16 à 20 heures) de ce premier globule polaire sous l'effet de la LH semble, selon certains auteurs, déterminante pour le développement futur de l'embryon (Callessen et al, 1987; Kastelic et al, 1991).

Cette phase de maturation ovocytaire est atteinte in vitro par 85 % des ovocytes mis en culture. In vivo, le développement et la maturation des ovocytes sont complètement achevés dans les follicules (Callessen et al, 1997). La chronologie du développement de l'embryon bovin est rapportée dans le tableau n° 1 (Menezo et al, 1982).

Tableau n° 1: chronologie du développement de l'embryon bovin (Menezo et al, 1982).

Jours	Heures	Événements	Taille (µ)
0	0	Début des chaleurs	
0	7	Libération de LH (pendant 8 à 12 heures)	
0	15	Insémination	
1	30	Ovulation	160
1	35	Fécondation	
2	50	Stade deux cellules	160
2	55	Stade 4 cellules	160
3	75	Stade 8 cellules	
4	100	Stade 16-32 cellules	
5	120	Passage de l'embryon dans l'utérus	
6	130	Stade 30-64 cellules (morula)	
7	150	Stade jeune blastocyste	140-170
8	200	Stade blastocyste	170-210
10		Sortie de pellucide	150-350
11		Début de la phase d'élongation	150 à 3 cm
22		Premiers accolements entre le conceptus et l'endomètre	
35		Implantation	
40-50		Fin de l'organogenèse	

La fécondation et la pré-compaction se produisent naturellement dans l'oviducte (Gandolfi et al, 1993; Nancarrow et Hill, 1995). Dans l'utérus la compaction et la formation de blastocœle (Behboodi et al, 1995) des embryons fécondés sont réalisées dans un environnement spécifique.

L'environnement folliculaire de l'ovocyte est caractérisé d'une part, par un changement dans le rapport E2/P4 par la décharge de LH (Callesen, 1995) et, d'autre part par le micro environnement de l'oviducte qui est complexe et varié pendant le cycle œstral (Farin et al, 1995; Leese, 1988). Les glycoprotéines spécifiques de l'oviducte ont été trouvées associées à l'ovocyte et l'embryon bovin. Elles sont sécrétées par la région de l'ampoule pendant les premiers jours du cycle (Nancarrow et Hill, 1995).

D'autres facteurs comme la composition ionique et le pH varient aussi pendant la phase lutéale (Grippe et al, 1992; Leese, 1988). L'oviducte sécrète aussi des vitamines, des acides aminés, des acides gras et des facteurs de croissances (Ellington, 1995, Gandolfi et al, 1993, Kane et al, 1997). L'embryon entre dans la corne utérine au stade 16-32 cellules (Betteridge et Fléchon, 1988).

La compaction est induite au stade 32 cellules chez les embryons produits in vivo et in vitro (Betteridge et Fléchon, 1988, Holm et al, 1998). Au stade morula compactée le nombre de cellules observées chez les embryons in vivo est en moyenne de 92 cellules. (Betteridge et Fléchon, 1988). Le nombre de cellules de blastocystes produits in vitro est souvent inférieur et rarement supérieur à celui de blastocystes développés in vivo. Le nombre total de blastomères des embryons in vivo au stade blastocyste et blastocyste expansé à J7-8 est varié de 115 à 160 cellules (Assey, 1994; Betteridge et Fléchon, 1988).

III.2.1. Premières divisions cellulaires

L'ovocyte est pénétré par le spermatozoïde dans les deux heures suivant l'ovulation. Cette pénétration déclenche l'expulsion du second globule polaire, la reprise de la division cellulaire et la formation de deux blastomères 24 à 48 heures environ après la fécondation. In vitro, cette reprise du développement est quelque peu retardée, la première division cellulaire s'observant 44 heures en moyenne après la mise en contact des ovocytes avec des spermatozoïdes capables (Gandolfi et al, 1993; Kane et al, 1997).

Cette reprise de la division cellulaire est considérée comme critique pour le développement ultérieur de l'embryon. Ainsi, les embryons qui atteignent le stade 2 cellules

36 heures après la fécondation voire le stade 4 cellules, 48 heures après la fécondation ont davantage que les autres la possibilité d'atteindre le stade blastocyste.

Les divisions cellulaires ultérieures présentent deux caractéristiques: non seulement elles sont asynchrones, certaines apparaissant plus précocement que d'autres, mais elles aboutissent à la formation de deux populations cellulaires, l'une de petite taille et l'autre de grande taille. Les premières, résultant d'une division plus précoce, donnent naissance au bouton embryonnaire (ICM : Inner Cell Mass) et les secondes au trophoctoderme. Il est intéressant de noter le caractère totipotent et donc non différencié que présente les cellules jusqu'au stade 8 (Betteridge et Flechon, 1988).

Au 4^{ème} jour suivant l'insémination d'animaux superovulés, 72 % des embryons normaux et dégénérés récoltés après abattage sont au stade de 8 cellules. Au 5^{ème} et 6^{ème} jour de gestation 78 et 81 % d'entre eux sont respectivement au stade 16 cellules et plus de 16 (Dieleman et Blankenstein, 1984). En général, l'embryon passe dans l'utérus vers le 5^{ème} jour de gestation. Des récoltes séquencées réalisées après abattage de vaches superovulées ont permis de préciser que 4, 5 et 6 jours après l'insémination, respectivement 60 % des embryons sont dans l'oviducte et 80 et 91 % dans l'extrémité de la corne utérine (Gandolfi et al, 1993).

Ces divisions cellulaires aboutissent à la formation d'une morula (32-64 cellules) qui va être l'objet du phénomène de la compaction. La compaction consiste en la formation de zones de contact entre les blastomères aboutissant à la formation d'une cavité blastocoelique et à l'expansion du blastocyste. Celle-ci résulte de la présence d'un gradient ionique différent entre les parties internes et externes du blastocyste ce qui a pour résultat d'induire par osmose une accumulation de liquides dans la morula (Menezo et al, 1982).

Sa formation indique que l'embryon a franchi avec succès la phase de blocage observé in vitro au stade 8-16 cellules (4^{ème} division cellulaire) chez la plupart des embryons de mammifères à l'exception des primates et de la lapine (Menezo, 1982). Ce blocage implique que soient davantage maîtrisés in vitro les facteurs qui en seraient responsables et qui sont encore à ce jour imparfaitement connus.

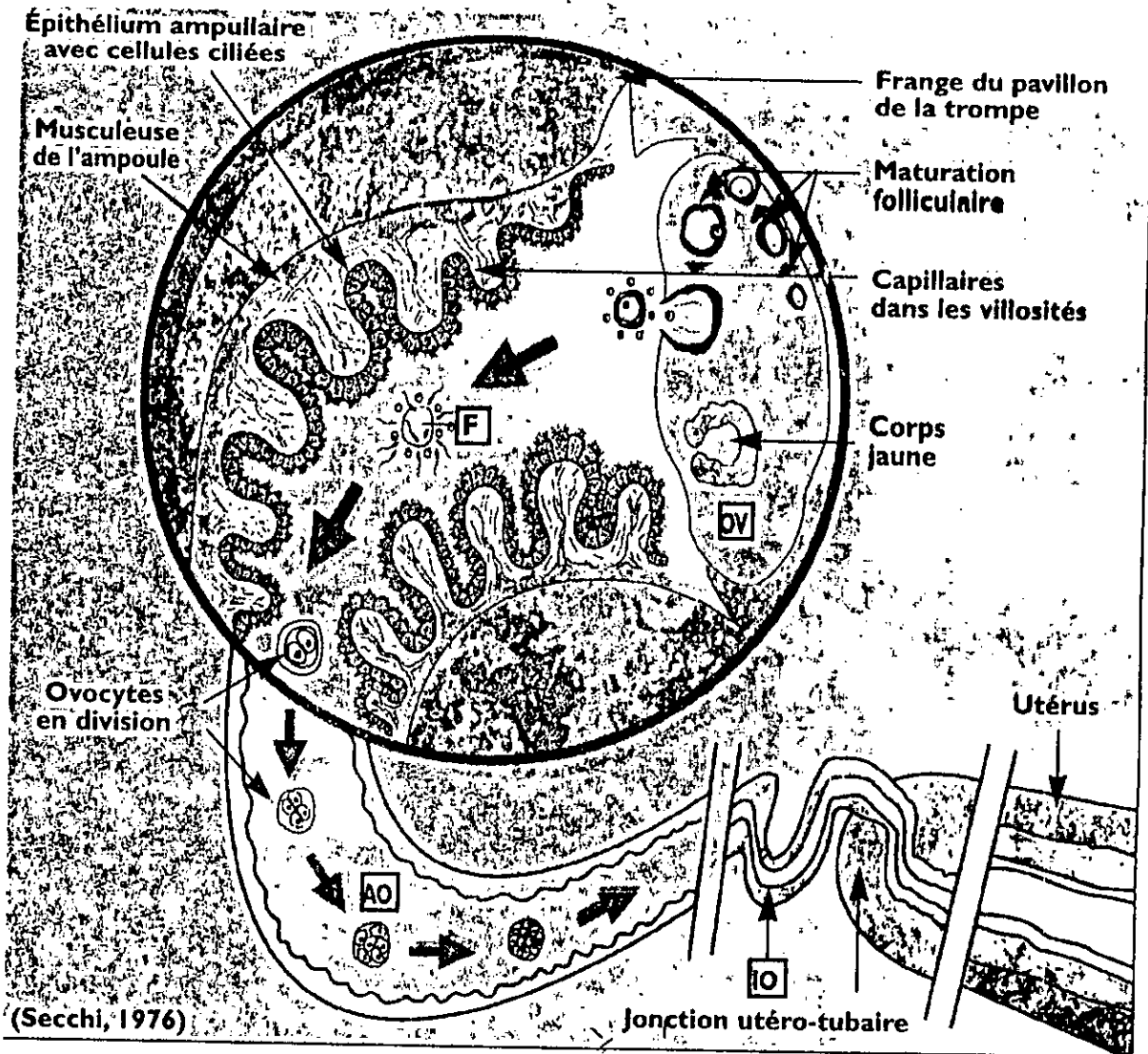


Figure 6 : Fécondation et premières divisions de l'embryon (Secchi, 1976)

III.2.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation.

Le jeune blastocyste comprend environ une centaine de cellules. Son diamètre est de 160μ et l'épaisseur de sa zone pellucide de 12μ . L'accumulation de liquides dans le blastocyste est responsable de l'expansion du blastocyste. Celle-ci se traduit par une augmentation de 60 % de son diamètre qui passe abstraction faite de l'épaisseur de la zone pellucide, d'un diamètre de 400 à 700μ . Il en résulte également un amincissement de la pellucide ce qui explique que sa rupture peut se produire à n'importe quel endroit.

L'éclosion c'est-à-dire la sortie du blastocyste hors de sa pellucide (hatching) vers le 9^{ème} - 10^{ème} jour suivant la fécondation, ne résulte pas d'une lyse enzymatique, des membranes pellucides intactes peuvent être retrouvées dans l'utérus, mais de la formation d'un point de

perforation. Ce processus a une durée moyenne de 12 heures. Diverses modalités en ont été décrites: la phase d'expansion est continue et suivie de l'éclosion ; elle peut-être discontinuée et être entrecoupée de quelques phases de contraction se terminant ou non par une éclosion normale..

Vers le 11^{ème}-12^{ème} jour de gestation, le blastocyste se compose de 1 000 cellules environ 25 % d'entre elles seulement constituant le bouton embryonnaire recouvert jusqu'à ce moment par le trophoctoderme. De la forme sphérique, le blastocyste prend progressivement un aspect ovoïde avant d'entamer vers le 12^{ème} au 14^{ème} jour sa phase d'élongation. Le début de cette phase varie entre espèces et entre individus, le cas le plus extrême étant celui de la diapause présentée par le chevreuil. Elle peut également être très rapide puisque dans l'espèce porcine, le blastocyste s'allonge de 30 à 45 mm par heure entre le 12^{ème} et le 14^{ème} jour de gestation (Leibfried-Rutledge et al, 1999).

III.2.3. L'implantation

Le trophoblaste différencié vers le 5^{ème}- 6^{ème} jour de gestation est un tissu dont la croissance est très rapide. Constitué de l'endoderme et du trophoctoderme, il forme le chorion et est à l'origine des houppes choriales. Il débute à ce moment sa phase d'élongation jusqu'à atteindre une longueur de 2,5 cm en moyenne au 16^{ème} jour de gestation. D'importantes variations individuelles ont été décrites à ce stade de gestation (Betteridge et Flechon 1988).

L'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme sont à ce moment bien différenciés et le trophoblaste est environ 50 fois plus long que le disque embryonnaire proprement dit. Les premiers contacts tissulaires entre le trophoblaste et la surface utérine s'observeraient selon les auteurs entre le 11^{ème} jour et le 90^{ème} jour de gestation. Des études plus spécifiques ont confirmé qu'en fait, c'est vers le 20^{ème}-30^{ème} jour de gestation qu'un processus d'adhésion entre les structures maternelles et embryonnaires se mettrait en place (King et al, 1980).

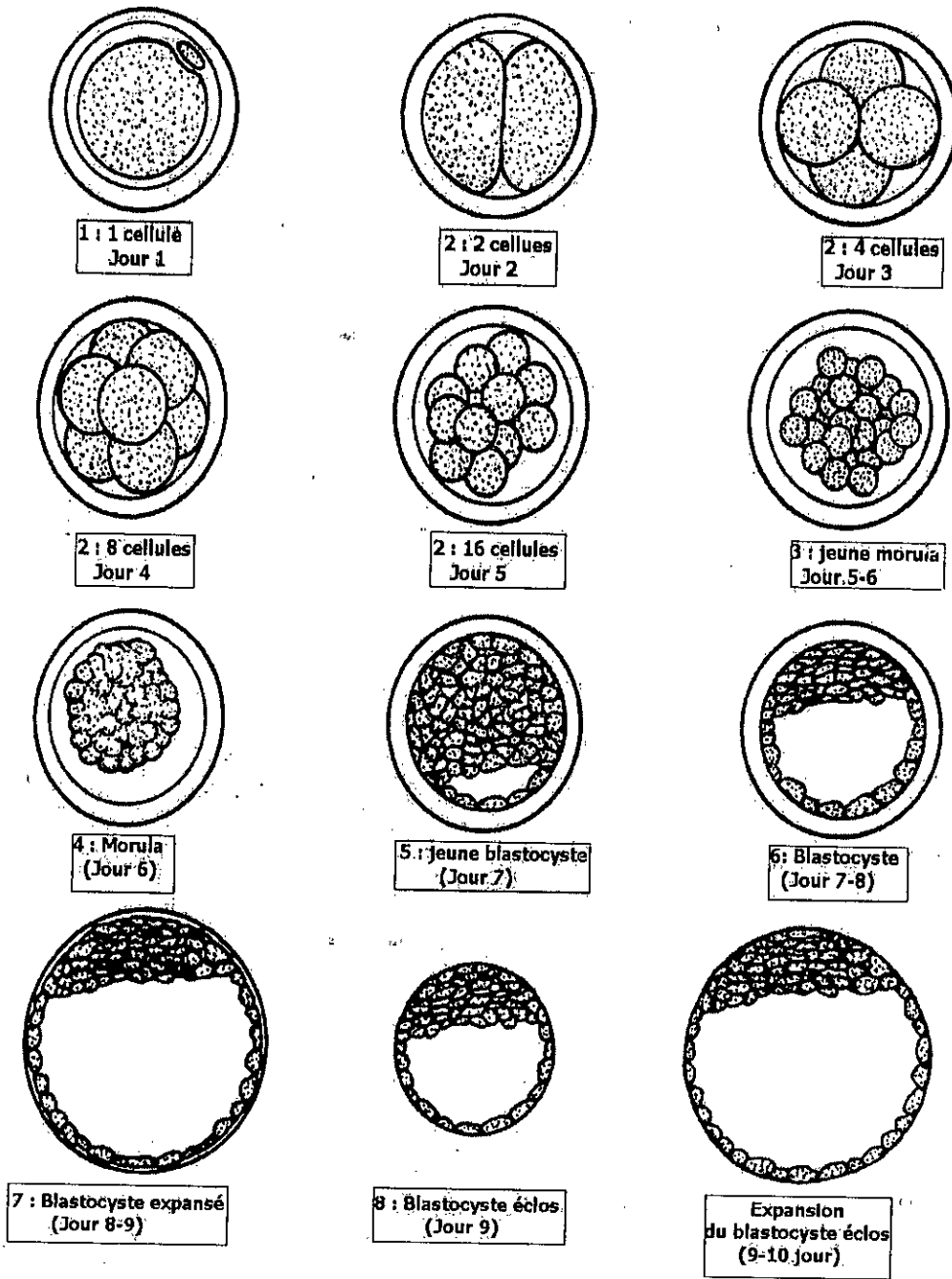


Figure 7 : Correspondance de l'état d'évolution de l'embryon avec son âge(Peters et Ball, 1994)

Chapitre 2 :
Production et transfert
d'embryons.

1.Introduction:

Les biotechnologies de la reproduction, chez les animaux de rente, sont à l'origine d'un progrès génétique très important, ainsi le transfert embryonnaire a considérablement modifié les méthodes de reproduction et a permis la mise en place d'un schéma de sélection dans l'élevage bovin

La production d'embryons consiste à prélever chez une vache donneuse préalablement soumise à une stimulation grâce aux hormones gonadotropes un nombre variable d'embryons obtenus par insémination artificielle puis les transférer chez des femelles receveuses dont le cycle est en parfaite synchronisation avec celui de la donneuse (Chupin, 1988).

Il est vrai que l'évolution dans les méthodes de superovulation a permis d'augmenter considérablement le nombre d'embryons produits car elles reposent sur la stimulation ovarienne à partir d'hormones gonadotropes exogènes qui agissent en inhibant l'atrésie des follicules dominés et en favorisant le développement de follicules plus jeunes (Chupin et Procureur, 1982; Greve et al, 1983; Nibart, 1991). L'apport des gonadotropines exogènes permet de déborder les mécanismes de contrôle naturels du 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 et une diminution de la taille des follicules lors de l'ovulation (Driancourt et al, 2001). C'est ainsi que Scriban (1999) rapporte qu'au moment du traitement, tous les petits follicules de 3 à 5 mm peuvent être stimulés, ce qui permet une meilleure réponse.

L'établissement de ces traitements nécessite une connaissance approfondie de la physiologie ovarienne, aussi la maîtrise de la folliculogénèse pourrait représenter une étape capitale de la réussite du transfert embryonnaire (Beckers et al, 1989), cela a été facilité par de nouvelles méthodes de contrôle de la croissance folliculaire (échotomographie, ponction du follicule dominant, traitements hormonaux) qui sont actuellement appliquées lors des traitements de superovulation afin d'optimiser la production d'embryons et atteindre des réponses prévisibles (Adams, 1995; Bo, 1995; Guilbault et al, 1996). C'est comme cela qu'on a constaté que la présence d'un follicule dominant avant toute administration de gonadotropines semblait inhiber la réponse à la stimulation gonadotrope (Saumande et al., 1978). Par la suite Grasso et al; (1989) puis Guilbault et al; (1991) prouvèrent l'effet délétère du follicule dominant sur la réponse à la superovulation, où l'initiation d'un traitement de

superstimulation en présence de follicule dominant réduisait de moitié les réponses de superovulation. D'autres chercheurs ont noté une forte corrélation entre le nombre de follicules (< à 5 mm de diamètre) en début de traitement et les réponses de superovulation (Roméro et al, 1991; Van der Schans et al., 1991).

2. Les différentes Hormones utilisées dans le traitement de superovulation

Deux préparations hormonales à activité gonadotrope ont été utilisées, la PMSG ou eCG et la FSH. L'avantage de l'utilisation de la eCG est sa simplicité, puisqu'une seule injection suffit, l'apport de l'anti PMSG a considérablement amélioré les résultats de la superovulation par cette hormone. La FSH par contre présente l'inconvénient d'avoir une demi vie très courte, ce qui nous oblige à faire plusieurs injections à intervalle régulier, mais le résultat global est plus intéressant.

2.1 Utilisation de l'eCG (PMSG):

C'est une glycoprotéine extraite du sang de jument gravide entre le 36^{ème} jour de la gestation au 120^{ème} jour et atteint son maximum au 80^{ème} jour (Saumande, 1977). Elle est sécrétée par les cupules endométriales qui se développent à partir de l'invasion de l'endomètre par les cellules spécialisées du trophoblaste. Cette hormone est constituée de deux sous-unités, et a un poids moléculaire de 64.000 Daltons, Elle est riche en hydrates de carbones: 45% (Pierce et Parsons, 1981) et le taux d'acide sialyque atteint 13.5%, ce qui lui confère une demi-vie de 5 à 6 jours (Schams et al., 1978; Gielen et Aguer, 1988) (Saumande, 1987). L'eCG est douée d'une activité biologique, à la fois de type FSH et de type LH, avec un rapport FSH/LH constant égale à 0.2 (Saumande, 1987).

Il est connu depuis quelque temps que la PMSG peut induire la formation d'anticorps, d'ici ont démarré des études permettant de trouver la possibilité de prévenir une stimulation excessive de l'ovaire (contenant de nombreux follicules anovulatoires) et secondairement de réduire le taux d'œstradiol par l'utilisation de l'anti-PMSG (Saumande, et al, 1984). Donc pour stopper l'action prolongée de la PMSG, beaucoup de travaux ont utilisé l'administration du sérum anti-PMSG après le début de l'œstrus chez les donneuses superovulées avec la PMSG.

Protocole de traitement (tableau 3):

L'utilisation de la PMSG présente un avantage pratique car elle est administrée en une seule injection (Chupin, 1988) par voie intramusculaire à la dose de 2500 à 3000 U.I. (Srean

et Beehan, 1976), le point négative est qu'après le pic préovulatoire et l'ovulation les niveaux de eCG restent élevés et maintiennent le développement de follicules qui ne pourront pas ovuler mais perturberont l'environnement hormonal pendant la fécondation, les premières phases du développement des œufs et la migration dans l'oviducte jusqu'à l'entrée dans l'utérus (Bevers et Dielman, 1987; Chupin, 1988). La longue demi-vie de la PMSG peut engendrer la production de follicules kystiques entraînant une diminution de la qualité des embryons (Almeida et al., 1987). Pour contrecarrer cet effet néfaste, Dhont et al., (1978) ont préconisé l'utilisation d'un sérum anti-PMSG. Ainsi de meilleurs résultats ont été rapportés, quant à l'utilisation du sérum anti-PMSG entre 5 - 6 h après le pic préovulatoire (Alfuraji et al, 1993 ; Dielman et al, 1993). Gonzalez et al.(1994) ont administré de l'anti PMSG 48 à 60 heures après la prostaglandine et rapportent une augmentation significative du nombre d'embryons transférables. Saumande et al, (1984) préconisaient l'injection d'un sérum anti-PMSG par voie veineuse dès le début de l'œstrus, les résultats de superovulation furent ainsi améliorés, et se traduisirent par une augmentation du pourcentage d'embryons de qualité par contre les taux d'ovulations n'étaient pas améliorés (Tableau 2).

Tableau n° 2 : Effet de l'injection d'Anti-PMSG sur le nombre d'ovulations et la qualité des embryons (3000 UI PMSG) (Saumande et al, 1984).

Lot	Nombre d'animaux	Corps jaune (m±SD)	Total récolté (m± SD)	Embryons utilisables	
				(m±SD)	%
Témoin	11	10.8± 5.8	7.2 ± 5.9	3.5 ±4.4	48.6
Anti-PMSG 12h	11	9.5± 6.8	7.7± 6.3	5.6± 6.4	72.6
Anti-PMSG 24h	12	9.8 ± 6.7	7.8 ± 6.7	5.3 ± 4.5	68.9

L'eCG est administrée par voie intramusculaire à la dose de 2500 à 3000 UI (Sreenan et Beehan, 1976) durant la phase lutéale entre le jour 8 et 12. Deux jours plus tard, une injection de prostaglandine (Chupin et Saumande, 1979) permet d'arrêter la phase lutéale et induit le retour des chaleurs au cours desquelles deux inséminations sont pratiquées (West et al., 1984). La récolte des embryons a lieu 7 jours plus tard. L'injection d'anti-PMSG se fait par voie intraveineuse, à dose unique capable de neutraliser l'action résiduelle de PMSG équivalente à 1800 UI au moment de la deuxième insémination (Wang et al., 1987; Schallenberger et al., 1988; Zeitoun et al., 1988). Le tableau suivant résume toutes ces étapes:

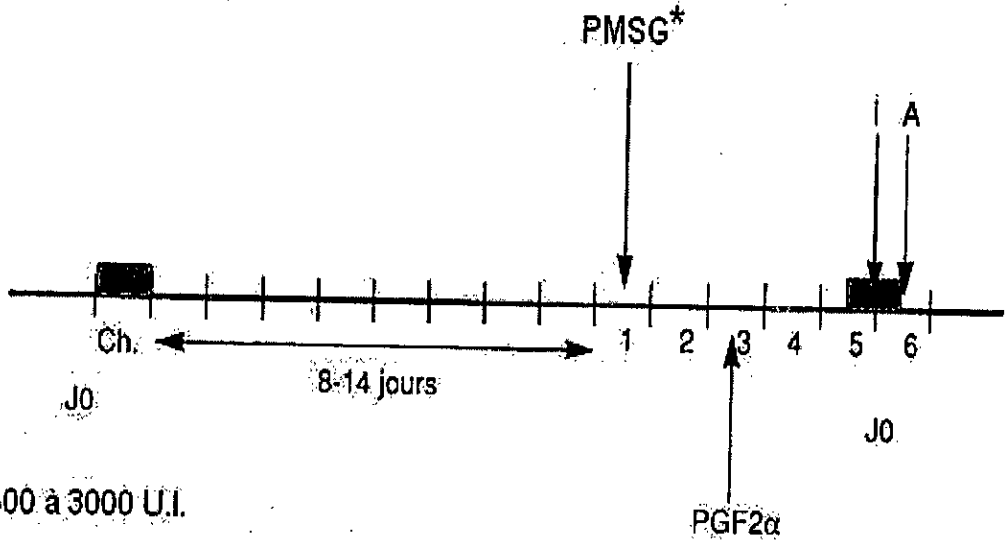
Tableau 3 : Protocole de traitement PMSG/Anti-PMSG (Sreenan et Beeham, 1976)

Jours du cycle	Evènement
J0	Oestrus
J9	2500 UI PMSG
J11	PG matin (I.M.)
J13	I.A. matin et soir + anti-PMSG (1800 UI) en I.V.
J20	Récolte d'embryons

L'un des principaux facteurs qui affectent les résultats lors d'un traitement de superovulation à la PMSG est le moment d'injection de l'anti-PMSG (Dieleman et al., 1993), l'emploi de cet antiserum au moment de l'insémination a permis une nette amélioration des résultats (Schallenberger et al., 1988; Zeitoun et al., 1988; Wang et al., 1987). Le facteur limitant l'utilisation de la PMSG est que l'emploi répété chez un même animal peut engendrer la formation d'anticorps qui diminuent progressivement la réponse de l'animal à la superovulation (Willet et Bucgner, 1953; Jainudeen et al., 1966; Chupin et Saumande, 1979; Almeida et al., 1987a).

Superovulation par la PMSG

CYCLE NORMAL:



* 1500 à 3000 U.I.

Figure 8 : Schéma du traitement à la PMSG sur chaleurs naturelles (Chupin, 1988)

CYCLE MAITRISE

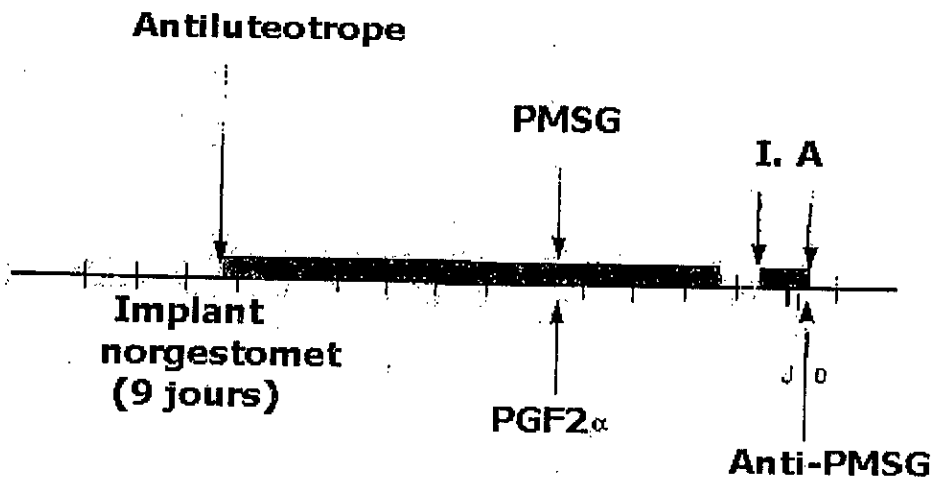


Figure 9a: Schéma du traitement à la PMSG sur cycle maîtrisé(Chupin, 1988)

2.2. Utilisation de la FSH

L'utilisation des extraits hypophysaires a permis une nette amélioration de bons embryons et plusieurs préparations ont été testées. Beckers et al., (1977) ont remarqués une nette différence d'activité entre la FSH bovine et porcine à cause de la faible teneur d'acide sialique de la FSH bovin. De récents progrès enregistrés dans le domaine de la biotechnologie (ADN recombinante) on permit de produire de la bFSH (bovine FSH) avec des niveaux de pureté élevée et caractérisées par une absence de contamination de protéines et/ou autres gonadotrophines) et donc éventuellement commercialisable (Loonney et Bondioli, 1988). La bFSH recombinante a démontré qu'elle possédait une haute activité biologique d'après l'évaluation de doses faite par Bellow et al, (1991) chez la vache à viande, en induisant chez celle-ci d'excellentes réponses de superovulation. L'avantage des extrait hypophysaires est qu'il ne parait pas y avoir de formation d'anticorps lors de traitements répétés (Dufour et al., 1990), mais sa demi-vie courte fait qu'il faut plusieurs injections pour maintenir des concentration circulantes efficaces.

Protocole de traitement à base de FSH:

Actuellement, la FSH est obtenue à partir d'extraits hypophysaires d'origine porcine (pFSH) (Beckers, 1987). En France parmi les préparations commerciales les plus utilisées sur la terrain, le StimufolND (Merrial, France) aurait permis d'obtenir une bonne stabilité des réponses (Nibart, 1997) (tableau n° 9)

Les doses peuvent s'exprimer en mg équivalents du standard Armour ou en μg de FSH pure (1mg correspond à 15 μg de pFSH pure) (Chupin, 1988). La demi-vie de la FSH étant courte (20 à 70 min) (Laster, 1971) ce qui contraignait à la répétition des injections lors de traitements de superovulation toutes les douze heures pendant au moins quatre jours. Plusieurs préparations ont été mises au point, mais avec différents degrés de contamination par la LH. Mapeltof et Pierson (1993) ont suggéré que le niveau maximal acceptable de contamination par la LH dans les préparations de FSH serait entre 15 et 20%. Les travaux menés par Donaldson (1987) auraient montré que les faibles taux de fécondation obtenus avec la FSHp seraient imputables à la quantité de LH présente en association avec FSH et non aux nombres d'IA effectuées.

Concernant le rythme des injection, il est dicté par la courte demi-vie de la FSH porcine (Chupin et procureur, 1982); en effet, 12 heures après injection elle n'est plus

délectable dans le sang (Demoustier et al., 1988), et c'est sur cette base que s'est établi les différents protocole de traitement. Toutefois, les variations ovariennes et embryonnaires lors de traitements par la bFSH ont été similaires à ceux rapportés pour les autres préparations de gonadotropines connus à nos jours. Les travaux de Wilson et al, (1993) ont permis de noter que les grandes performances de la bFSH étaient similaires aux résultats rapportés avec les extraits pituitaires.

**SUPEROVULATION
FSH.P**

Superovulation par FSH (NIBART, 1991).

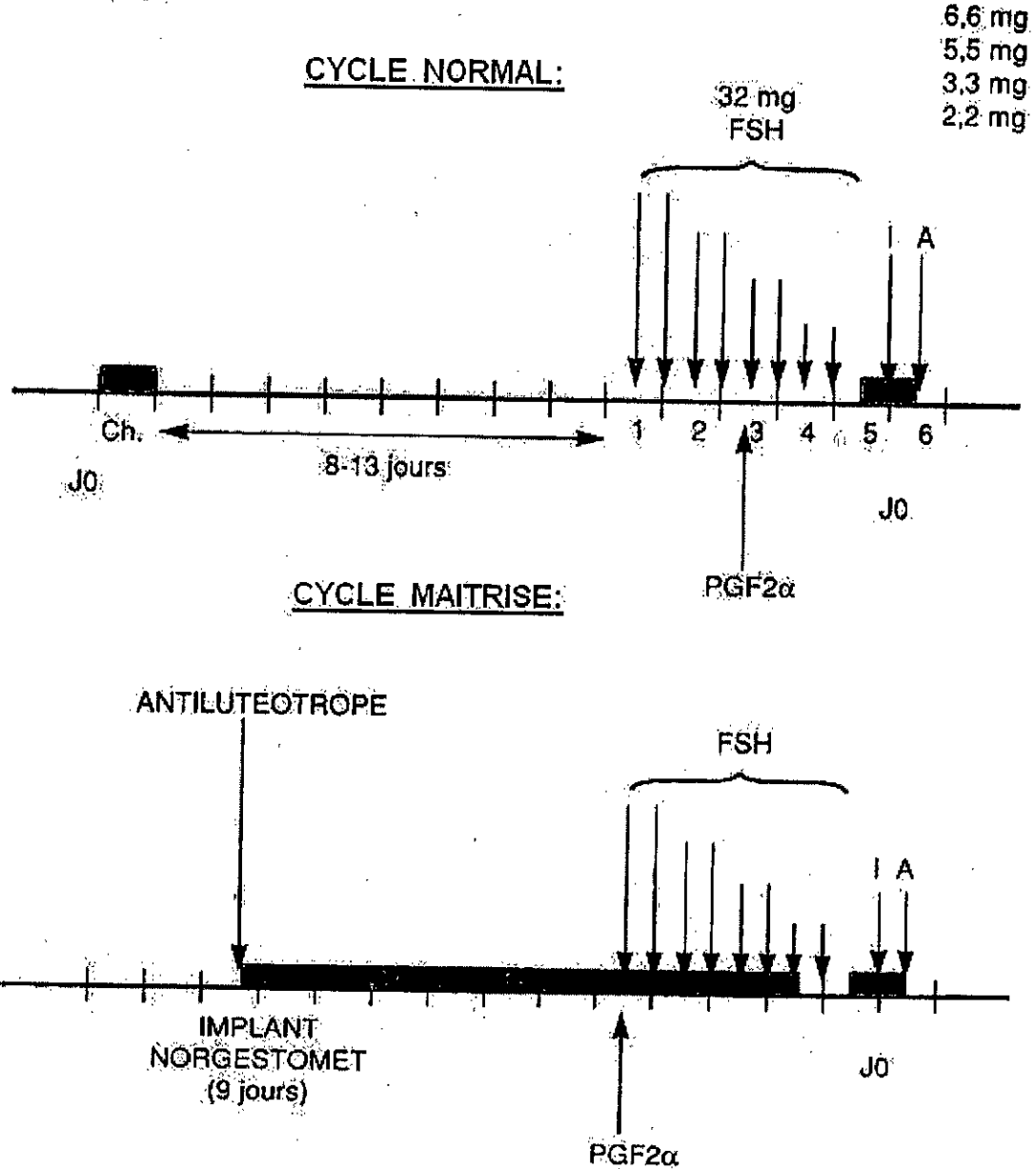


Figure 9b: Protocole de superovulation à la FSH sur chaleurs naturelle et sur cycle maîtrisé (Nibart 1991)

3. Voies d'amélioration des résultats de la superovulation

3.1 Introduction

Il est reconnu actuellement que le nombre d'embryons obtenus à partir d'une vache dépend d'une part de facteurs biologiques inhérents à la donneuse (statut ovarien, environnement utérin) et d'autre part du choix de la gonadotropine utilisée (e.C.G ou F.S.H) et/ou de l'efficacité des techniques de collecte. Ainsi, les travaux menés par Moniaux, (1982) en analysant la population folliculaire des ovaires collectés par hémicastration soumis aux injections de e.C.G pour l'un des ovaires et 48 h après le pic de LH pour l'autre ont permis de mettre en évidence deux faits importants:

- les follicules qui vont ovuler suite aux traitements par les gonadotropines sont les follicules sains mesurant au moins 2 mm de diamètre au début de la stimulation.
- les animaux ayant de fortes réponses se caractérisent par une folliculogénèse très active (présence d'un grand nombre de follicules dont la croissance est rapide).

Toutefois des valeurs de 70% du nombre d'ovulations furent observées dont au moins 20% pouvant être expliquées par les facteurs extrinsèques (conditions d'élevage, parité, traitement).

La théorie des vagues de croissance folliculaire (Adams et al, 1992) et le rôle inhibiteur exercé par le follicule dominant sur la croissance folliculaire (Bungartz et Niemann 1994; Grasso et al, 1989; Guilbaut et al; 1991) ont incité certains chercheurs à proposer des solutions alternatives visant à faire coïncider davantage le début du traitement avec le moment d'émergence d'une vague de croissance folliculaire. C'est pourquoi des traitements de superovulation en début de cycle ont été évalués.

Afin d'augmenter le nombre de follicules pouvant répondre au traitement de superovulation, deux voies d'approche ont été ainsi proposées (Saumande, 1995) :

La première voie consiste à intervenir sur la fonction gonadotrope, où deux stratégies peuvent être envisagées :

a- Par l'augmentation des concentrations de gonadotropines endogènes:

- En recrutant un large contingent de follicules réceptifs par stimulation au début de phase antrale ou préantrale, afin qu'un plus grand groupe de follicules réceptifs soit disponible quand le traitement gonadotrope sera initié, appelé "gonadotropin priming" (Saumande, 1987 ; Touati et al, 1991).

- En limitant la rétroaction négative des sécrétions ovariennes sur l'activité du système hypothalamo-hypophysaire par immunisation contre les stéroïdes ou contre l'inhibine. Il a été montré que l'immunisation contre l'inhibine modifie la fonction ovarienne et qu'un tel traitement permet d'augmenter la réponse des animaux soumis aux traitements de superovulation (Hillard et al, 1990).

b- Par la réduction des concentrations des gonadotropines endogènes

- En freinant de façon réversible les sécrétions de LH et FSH et en induisant une désensibilisation hypophysaire au GnRH par un traitement prolongé avec un agoniste, cela pouvant entraîner une accumulation des follicules dans les classes de taille qui précède la dépendance vis à vis des gonadotropines (Saumande, 1995).

La deuxième voie d'approche consiste à augmenter le nombre de follicules pouvant être recrutés lors de traitement de superovulation :

- par stimulation préalable de la sécrétion d'IGF-I, facteur impliqué dans la régulation de la fonction ovarienne (Moget, 1993).

- L'administration de GH à des génisses induit une augmentation des taux en IGF et un doublement du nombre de follicules de 2 à 5 mm de diamètre (Gong et al, 1993).

- Un prétraitement par la GH aurait permis d'accroître les résultats aux traitements de superovulation (nombre d'ovulations et d'embryons viables) (Gong et al, 1995).

- Il a été montré par contre; que l'immunisation contre l'hormone de croissance (GH) pouvait entraîner une diminution des taux sériques et celle du liquide folliculaire en IGF-I (Cohich et al, 1996).

3.2 Les prétraitements de gonadotropines ou «Gonadotropin priming » :

Un prétraitement au moyen de FSH au cours des premiers jours du cycle (priming) vise à augmenter le nombre de follicules recrutés susceptibles de répondre au traitement de superovulation proprement dit mis en place en milieu de cycle. Il est possible que l'intervalle

entre le priming et le traitement de superovulation proprement dit ne soit pas adapté au rythme de croissance des follicules préantraux (Armstrong 1993), ceux-ci requérant pratiquement deux cycles pour atteindre le stade préovulatoire (Lussier et al, 1987).

Partant de l'hypothèse que la libération de la FSH endogène augmentait rapidement avant initiation d'une nouvelle vague folliculaire, hypothèse confirmée par la suite (Adams et al, 1992), plusieurs essais (Rajamahandran et al, 1987; Touati et al, 1991) montraient qu'un prétraitement de gonadotropine améliorait la réponse de superovulation. L'administration de 200 U.I d'e.C.G en prétraitement à J4 du cycle, suivie d'un traitement de superovulation avec le même composé (28 00 U.I d'e.C.G) a permis d'obtenir des résultats améliorés en terme de réponses ovulatoires et d'embryons collectés (Petr et al, 1990).

D'autres études par contre (Riger et al, 1988; Gray et al, 1992) ne trouvèrent aucune amélioration des résultats suite aux prétraitements de gonadotropines. Pire encore, d'autres auteurs (Lussier et Caruthers, 1989; Grasso et al, 1989) montraient que ces prétraitements auraient exacerbé les effets du follicule dominant et donc l'obtention de résultats décevants en terme d'ovulations et d'embryons collectés. L'échec de ces prétraitements dans ces différentes études, serait dû selon Armstrong (1993) au moment inapproprié de l'intervalle prétraitement-gonadotropine exogène. Un effet bénéfique de ces prétraitements sur les taux d'ovulations à travers la stimulation des follicules au début des follicules antraux pourrait entretenir une période plus longue que la première moitié du cycle.

Les effets de ces prétraitements seraient plutôt dus à une lutéinisation du follicule dominant qu'à une stimulation des petits follicules. La lutéinisation peut en effet éliminer ses effets suppressifs (Maptletoft et al, 1994). Ces prétraitements ne pourront donc améliorer les réponses aux traitements de superovulation qu'à condition d'être initiés aux moments les plus appropriés.

Les effets négatifs pourraient selon certains auteurs être imputés au fait que le priming retarde l'atrésie du follicule dominant et ce faisant prolonge son effet inhibiteur sur la croissance des follicules sélectionnés dont l'apparition est retardée (Grasso et al, 1989). Il a également été démontré que le priming s'accompagnait plus fréquemment de l'atrésie des follicules de taille comprise entre 5 et 9 mm (Goulding et al, 1991). Pour d'autres, le priming

s'accompagnerait d'une réduction des concentrations plasmatiques en FSH résultant d'une synthèse accrue par les follicules sélectionnés de E2 et d'inhibine (Lussier et Carruthers 1989).

Il est par ailleurs bien connu qu'une diminution différée de la progestéronémie après l'injection de la PG à des animaux superovulés constitue un facteur limitant à l'obtention de résultats optimaux (Callesen et al, 1988). Il est enfin possible de penser que le priming au moyen de préparations insuffisamment purifiées et dès lors également douées de propriétés LH induisent une lutéinisation précoce des follicules et entravent la lutéolyse (Monniaux et al, 1983; Guilbault et al, 1992).

3.3. Traitements à base de liquide folliculaire :

Partant de l'hypothèse souvent admise (Kastelic et al, 1990; Turzillo, 1990) que le liquide folliculaire (extrait par le charbon animal) permettait de supprimer le niveau de base de la FSH et le développement des follicules ovariens. Mapletoft et al (1994) proposèrent d'initier un traitement de superovulation à différentes périodes horaires (12, 84 et 156 h) après arrêt de traitement par le liquide folliculaire effectué pendant 6 jours, afin de rattraper le développement des petits follicules antraux.

Au-delà des meilleures réponses aux traitements de superovulation obtenus (9,7 oeufs fertilisés et 6,8 embryons transférables en moyenne); ces auteurs n'ont remarqué aucune différence significative entre le lot traité et le lot témoin. Cependant, le lot traité à 84 heures après l'arrêt d'administration du liquide folliculaire a montré de meilleurs taux d'ovulations et d'embryons transférés par rapport au lot de 12 heures. Ce résultat était en fait attendu (Mapletoft et al, 1994) puisque les deux lots (traités et témoins) seraient probablement à la même période de vagues folliculaires.

En administrant le liquide folliculaire à différentes périodes du cycle chez des vaches (J0 à J3) (J3 à J6) et (J6 à J11); Kastelic et al (1990) ont noté que la taille des follicules en croissance s'arrêtait dès le premier jour de l'initiation du traitement et commençait à décroître 5j après la cessation du traitement et une nouvelle vague de développement folliculaire fut détecté 3 jours plus tard. L'administration de liquide folliculaire pendant 2,5 jours (12 heures après le début des chaleurs) fait retarder la détection de la 1ère vague de 2 jours (Turzillo et Fortune, 1990).

3.4 Les traitements physiques

La destruction du follicule dominant par cautérisation (Ko et al, 1991; Adams et al, 1992), par ablation chirurgicale d'un ovaire (Staigmiller et England 1982), par éclatement manuel ou par ponction échoguidée (Adams et al, 1993; Bergfelt et al, 1994; Hahn 1992) constituent des alternatives intéressantes au vu des effets positifs dont elles s'accompagnent (meilleure synchronisation des retours en chaleurs, augmentation du nombre de follicules recrutés, apparition plus rapide d'une nouvelle vague de croissance folliculaire).

Etant donné sa facilité de réalisation et l'absence de complications locales telles que des adhérences induites par l'éclatement manuel du follicule, la ponction échoguidée du follicule dominant réalisée 2 jours avant le traitement de superovulation devrait dans ce contexte constituer une méthode de choix (Bungartz et Niemann 1994). Kohran et al (1995) ont étudié par échotomographie les réponses ovariennes de 106 cycles superovulés et la situation du follicule prévalant le jour du traitement de stimulation (JO). Ils ont ainsi montré que des animaux superovulés en présence de follicules (> 6mm) à JO donnaient de meilleures réponses que les animaux superovulés en présence d'un nombre faible de follicules.

A/Méthodes par électrocautérisation :

Différentes études ont été menées (Adams et al, 1993; Ko et al, 1991) pour éliminer le follicule dominant par électrocautérisation lors d'une laparotomie; les résultats ont montré que l'ablation de ce follicule pouvait entraîner l'émergence rapide d'une nouvelle vague de follicules.

B/Méthodes par rupture manuelle du follicule dominant

Par rupture manuelle du plus grand follicule, de meilleurs résultats de superovulation furent obtenus un jour après initiation du traitement (Hahn, 1992). En se basant sur ces résultats, d'autres auteurs (Bergfelt et al, 1994; Bungartz et Nieman, 1994) ont testé la sonde vaginale échoguidée comme méthode d'ablation de tous les follicules (diamètre \geq 5mm) suivie 4 jours après de la lutéolyse par la prostaglandine F2 α . Ces auteurs ont noté que l'aspiration par O.P.U du follicule dominant 2 jours avant la superovulation entraîne une augmentation du nombre d'embryons transférables comparativement aux animaux superovulés en présence du follicule dominant.

D'autres travaux réalisés deux ans après; selon les mêmes protocoles ont confirmé ces résultats. Ainsi, 6,8 vs 5,3 et 8,9 vs 6,0 embryons viables ont été rapportés dans ces études comparatives (de Ruigh et al, 1996; Hill et Kuehner, 1996). En condition de terrains, Ede et al, (1999) ont obtenu en moyenne deux embryons de plus ($7,0 \pm 0,3$ vs $4,9 \pm 0,2$, $p=0,05$).

3.5. Les traitements hormonaux

3.5.1. Les traitements à base de valérate d'oestradiol :

Il est actuellement admis (Refsal et al, 1987) qu'en fin de phase folliculaire les œstrogènes induisent la libération de LH, celle-ci pouvant également être induite entre 16 à 20 heures après administration exogène d'œstradiol. Il est montré (Hinshelwood et al, 1986) que des traitements à base d'œstrogènes entraînent la suppression de la libération de LH et une réduction de la capacité de la réponse hypophysaire au traitement à base de GnRH.

Quant à Bo et al (1991), ayant administré le valérate d'œstradiol à des vaches au moment de l'insertion d'un implant de progestagène avant les traitements de superovulation, ils ont mesuré la dynamique folliculaire et la réponse aux traitements. Quoique les résultats des traitements de superovulation n'en soient pas significativement améliorés, seulement les examens échomotographiques quotidiens ont permis de montrer que ces traitements ont provoqué une réduction de la taille moyenne de follicules supérieurs pour une période de 5 jours, suivie par une augmentation de la taille de follicules supposés de la prochaine vague.

En administrant des œstrogènes au début (J1) au milieu (J3) et enfin (J6) de la première vague de croissance folliculaire Bo et al (1992) montraient la suppression du follicule dominant. L'émergence d'une autre vague a été accélérée par les traitements à base d'œstradiol à J1 et retardée par les traitements à J3 et J6. Ces résultats indiquent en fait que les effets du traitement à base d'œstradiol sont complexes (Amstrong, 1993) mais que la synchronisation des vagues de croissance folliculaire consécutive pourrait conduire à de meilleures réponses aux traitements de superovulation.

L'effet de l'œstradiol-17 β associé aux progestagènes, a été étudié par Bo et Caccia (1994) à différentes périodes (J3, J6 et J9) du cycle; J3 correspondrait au milieu de la phase de croissance; J6 au début de la phase statique, J9 celle de la fin de la phase statique du follicule

dominant de la première vague (Lopes et al, 2001). Les résultats ont permis de noter que l'intervalle moyen entre l'administration de l'oestradiol-17 β et l'émergence d'une nouvelle vague était en moyenne de $4,3 \pm 0,1$ jours pour les différentes périodes (J3, J6 et J9). Le traitement effectué à J3 entraînait l'apparition d'une nouvelle vague, celui de J6 correspondait à l'émergence tardive d'une nouvelle vague, par contre celui de J9 entraînait la suppression du follicule dominant de la deuxième vague et hâtait l'émergence d'une troisième vague.

L'effet de l'oestradiol sur la dynamique folliculaire chez des vaches ayant subi un traitement de superovulation avec implants de Norgestomet ont permis de montrer (Mapletoft et al, 1994) que le valérate d'oestradiol induisait l'atrésie des follicules antraux larges (Fernandes et al, 2001). De meilleurs résultats de superovulation (en terme de qualité d'embryons) sont obtenus lorsque ces traitements démarraient 7 jours après l'administration du valérate d'oestradiol. Les profils hormonaux subissaient des fluctuations; ainsi la FSH décroît 12 heures après l'injection du valérate d'oestradiol puis reprend sa croissance 96 heures après; tandis que les taux sériques de LH restaient bas durant la période de mise en place de l'implant de Norgestomet (Adams et al, 1995; Bo et al, 1995).

La possibilité de synchroniser (en induisant l'atrésie des follicules antraux existants) une nouvelle vague de développement folliculaire en vue d'un traitement de superovulation permettrait l'obtention de plus d'ovulations et de qualité meilleure en terme d'embryons viables. En partant de l'hypothèse actuellement admise que les traitements associant l'oestradiol 17 β aux implants de Norgestomet conduiraient 4,3 jours après à l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire; Adams et al,(1994) ont testé ces traitements sur la réponse aux traitements de superovulation. Ils ont ainsi montré que ces traitements entraînaient l'apparition d'une nouvelle vague folliculaire réagissant aux traitements de superovulation .

En associant du benzoate d'oestradiol 4 jours après initiation des progestagènes (PRID/CIDR) lors de la mise en place du traitement de superovulation par la PMSG, il a été montré que le benzoate d'oestradiol diminue le nombre de follicules larges, ce qui a permis d'obtenir des embryons de meilleure qualité (Duffy et al, 1995; Todoky et al, 2001). Il est admis actuellement que l'utilisation de progestagènes associés au benzoate d'oestradiol ont effectivement prouvé; leur efficacité sur le contrôle et la synchronisation des vagues

folliculaires et pourrait représenter une voie future qui pourrait être très utile pour améliorer efficacement les protocoles de superovulation (Bo et al , 1995; D'ochhio et al 1997).

3.5.2. Les traitements à base de "Human-Chorionic-Gonadotropine (h.C.G)"

Rajamahendran et Sianangama (1992) rapportèrent que l'administration d'hCG pouvait induire l'ovulation et/ou la lutéinisation du follicule dominant présent sur les ovaires à J7 du cycle. En administrant l'hCG à J7 suivie par un traitement de superovulation à base de FSH à J9 (Calder et Rajamahendran, 1992) n'ont pas obtenu de différences notables entre les vaches traitées versus vaches témoins.

3.5.3. Les traitements par des agonistes de la GnRH

Le mécanisme d'action des traitements avec les agonistes de GnRH pour synchroniser l'œstrus est basé sur un double principe : durant la phase folliculaire, la GnRH libérée sous forme de pulses stimule le relâchement pulsatile de LH, et l'augmentation de la fréquence des pulses de LH culmine par une décharge préovulatoire (pic de LH) provoquant ainsi l'ovulation du follicule préovulatoire. La GnRH induit d'autre part la synthèse de FSH qui va contribuer à stimuler la croissance des follicules.

La mise en place des traitements par les agonistes de la GnRH est dépendante en plus du stade de développement folliculaire, de la période du cycle et des taux progestéroniques. En effet il a été montré par échographie (Macmillan et Thatcher, 1991) ou par des techniques histologiques (Twagiramungu et al, 1994) que la réponse en terme de décharge en LH induite par un traitement de GnRH est inversement proportionnelle à la concentration de la progestérone (P4) observée.

Les effets de la GnRH sur les taux de progestérone sont l'objet de controverses : Pour Rettmer et al (1992), l'injection d'un agoniste de GnRH entraînerait une augmentation à très court terme (quelques min) des taux plasmatiques de P4. Pour Stevenson et al (1993) cette augmentation de P4 ne peut se faire qu'à long terme (6 à 7 jours) après injection de GnRH. D'autres études par contre font état d'une réduction des taux plasmatiques de P4 après administration d'un agoniste de GnRH à J2 du cycle (Rodger et Stomshak 1986).

L'utilisation des progestagènes en association avec la GnRH a permis à Bantley et al, (1998) d'inhiber temporairement la croissance folliculaire afin de mieux contrôler le moment de l'ovulation chez les donneuses superovulées. Toutefois, De Ruigh et al, (1998) n'ont observé aucune différence significative entre un traitement classique de superovulation ou combiné avec l'administration de GnRH 120 h après la 1^{ère} injection de FSH au moment de la 2^{ème} IA ($6,6 \pm 0,7$ vs $7,2 \pm 0,5$ embryons totaux).

Des essais d'augmentation du nombre de follicules recrutables par injection d'un analogue de GnRH lors de traitements de superovulation ont permis à Twagiramungu et al, (1996) d'aboutir aux conclusions suivantes :

1. En phase lutéale, avec ponction du follicule dominant réalisée 2 jours avant la superovulation, les résultats ont montré que le nombre d'ovulations et d'embryons collectés ont été significativement augmentés aussi bien également pour les embryons dégénérés et les non fécondés.

2. A n'importe quel moment du cycle, la ponction des gros follicules étant effectuée 4 jours plus tard, les résultats ont montré que le nombre d'embryons viables produit est équivalent aux témoins .

Les nouvelles données relatives aux effets de la GnRH sur le développement folliculaire ont permis d'aboutir à la précision de la synchronisation des chaleurs (Twarigamungu et al, 1995). Ainsi il a été montré que la GnRH-agonist1 entraîne une augmentation du nombre de petits follicules pendant les 3 jours du traitement mais limite d'avantage leur développement en augmentant l'atrésie, éliminant les gros follicules par l'ovulation ou l'atrésie à n'importe quel moment du cycle (Guilbault et al, 1996). Cette situation pourrait empêcher le retour en chaleur du moins dans les 6 jours suivant le traitement. Ceci permet également d'augmenter la précision des chaleurs suivantes induites par la prostaglandine 6 jours après le traitement par la GnRH (Guilbault et al, 1996).

Ces observations ont conduit à développer un programme de superovulation qui pourrait être appliqué à n'importe quel moment du cycle (Kohram et al, 1996). Ce programme se voudrait avoir un impact considérable dans le domaine du transfert embryonnaire à partir du moment où le jour des opérations pour la production d'embryons ne serait plus dépendant de la donneuse (Kohram et al, 1996). Ce qui a également permis d'aboutir à la mise en place de

la méthode Canadienne «association ponction du FD et FSH» Guilbault et al (1996) (figure 10).

Méthodes Canadienne: Association Ponction du FD et FSH.

Traitement de Superovulation pour OPU tous les 14 jours.
(AETE, 1996 Guilbault et al)

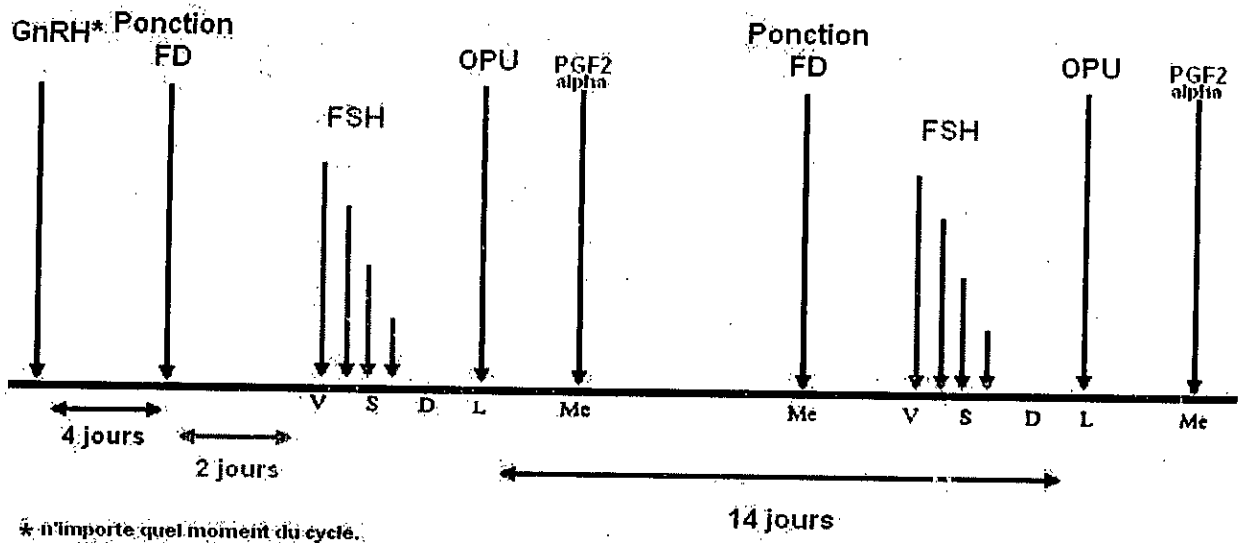


Figure 10 : protocole de superovulation pour OPU (Guilbault et al., 1996)

3.5.4. Utilisation de la FSH recombinante bovine :

Grâce aux progrès dans le domaine de la biotechnologie, il est actuellement possible de synthétiser de la FSH bovine (bFSH) avec des niveaux de pureté appréciables ce qui a engendré la commercialisation de ce produit (Cushman et al, 2001 ; Looney et Bondioli, 1988). Des essais de traitements réalisés sur des races à viandes ont conduit à de très bonnes réponses de superovulation, toutefois les variations lors des traitements semblent similaires à ceux des autres préparations (Bellow et al, 1991). Les mêmes observations ont été également enregistrés par Wilson et al, (1993).

4. Caractéristiques physiologiques des animaux superovulés

I.4.1. Endocrinologie chez les donneuses superovulées :

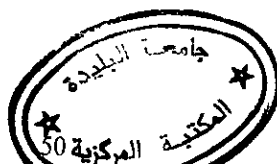
En général 1/3 du profil endocrinien des donneuses soumises aux traitements de superovulation dévie de la normale. Tous les événements préovulatoires (pic de E2, œstrus, pic de LH et de FSH) chez les animaux superovulés apparaissent en général 24 heures plus tôt que chez les animaux non stimulés ($p \leq 0,05$) (Roberge et al, 1995; Greve et al, 1995). Ces exemples concernent également le déclin prématuré de la P4 suite au traitement de superovulation ou encore les taux élevés de P4 durant les moments de chaleurs (Greve et al, 1995). Il a été noté que ces deux conditions sont incompatibles avec le pic préovulatoire de LH et sont souvent associés à des maturations ovocytaires incomplètes ou encore à des embryons de qualité réduites (Assey et al, 1994; Greve et Callessen, 2002; Hyttel, 1991).

4.2. Caractéristiques de l'œstrus et des ovulations

Il est admis actuellement que l'œstrus, le pic préovulatoire de LH et l'ovulation chez les génisses superovulées apparaissent au moins 24 à 30 heures plus tôt que chez les génisses non stimulées (Callessen et al, 1986; Goto et al, 1988; Kanekô et al, 1992; Roberge et al, 1995). A la suite d'une superovulation par la FSH, l'intervalle moyen PGF2 α -œstrus varie de 41 heures (Yadav et al, 1986; Diop et al, 1987) à 51 heures (Foote et al, 1989). En comparant des génisses superovulées par la FSH par rapport à des témoins (Roberge et al, 1995) notèrent également que cet intervalle apparaît en moyenne $48,3 \pm 0,3$ h vs $66,7 \pm 9,6$ h respectivement.

Les ovulations varient selon le type de l'agent stimulant (eCG; FSH). Chez les vaches superovulées par l'eCG, les ovulations débutent cinquante à soixante heures après lutéolyse par la PGF2 α (Callessen et al, 1987) soit environ douze heures après le début d'œstrus ; par contre, ils apparaissent légèrement plus tard en utilisant la FSH (Maurer et al, 1987). Compte tenu de la multiplicité des ovulations, le délai au cours duquel elles se déroulent est logiquement plus long que lors d'un cycle normal. La plupart des ovulations se produisent au tour de la vingt quatrième heure après le début d'œstrus (Yadav et al, 1986; Greve et Callessen, 2002).

Le moment des ovulations par rapport au pic de LH, a été déterminé par Laurincik et al (1992) en effectuant des prises de sang et l'examen des ovaires par échographie; ces auteurs



concluent que les ovulations se produisent entre $22,7 \pm 1,5$ heures et $31 \pm 1,5$ heures sur une période de 8 heures après le pic de LH.

4.3. Caractéristiques des profils hormonaux de la LH:

Chez les femelles superovulées, une augmentation du niveau de base de LH à la suite de la lutéolyse est observée par rapport à celui des femelles normalement cyclées ($1,7$ vs $0,8$ ng/ml) (Donaldson, 1985). En revanche le pic de LH se produirait plus tôt au cours d'une superovulation comparée à un cycle normal avec induction de la lutéolyse par les prostaglandines (22 à 54 h vs 60 à 72 h) pour Callessen et al (1986); Yadav et al (1986) et $40,7 \pm 4,2$ h vs $70 \pm 8,0$ h pour Roberge et al, (1995).

D'autres auteurs viennent confirmer ces résultats en utilisant la gonadotropine FSH : le pic de LH se produisait à 45 heures pour Diop et al (1987) à 52 heures après l'injection de $PGF2\alpha$, pour Yadav et al (1986) et $43,9 \pm 1,5$ h pour Bevers et Dielman (1987). La durée du pic oscille entre 4 à 10 heures (Yadav et al, 1986). Différents auteurs (Bendjebara et al, 1994; Roberge et al, 1995) notèrent également que le nombre de pulses de LH des génisses superovulées variait de 0 à 1 comparativement aux génisses témoins (1 à 4 pulses).

La fréquence et l'amplitude moyennes des pulses de LH sont significativement basses chez les génisses superovulées comparativement aux génisses non stimulées avant et après lutéolyse par la $PGF2\alpha$. Le pic de LH semble être corrélé positivement avec le nombre de corps jaunes et la production d'embryons de qualité 1 (Roberge et al, 1995). L'inhibition de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH serait due aux concentrations présentes d'oestradiol et de progestérone successivement (Goodman et Karsh, 1980).

Ces résultats furent également signalés par (Kaneko et al, 1992) qui notèrent des taux de progestérone élevées avant et après le pic de LH. Cependant, la fréquence des profils de LH atypiques (absents, prématurés ou retardés) est loin d'être négligeable lors de superovulation par l'eCG :

- 16% des animaux traités ne présentent pas de pic de LH (Bevers et al, 1988)
- 33% à 50% des vaches souffriraient d'une déviation ou d'une absence de pic de LH (Grève et al, 1984; Callessen et al, 1988).

Des anomalies probablement liées à l'activité LH intrinsèque de eCG pourraient se répercuter sur le déroulement des ovulations; et le taux d'ovulation serait significativement diminué (Greve et al, 1984). L'intervalle prostaglandine-pic de LH est corrélé négativement avec le nombre de follicules préovulatoires ($r = -0,48$; $p < 0,01$). L'intervalle entre le début de l'œstrus et le pic de LH étant de $1,96 \pm 0,54$ h (Bever et Dielman 1987).

4.4. Caractéristiques du profil hormonal de la FSH:

Il se produit un pic de FSH endogène approximativement synchrone avec le pic de LH (Donaldson, 1985; Nibart et al, 1988). Ce pic est moins élevé chez les animaux ayant reçu un traitement de superovulation par la PMSG ($67,4 \pm 29,2$ ng/ml) que chez ceux traités avec la FSH ($85,2 \pm 23,1$ ng/ml) ; mais cette différence est non significative (Kweon et al, 1987).

Des génisses superovulées par FSHp montraient des taux sériques de FSH qui augmentent dès la deuxième heure après traitement, atteignant un maximum de $25,3 \pm 4,0$; $26,1 \pm 4,0$; $18,4 \pm 3,6$ et $16,3 \pm 3,6$ ng/ml à J2, J3, J4, et J5 respectivement, puis décroissaient jusqu'à atteindre des concentrations de base non différentes de celles des génisses témoins (Roberge et al, 1995). Quel que soit le type d'hormones gonadotropes (PMSG ou FSH) pour les traitements de superovulation, aucun effet sur le moment de l'augmentation de FSH ni sur la décharge gonadotrope de FSH n'est noté.

Quel que soit le traitement de superovulation (PMSG/FSH); qu'il soit institué suite à des traitements de maîtrise (implants, spirale) ou sans chaleur induite; Nibart et al, 1988 n'ont observé aucun effet du lot de traitement sur le niveau de base moyen, la durée ou valeur maximale du pic de FSH (Figure n° 11).

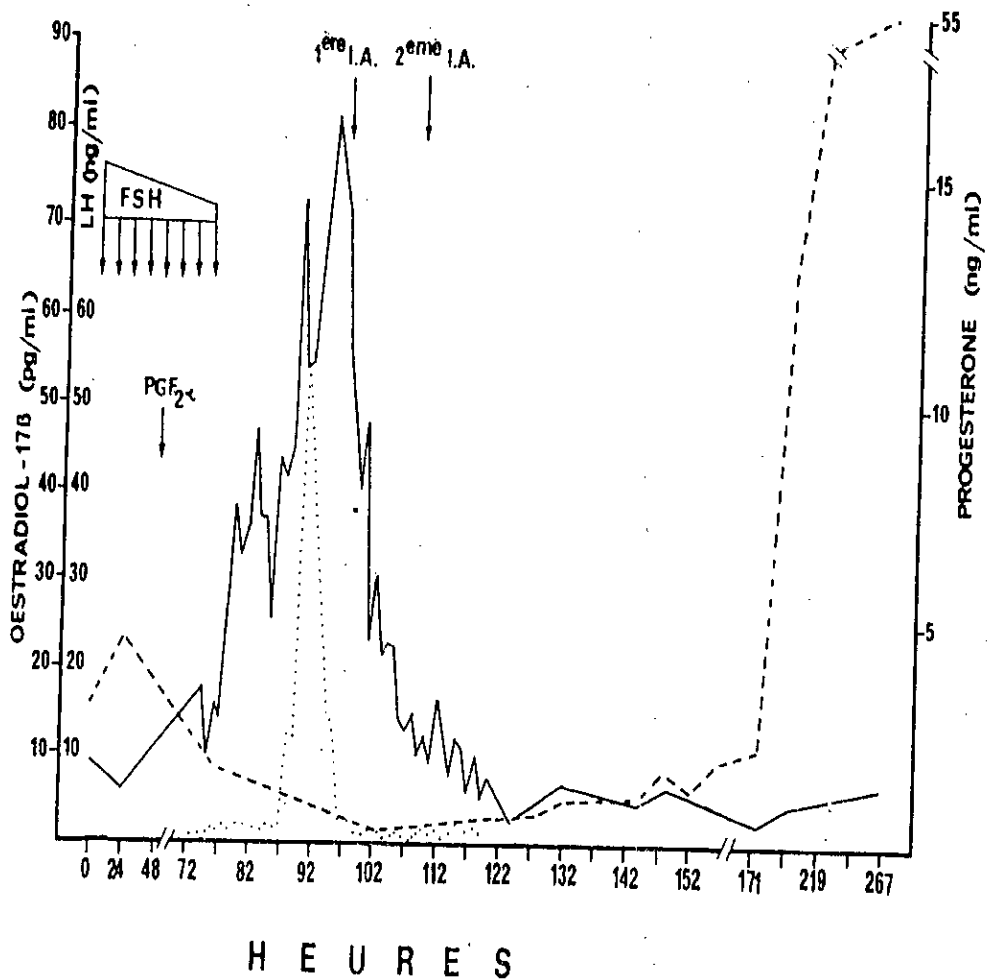


Figure 11 : Evolution des concentrations hormonales au cours d'un traitement de superovulation (Nibart et al, 1988).

4.5. Caractéristiques du profil hormonal de E2:

La concentration de l'œstradiol-17 β (E2) dans le sang périphérique représente un excellent marqueur de la croissance folliculaire chez les bovins, sur cycles normaux comme en superovulation (Saumande ,1980; Beckers et al, 1987). Les taux de E2 induisent la décharge préovulatoire de LH qui entraînera par la suite une diminution de la sécrétion de E2. Ainsi peu après la décharge de LH, la concentration en E2 atteint sa valeur maximale (50 à 150 pg/ml), soit 39 \pm 07h après injection de prostaglandines chez des génisses superovulées (Callessen et al, 1992). Ces taux vont pouvoir baisser après la décharge de LH soit 24 à 48 h pour revenir au niveau de base.

La production de E2 des follicules préovulatoires est reflétée par les taux sanguins qui augmentent progressivement jusqu'à l'apparition du pic de LH (Bever et Dielman ,1987). Chez les animaux superovulés les concentrations maximales de E2 sont corrélées significativement avec le nombre d'ovulations exprimés par le nombre de corps jaunes présents 6 à 7 jours après IA (Saumande et Batra, 1985; Goto et al, 1988; Callessen et al, 1990).

Il est toutefois fréquent d'observer lors d'une superovulation induite par la PMSG une nouvelle augmentation des teneurs plasmatiques en E2 après l'ovulation ; celles-ci sont maximales vers J4 et J6, à des niveaux parfois supérieurs à ceux du 1er pic. Ces taux élevés proviennent de nouveaux follicules en croissance sous l'effet de l'activité retard de la PMSG (Herrera, 1985).

Les valeurs mesurées d'E2 lors de superovulation par eCG dépassent fréquemment 100pg/ml comparées à ceux des vaches non stimulées qui avoisinent 10 à 20 pg/ml (Saumande, 1987). Une corrélation significative ($r=0,65$; $p<0,01$) entre les concentrations maximales d'E2 et le nombre de follicules préovulatoires a été mise en évidence lors d'un comptage par échotomographie pratiquée le jour de l'œstrus (Saumandé et Chupin ,1986).

Les concentrations sériques de E2 augmentent régulièrement chez des génisses superovulées par FSHp entre 6 et 30 heures après la PGF2 α et atteignent un pic à 54 heures.

Un effet hautement significatif du traitement, période de traitement et les concentrations de E2 ($p \leq 0,02$, $0,002$ respectivement) a été observé (Roberge et al, 1995).

4.6. Caractéristiques du profil hormonal de la Progestérone (P4) :

Les taux moyens de P4 augmentent après injection de FSH (5-10 ng/ml) en fonction des quantités de LH présentes dans les préparations (Nibart et Humblot, 1997), puis ces valeurs baissent de 90% dès 24 à 48 h après l'induction de la lutéolyse par la PGF2 α . Habituellement, les animaux présentant une bonne réponse en termes de production d'embryons témoignent d'une progestéronémie plus élevée trois jours après l'insémination.

Le dosage de la P4 avant traitement pourrait constituer un test de sélection des donneuses; ainsi pour des taux faibles de P4 correspondait une production d'embryons réduite pour Lange et Reichenback (1997). Une augmentation des niveaux de P4 au dessus de 2,5 ng/ml dans les deux ou trois jours qui suivent le pic de LH pourrait représenter un facteur important d'accroissement du nombre d'embryons viables (Chagas et al, 2001). En effet, différents auteurs ont ainsi observé des taux de P4 élevés dès 48 h après le pic de LH chez les donneuses présentant une bonne réponse (Slimane, 1984; Nibart et Humblot, 1997), au contraire chez les donneuses dont la réponse est faible, des taux de P4 faibles ont été enregistrés.

Classiquement, trois phases d'évolution de la progestérone dans le sang ont été observées (Hanzen et al, 1996):

- La première phase correspond à la période comprise entre le début du traitement et l'injection de la PG: une légère augmentation de la progestéronémie peut être observée, imputable à l'activité LH de la PMSG ou de la FSH.
- La seconde phase fait suite à l'injection de la PG: la progestéronémie atteint 25 % de sa valeur initiale en 12 heures et sa valeur seuil après 24 heures. La dose de PG injectée est sans influence sur la vitesse de la lutéolyse. En phase oestrale proprement dite, la progestéronémie est supérieure à celle observée chez des animaux non superovulés.

Elle n'est pas due à une lutéolyse incomplète mais résulte du fait que les follicules qui se sont développés en grand nombre sécrètent toujours un peu de P4, certains d'entre eux se

sont par ailleurs en partie lutéinisés sous l'effet de la composante LH des hormones de superovulation

- La troisième phase correspond à la période comprise entre l'apparition des chaleurs et le moment de la récolte; celle-ci est caractérisée par une augmentation plus rapide de la progestérone comparativement aux animaux non superovulés.

Deux types de profils anormaux de la progestéronémie furent également observés :

- L'un correspond à une lutéolyse incomplète et est responsable d'anomalies de l'ovulation; l'augmentation de la dose de PG ne permet pas d'éviter ce phénomène (Greve et al, 1995)
- L'autre type correspond à une régression prématurée des corps jaunes induits entre 5 à 16 jours après le traitement de superovulation. Ce fait serait dû aux quantités importantes de E2 résultant de l'activité prolongée de PMSG. L'utilisation d'anti-PMSG n'est pas de nature à résoudre le problème (Bever et Dielman 1987).

4.7. Caractéristiques ultra-structurales des ovocytes

Différentes études ont été menées afin de suivre les principales modifications structurales des ovocytes durant la période entre l'induction de la lutéolyse par la PGF2 α et l'apparition du pic de LH chez les femelles superovulées comparativement aux femelles à cyclicité normale (Assey et al, 1994; Greve et al, 1995). Les femelles à cyclicité normale montrent avant la lutéolyse, un noyau de l'ovocyte typiquement sphérique, contenant des nucléoles sphériques à fibrilles denses. Ce type de nucléoles est considéré comme inactif en rapport avec la transcription ribosomale (Camous et al, 1986).

Durant la période entre la lutéolyse et l'apparition du pic de LH, l'enveloppe nucléaire de l'ovocyte devient ondulante et les nucléoles perdent leur vacuolisation; étape initiale de la transcription ribosomale (King et al, 1988; Greve et al, 1995). Ultérieurement, le pic de LH déclencherait la maturation ovocytaire finale jusqu'à la métaphase II incluant la rupture de la membrane nucléaire associée à la disparition des nucléoles.

Ces données indiquent l'existence d'une phase appelée «*prématuration ovocytaire*» durant cette période entre la lutéolyse et le pic de LH avec la vacuolisation des nucléoles comme principale caractéristique. Par différentes expériences de maturation in vitro (Greve et

al, 1995) il a été prouvé que les ovocytes bovins sont dépendants de la phase de transcription ribosomale pour une durée de 2 à 3 heures; permettant la synthèse des protéines requises et sa progression jusqu'à la métaphase I (Kastrop et al, 1991).

Chez les femelles superovulées, les déviations sont fréquemment observées durant la période de prématuration de l'ovocyte. Plus de 90% des ovocytes collectés entre la période de lutéolyse et le pic de LH sont caractérisés par un manque de vacuolisation des nucléoles, une condensation de la chromatine et enfin un compartiment étendu du réticulum endoplasmique granuleux comparativement aux femelles non superovulées (Assey et al, 1994; Hyttel et al, 1997).

Ces phénomènes permettent d'expliquer la haute incidence des ovocytes qui sont bloqués à la métaphase I de la maturation ovocytaire durant les traitements de superovulation, ce qui leur fait perdre la capacité de produire les protéines nécessaires pour leur progression à travers les étapes de la méiose. Ce concept était en fait avancé par Moor et al, (1980) qui ont démontré, lors de maturation ovocytaire in vitro chez des brebis superovulées, une synthèse anormale des protéines.

D'autres travaux (Assey et al, 1994; Roberge et al, 1995) faisaient état également de la moins bonne aptitude des ovocytes superovulés par rapport aux ovocytes non stimulées, caractérisée par un défaut de maturation ovocytaire (nucléaire et/ou cytoplasmique), des concentrations intrafolliculaires réduites en E2 et P4, aboutissant à de faibles taux de développement embryonnaire.

5. Facteurs de variation de la réponse aux traitements superovulateurs

5.1. Facteurs intrinsèques:

5.1.1. Etat des ovaires:

Les variations dans les résultats de la superovulation est étroitement lié à l'importance de la réserve ovarienne en follicules primordiaux. En effet il existe une forte corrélation entre la population folliculaire totale avant la superovulation et le nombre des structures lutéales dénombrées après ce traitement (Monniaux et al., 1983). Un ovaire contenant un nombre de follicules de diamètre supérieur à 70 μ et inférieur à 200, donne une réponse lutéale inférieure

ou égale à 5. Elle peut atteindre 8 lorsque le nombre de ces follicules est supérieur à 500. L'échographie montre qu'il existe une corrélation entre le nombre de follicules de 2 à 5 mm de diamètre présents le jour du traitement et le nombre d'embryons collectés (Van Der Schams, 1988)

5.1.2.L'âge:

L'âge est un facteur de variation très important, en effet les vieilles donneuses répondent moins bien aux traitements de superovulation que les jeunes. Cela est probablement dû à la diminution avec l'âge de l'animal du nombre de follicules quittant la réserve ovarienne (Pedersen, 1972) ce qui implique une réponse moins bonne aux stimulation de l'ovaire (Greve, 1982; Halsteret al., 1981). La faible réponse de cette catégorie d'animaux a été confirmée par Desaulniers et al. (1995). Certains auteurs situent l'âge de réponse maximale entre 5 et 6 ans (Gordon, 1996). Il faut noter enfin que ce n'est pas seulement le nombre d'embryon des vaches âgées qui est affecté mais leur qualité également (Donaldson, 1984a).

5.1.3.La race:

Si nous considérons les moyennes d'embryons récoltés dans différents pays, il semblerait que la race ait un rôle à jouer dans les réponses à la superovulation. En France, le nombre moyen d'embryons récolté est de 4.6 pour la frison-holstein, la normande et la charolaise, alors qu'il est de 3.9 chez la blonde d'aquitaine (Nibart et Thibier, 1987). Aux Etats unis, la moyenne est de 6.6 embryons pour les races Brangus et simmental, et 2.8 pour la longhorn (Donaldson, 1984b), Breuel et al. (1991) ont remarqué un nombre important d'embryons transférables chez la simmentale et ont rapporté une plus grande sensibilité de cette race aux gonadotropines. En Belgique la moyenne se situe autour de 3.6 pour la bleu Blanc Belge (Touati et al., 1989a et b).

5.1.4.Intervalle post-partum:

L'influence de l'anoestrus du post-partum sur les résultats de la superovulation est évidente, elle est due à l'influence négative de cette période sur la folliculogénèse. Il importe donc de ne pas intervenir trop tôt après le vêlage (Greve, 1982), un intervalle de 60 jours entre la mise bas et l'établissement d'un traitement est un minimum à respecter pour avoir une réponse

convenable (Nibart, 1991). Au delà de cet intervalle il ne semble pas y avoir de différence significative concernant le nombre moyen d'embryons (Combarnous, 1996).

5.1.5.La production laitière:

Il ne semble pas y avoir un effet néfaste du niveau de production laitière sur la réponse au traitement de superovulation (Greve, 1982). Certains auteurs ont même constaté une baisse du nombre d'embryons transférables chez les vaches tarées (Darron et al.1982).

5.2.Facteurs extrinsèques:

5.2.1.La saison:

L'effet de la saison est probablement dû aux variations de températures, en effet l'exposition de génisses superovulées à des températures de 30 à 42 °C aurait pour conséquence de réduire le pourcentage d'embryons utilisables de 51.5% à 20.7% (Putney et al., 1988). Almeida (1987b) en Israël et Gordon et al. (1987) en Arabie Saoudite ont signalé une chute du rendement des vaches superovulées durant l'été. Les mêmes constatations ont été faites au Danemark dans une étude faite durant les mois de décembre à janvier (Hoffman et al., 1988) de même qu'en Belgique durant les mois de novembre à février (Touati et al, 1989a). Toutes ces études nous amènent à penser que la saison a un certain effet sur la production d'embryons.

5.2.2.Alimentation, éléments d'ambiance et stress

Il est évident qu'en ce qui concerne la superovulation, le fait de mettre les animaux dans des conditions d'habitat convenable améliore considérablement les réponses. C'est le cas aussi du facteur alimentaire. Delacharlerie et al. (1995) ont montré que des vaches élevées en mode extensif donnaient moins d'embryons de bonne qualité par rapport à celles mises en mode intensif. Mantovani et al. (1993) ont montré une diminution importante de la viabilité des embryons produits chez des vaches superovulées et alimentées par une ration riche en concentré 75 jours avant le traitement même si le nombre ne montre pas de variations significatives.

Il est important de signaler que tout type de stress qu'il soit alimentaire ou d'une autre origine est néfaste, c'est pourquoi il est important d'éviter même les manipulations intempestives et faire en sorte qu'il n'y ait pas de changement brutal aussi bien des éléments d'ambiances que de l'alimentation.

5.2.3.Effet de l'extrait hypophysaire utilisé :

La variabilité des résultats est très fortement influencé par la nature de l'extrait hypophysaire utilisé et cela est imputé à plusieurs éléments : le rapport FSH/LH, les doses utilisées, le degrés de purification des hormone et donc le niveau de contamination de la FSH par d'autres hormones hypophysaires.

Il ne s'agit pas de préparations pures, mais d'un mélange de FSH et de LH où la LH entre en proportion variable, comme contaminant. Actuellement, la FSH est obtenue à partir d'extraits hypophysaires d'origine porcine (pFSH) et rarement d'hypophyses d'origine équine (eFSH) ou ovine (oFSH). Le rapport FSH/LH est très variable d'une préparation à l'autre comme le montre le tableau 4

Tableau 4: Préparations commerciales hypophysaires utilisées pour la superovulation (Baril et al,1993; Nibart et al, 1997)

Nom commercial	Hypophyse	Rtio FSH/LH
FSH-P Rigaux (FR)	porcine	2/1
FSH-P Rigaux (FR)		
Stimufol (Belgium) (Merrial – FR)	porcine	1/5
Ovagen Ovagen	ovine	1/100
Folltropin (Can) Vetepaharm	porcine	1/1000
Superov (USA) Ausa International	porcine	1/100

On a noté que les nombres d'ovulations et d'embryons collectés augmentent en même temps que la dose totale atteignant ensuite un plateau où le nombre d'embryons transférables est maximum (Donaldson, 1984) (Tableau 5).

Tableau 5: Effet de la dose de FSH sur la production d'embryons chez les bovins (Donaldson, 1984).

Dose totale (mg Armour)	Nombre d'animaux	Embryons Récoltés	Embryons transférables	Embryons de qualité
20	20	2.6±2.8	2.1±2.8	72%
28	20	10.1±7.1	3.9±2.7	47%
40	20	8.7±7.9	2.5±3.4	35%
60	20	6.3±6.0	0.9±1.4	16%

Des travaux menés par Donaldson (1987) auraient montré que les faibles taux de fécondation obtenus avec la FSHp seraient imputables à la quantité de LH présente en association avec l'FSH et non au nombre d'IA effectuées. Les conditions de production d'une quantité importante d'embryons de bonne qualité doivent être adaptées en modifiant la proportion LH/FSH dans laquelle l'extrait hypophysaire devrait contenir une faible quantité de LH. Beckers (1987) et Kanitz et al, (1992) en comparant la croissance folliculaire au cours de 3 types de traitement de superovulation par la FSH : (0,29mg FSH); (0,29mg FSH + 0,19mg LH) et (0,19mg LH) font remarquer que des quantités élevées de LH dans les traitements de superovulation auraient des effets négatifs sur la croissance folliculaire et entraîneraient leur atrésie. Les mêmes résultats ont été également retrouvés par Mapletoft, (1993) qui a observé que l'effet détériorateur des traitements de superovulation serait dû aux fortes concentrations de LH. D'autres raisons de la variabilité des résultats de la superovulation par FSH furent également évoquées par Lindsell et al, (1986); cela concernait la mauvaise standardisation du seul produit commercialisé à cette époque; le FSHp (Burns Biotech). La quantité de FSH comme le rapport des quantités FSH/LH étaient très variables d'un lot de fabrication à un autre. Ces résultats ont conduit plusieurs laboratoires à mettre en place leur propre production de FSH, la plupart du temps d'origine porcine (Beckers, 1987). En France, parmi les préparations commerciales les plus utilisées sur le terrain, le StimufolND (Merrial, France) aurait permis d'obtenir une bonne stabilité des réponses (Nibart, 1997) (tableau 6)

Tableau 6 : Productions d'embryons par de vaches superovulées par FSH selon le lot de fabrication (Données UNCEIA, Octobre 93-Juillet 95)

N° du lot De Stimufol	Nombre de femelles		Nombre moyen d'embryons par femelle collectée
	Superovulées	Collectées	
A	192	190	9.5
B	487	471	9.6
C	102	92	10.1
D	260	250	9.7
E	189	179	9.9
F	63	63	9.4
G	200	194	8.9
Total	1493	1439	9.6
		96,4%	

De récents progrès enregistrés dans le domaine de la biotechnologie (ADN recombinante) ont permis de produire de la bFSH (bovine FSH) avec des niveaux de pureté élevée et caractérisés par une absence de contamination de protéines et/ou autres gonadotrophines et donc éventuellement commercialisable (Looney et Bondioli, 1988). La bFSH recombinante a démontré qu'elle possédait une haute activité biologique d'après l'évaluation des doses faite par Bellow et al, (1991) chez la vache à viande, en induisant chez celle-ci d'excellentes réponses de superovulation.

6. Collecte d'embryons :

Il existe en fait deux techniques de récolte selon les espèces, la méthode chirurgicale à travers une laparotomie, et la méthode non chirurgicale par voie cervicale, c'est cette dernière que nous allons développer car c'est la technique que nous avons appliquée dans notre travail.

La technique non chirurgicale a été développée chez les vaches hautes productrices, car elle facilitait énormément la récolte et réduisait les risques liés à l'acte chirurgical

(Gordon, 1996), son efficacité en a fait une méthode d'utilisation courante car elle donne les mêmes résultats que la technique chirurgicale.

La collecte est réalisée entre j6 et j8 post oestrus et en général à j7, par voie cervicale (Brand et al., 1978 ; Newcomb, 1980). Avant de procéder à la collecte un examen des ovaires devra être fait afin d'identifier les structures ovariennes existantes à ce moment et estimer la leur réaction au traitement, une anesthésie épidurale basse est réalisée préalablement pour éliminer le péristaltisme facilitant la manipulation. Une dilatation cervicale est produite, surtout chez les génisses, grâce à un dilateur métallique, ou encore médicalement en administrant certaines substances tel que le carbachol (Gordon, 1996), le reste de la technique consiste en un rinçage individuel des cornes utérines avec 350 ml d'une solution de tampon phosphate (PBS) introduit au travers d'une sonde à trois voies ou à double voies dont une pour gonfler le ballonnet quelque soit la sonde, les voies d'injection et de récupération du liquide sont séparés pour la première et communes pour la deuxième. Une variante de cette technique consiste à faire un deuxième lavage des cornes utérines. L'augmentation du nombre d'embryons récoltés est considérable et la moyenne est passée de 3,97 à 5,97 (Touati, 1993) comme le montre le tableau 7.

Tableau 7 : Nombre et moyenne d'embryons récoltés après un ou deux lavages des cornes utérines (Touati, 1993)

	Nbr de récoltes	Nbr d'emb. récoltés		Nbr d'emb. utilisables	
		N	m	N	m
Lavage 1	38	274	7.21	151	3.57 (55.1%)
Lavage 2	38	113	2.97	76	2.00 (67.2%)
Total	38	387	10.18	227	5.97 (58.6)

7. Classification des embryons :

Les embryons récoltés après superovulation ou fécondation in vitro se présentant sous des aspects morphologiques divers, il est important d'en apprécier la qualité avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques éventuelles. Divers critères ont été

proposés. Les uns évaluent les caractéristiques morphologiques de la pellucide et des blastomères et vérifient si elles sont en accord avec le stade du développement. Des valeurs de diamètre externe de l'embryon et de l'épaisseur de la pellucide ont dans ce but été déterminées (Lonergan, 1992) (Tableau 8).

Tableau 8: Diamètres externe (DE) et épaisseur de la pellucide (EP) d'embryons bovins en fonction du stade de développement embryonnaire (Lonergan, 1992)

Stade de développement	N	DE (μ)	EP (μ)
2 cellules	13	148	13.7
4 cellules	31	149	14.1
8 cellules	15	149	13.4
J6 morula	37	150	14.5
J6 morula/ Jeune blastocyste	18	150	13.1
J7 jeune blastocyste	18	158	11.7
J7 blastocyste	30	167	9.6
J8 blastocyste	46	182	7.9
J9 blastocyste	56	200	5.6

D'autres moins couramment utilisés se basent sur le nombre de cellules identifiées à un stade de développement donné, l'activité enzymatique (test à la FDA : Fluorescéine Di-Acétate) transformé sous l'action d'estérases présentes dans les cellules vivantes en un composé non fluorescent) ou métabolique (consommation de glucose en culture, synthèse de lactate deshydrogénase) ou encore sur le délai voire les modalités d'éclosion du blastocyste une fois sa phase d'expansion réalisée.

Une fois récoltés, les embryons seront placés dans 2 à 3 ml de milieu de récolte propre et examinés aux grossissements 10-40 pour en préciser les éléments morphologiques généraux. Les blastocystes dits normaux seront isolés des autres. Les blastocystes jugés anormaux seront ensuite examinés au grossissement 120 pour en préciser les caractéristiques cellulaires. Ils seront à nouveau examinés après 4 à 6 heures.

Dans la pratique courante, les critères morphologiques sont les seuls utilisés (Eldsen et al., 1978; Schneider et al., 1980; Shea, 1981; Wright, 1981). Le principe de la méthode se base sur la concordance entre l'aspect morphologique et le stade du développement dont l'appréciation se fait sur la base d'un certain nombre d'observations proposées par l'I.N.R.A. (1980) qui sont les suivants:

-La zone pellucide:

a/sphéricité

b/épaisseur

c/fissure

-Le blastocyste:

a/forme générale

b/régularité

c/opacité

d/structures visibles: trophoblaste, amas interne, blastocoele

-Les cellules:

a/aspect des contours cellulaires

b/variation de tailles entre cellules

c/cellules dans l'espace périvitellin

d/intégrité des cellules: présence de vacuoles, dispersion de matériel cellulaire, granulations en périphérie.

L'intervalle entre l'oestrus et le jour de la récolte détermine le stade du développement (tableau 9). Au jour 6 post-oestrus, l'embryon doit être une morula compacte (tight morula) et doit contenir 50 à 80 cellules de taille uniforme. A 7 jours l'embryon est un blastocyste, il contient une cavité blastocoelique.

Tableau 9: le stade du développement embryonnaire normal en fonction du jour de l'oestrus
(Seidel et al., 1991)

Stade de développement	jours après l'oestrus
1 cellule	0-2
2 cellules	1-3
4 cellules	2-3
8 cellules	3-5
16 cellules	4-5
jeune morula	5-6
morula compacté	5-7
jeune blastocyste	7-8
blastocyste	7-9
blastocyste expansé	8-10
blastocyste éclos	9-11

Du point de vue morphologique, Loonergan propose les critères de classification suivants:

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

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

-Classe 1 (excellent):

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

-Classe 2 (bon)

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

-Classe 3 (Moyen)

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

-Classe 4 (mauvais):

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

-Classe 5 (dégénérés):

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

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

Il existe en général une corrélation entre l'aspect morphologique des embryons et le développement après transfert, mais il arrive parfois que des embryons classés moyens ou mauvais se développent normalement alors que d'autres classés excellent ne donnent lieu à aucune gestation (Shea, 1981). Cela est illustré par le **Tableau 10**.

Tableau 10: Les taux de gestation des embryons classés dans 4 groupes basé sur la morphologie (Shea, 1981)

Classification	Nombre	Pourcentage d'embryons	Taux de gestation
Excellent	275	54	63*
Bon	153	30	58*
Moyen	42	8	31*
Pauvre	42	8	12*

*taux de gestation avec différentiels $p < 0.05$

8. Cryoconservation des embryons:

Le développement considérable des techniques de production d'embryons a permis d'augmenter d'une manière considérable le nombre d'embryons de très bonne qualité (classe 1 et 2), alors que le terrain n'offre pas toujours la possibilité d'un transfert directe faute de receveuses, ce qui a poussé les chercheurs à élaborer des procédés de conservation. C'est ainsi qu'on a pensé à la cryoconservation qui permet de dissocier les opération de collecte et de transfert. C'est avec les souris qu'a commencée en 1972 la congélation des embryons mammifères (Whittingham et al., 1972), l'espèce bovine a suivie en 1973 avec le premier veau né d'embryon congelé (Wilmot et Rowson, 1973). Ces premières tentatives étaient trop complexes pour être d'usage courant, et c'est à partir des travaux de Willadsen en 1977 sur des embryon ovins qu'on a pu élargir les possibilités d'utilisation de la congélation en appliquant la technique sur les embryons bovins. Le **Tableau 11** montre l'évolution par espèce de la cryoconservation d'embryon.

Tableau 11 : Evolution de la cryoconservation chez les différentes espèces (Touati 1993)

<i>Espèce</i>	<i>Année</i>	<i>Référence</i>
<i>Sourie</i>	1972	Whittingham et al.
<i>Lapin</i>	1972	Bank et Maurer
<i>vache</i>	1973	Wilmut et Rowson
<i>Mouton</i>	1974	Willadsen et al.
<i>Rat</i>	1975	Whittingham
<i>Chèvre</i>	1976	Bilton et Moor
<i>Cheval</i>	1982	Yamamoto et al.
<i>Antilope</i>	1983	Kramer et al.
<i>Humain</i>	1983	Trounson et Mohr
<i>Babouin</i>	1984	Pope et al.
<i>Hamster</i>	1985	Ridha et Dukelow
<i>Singe</i>	1986	Balmaceda et al.
<i>Chat</i>	1988	Dresser et al.

8.1.Rappels physiologiques et biophysiques sur la cryoconservation:

8.1.1.Cristallisation:

Au cours du refroidissement d'une solution saline, l'apparition du premier cristal de glace marque le début du changement de phase. Celui ci ne peut se former que lorsque la température est inférieure ou égale au point de congélation de la solution, qui dépend de la concentration en solutés dissous, celui de l'eau est de 0°C, celui d'une solution de PBS est de -0.8°C, tandis que celui d'une solution de PBS contenant 1.5 M de glycérol se situe au environ de -4.5 °C.

pour qu'il y ai formation de cristaux de glace il faudra non seulement que sa température descende en dessous de son point de congélation mais qu'il y ait amorce de la cristallisation (vibration, choc mécanique ou thermique, ou même présence d'une impureté). Tant que cette amorce n'existe pas la température du liquide continue à s'abaisser sans changement de phase. Au moment où la cristallisation s'amorce, la température remonte

brusquement jusqu'au point de congélation, c'est ce qu'on appelle la surfusion. La glace se forme puis la température du milieu descend progressivement pour s'équilibrer avec la température de l'enceinte de congélation formant ainsi le pic de surfusion. Une valeur trop importante à celui-ci est préjudiciable à la survie de l'embryon (Whittingham, 1977; Moore et Bilton, 1977; Leibo et Mazur, 1978).

Dans le cas où la solution contient un embryon celui-ci va s'entourer progressivement de glace extra-cellulaire sans qu'il se produise un changement de phase dans les cellules (Leibo et al., 1975). Cette formation de glace limitée par la membrane plasmique de la cellule (Leibo et al., 1975) (Mazur, 1965) va entraîner une augmentation de la concentration en solutés du milieu extra-cellulaire et donc une réponse de l'embryon qui va rétablir son équilibre osmotique avec le milieu environnant en se déshydratant.

La vitesse de déshydratation d'une cellule dépend de trois paramètres (Leibo 1977 et 1980):

- la conductivité hydraulique (coefficient de perméabilité à l'eau)
- son activation d'énergie ou variation de ce coefficient avec la température
- le rapport de la surface/volume de la cellule.

C'est ainsi qu'en pratique, la cristallisation est amorcée quand la température du milieu de congélation des embryons est inférieure de 1 à 2 °C à son point de congélation (Renard, 1985) soit -6.5 à -7°C pour une solution de PBS contenant 1.5 M de glycérol.

Afin de déshydrater l'embryon, d'éviter la formation de gros cristaux et d'abaisser le point de congélation, l'adjonction de cryoprotecteurs est nécessaire.

8.1.2. Addition des cryoprotecteurs dans le milieu de congélation:

La survie de l'embryon soumis à la congélation n'est possible que si on ajoute un cryoprotecteur au milieu. Ces substances modifient les caractéristiques physiques des solutions (Farrant et Woolgar, 1970). Le cryoprotecteur permet en se substituant à l'eau de diminuer le risque d'apparition de glace intracellulaire, évitant ainsi l'effet de très forte concentration saline dans la cellule (Nibart et Bouyssou, 1981). La plupart des cryoprotecteurs sont des alcools, bien connus pour leur bonne miscibilité à l'eau due à des liaisons hydrogènes entre les groupements OH de l'alcool et la molécule d'eau. Parmi les différents cryoprotecteurs, certains pénètrent dans la cellule et ont un faible poids moléculaire, d'autres ne pénètrent pas et présentent le plus souvent un poids moléculaire élevé.

-Cryoprotecteurs pénétrants:

Méthanol	CH ₃ (OH)	PM=32
Ethanol	C ₂ H ₅ (OH)	PM=46
Ethylen Glycol	C ₂ H ₄ (OH) ₂	PM=62
1-2-isopropanediol	C ₃ H ₆ (OH) ₂	PM=76
Glycérol	C ₃ H ₅ (OH) ₃	PM=92
Diméthylsulfoxyde	(CH ₃) ₂ SO	PM=78

Ils remplacent osmotiquement une partie de l'eau intracellulaire avant le refroidissement, atténuent les changements brutaux du volume des cellules et réduisent la taille des cristaux de glace lors du refroidissement.

-Cryoprotecteurs non pénétrant

Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	PM=342
Polyvinyl-pyrrolidone		PM=40.000
Amidon		PM=97.000
Serum et albumine bovine		PM=67.000

Ils agissent soit en augmentant la pression osmotique extracellulaire, et de ce fait, participent à la déshydratation des cellules (cas des sucres), soit en contribuant à la protection physique des membranes extracellulaires lors de la formation des cristaux de glace (cas du polyvinylpyrrolidone ou l'albumine).

Parmi les cryoprotecteurs qui pénètrent dans la cellule, les plus utilisées sont le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol, le propanédiol (Rall et al., 1984).

La vitesse de diffusion du cryoprotecteur dépend du coefficient de perméabilité, qui lui-même dépend de la température et du stade de développement de l'embryon (Jackowski et al., 1980). En fixant une partie de l'eau extra-cellulaire, les cryoprotecteurs abaissent le point de congélation et diminuent la quantité de glace, empêchant ainsi la formation de gros cristaux qui peuvent se former au cours de la congélation et de la décongélation (Boutron et Kauffman, 1978).

Les cryoprotecteurs qui ne pénètrent pas dans la cellule interviennent principalement soit par action sur la membrane cytoplasmique (Williams, 1983) soit uniquement par déshydratation, tel le cas du sucrose qui ne pénètre pas dans la cellule malgré son faible poids moléculaire.

Si les cryoprotecteurs présentent un effet bénéfique lors de changement de phase du milieu intra-cellulaire, il ne faut pas oublier qu'ils peuvent être toxiques et que cette toxicité dépend de leur concentration, du mode de contact avec la cellule, de l'osmolarité du milieu et

de la température. Cette toxicité est réduite à basse température et diminue en général lors d'association de plusieurs cryoprotecteurs.

8.1.3. Vitesse de congélation et de déshydratation de l'embryon:

Lorsque l'eau extra-cellulaire se congèle, l'eau intracellulaire acquiert au cours de la suffusion une certaine quantité d'énergie qu'elle utilise ensuite différemment suivant la vitesse de congélation:

-si la vitesse est élevée, l'eau ne sort pas de la cellule, son énergie augmente et elle se congèle brusquement. Les risques de formation de cristaux de glace intracellulaire augmentent et les dégâts cellulaires sont provoqués par la présence de gros cristaux à la congélation ou à la décongélation (Mazur et al., 1970)

-si la vitesse est lente, l'eau sort de la cellule car la perméabilité cellulaire est élevée. Dans ce cas la perte de viabilité des cellules est liée à la modification des propriétés des solutions dont la concentration en solutés croît à la fois à l'extérieur de la cellule par la formation de cristaux de glace (Lovelock, 1953) et à l'intérieur des cellules par déshydratation pour maintenir l'équilibre osmotique avec le milieu extérieur concentré (Meryman, 1971).

8.1.4. La décongélation:

De nombreux travaux réalisés sur les souris (Leibo et al., 1974); Whittingham et al., 1979; Leibo, 1981) nous montrent que lorsque les cellules sont fortement déshydratées, leur survie est élevée (supérieure à 70%) à condition que la vitesse de réchauffement soit faible (3°C à 20°C/min) ce qui limite les variations osmotiques trop brutales (Ferrant et al., 1977). Par contre quand les cellules contiennent une certaine quantité de glace intra-cellulaire, ce qui est le cas lorsque les embryons passent de -35°C directement dans l'azote liquide, la survie de ceux-ci est bonne si la vitesse de décongélation est élevée (supérieure à 200°C/min) ce réchauffement rapide évite la recristallisation de l'eau.

8.1.5. Retrait du cryoprotecteur:

Après la décongélation, les cellules embryonnaires se retrouvent dans un milieu riche en cryoprotecteurs ce qui est nocif pour leur survie ultérieure (Willadsen et al., 1976). Il faut donc l'éliminer le plus rapidement possible mais malheureusement, contrairement à d'autres

UNIVERSITE "SAAD DAHLEB" - BLIDA

Faculté agro-vétérinaire et biologie

Département des sciences vétérinaires

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de magister

en sciences vétérinaires

Option : Reproduction

Thème:

Etude comparative de deux extraits hypophysaires dans la
production d'embryons chez les bovins

Présenté par:

ADEL Djallal

GUETARNI D. MC (Université de Blida)	Président
KAIDI R. MC (Université de Blida)	Examineur
NIAR A. MC (Université de Tiaret)	Examineur
FERROUK M. CC (Université de Blida)	Examineur
LAFRI M. CC (Université de Blida)	Promoteur
TOUATI K. attaché scientifique auprès du doyen (Faculté de médecine vétérinaire de liège)	Co-promoteur

2003/2004

types cellulaires, les embryons sont sensibles au choc osmotique. Leur perméabilité à l'eau est plus grande que leur perméabilité aux solutés. Des mouvements d'eau trop rapide provoquent le gonflement et l'éclatement des cellules qui tendent à réaliser l'équilibre osmotique. Plusieurs méthodes ont été proposées pour assurer le retour de l'embryon à des conditions physiologiques normales. La dilution par étapes dans des solutions contenant des concentrations décroissantes de cryoprotecteur (Whittingham et al., 1972; Willadsen et al., 1977; Wilmut et al., 1975) permet de limiter la vitesse de pénétration de l'eau dans la cellule. La dilution en une seule étape est possible, en présence d'un composé qui ne pénètre pas dans les cellules, en l'occurrence le sucrose. Celui-ci assure une dilution progressive de cryoprotecteur par simple diffusion passive, comme cela a été montré chez la souris (Leibo et al., 1975) et la vache (Renard, 1982).

8.2. Protocole de cryoconservation:

La congélation n'est pas permise pour tous les stades embryonnaires, la tolérance aux basses températures coïncide avec la compaction et la cavitation (Trounson et al., 1976), cela correspond à des embryons de 6.5 à 7 jours au stade morula compacte, jeune blastocyste ou blastocyste expansé. Différents travaux ont montré que l'embryon bovins de 7 jours supportait parfaitement le choc osmotique s'il est mis directement à température ambiante, dans une solution de PBS contenant 1.5 M de glycérol. Il se mettra en équilibre avec cette solution en 10 à 15 minutes (Lehn-Jensen, 1983; Schneider et Mazur, 1984), au moment de la décongélation par contre, la dilution directe dans le PBS provoque la lyse des cellules embryonnaires. Pour éviter ce phénomène une dilution du cryoprotecteur en une étape par le sucrose a été proposée (Leibo et Mazur, 1978). C'est en 1982 que Leibo et al. ont appliqué cette technique aux embryons bovins. Ces observations sont à l'origine d'une méthode de cryoconservation dite "congélation équilibrée". Une autre alternative pour la cryoconservation a été mise au point, c'est une méthode de congélation rapide empêchant la formation de cristaux, c'est la vitrification.

8.2.1. La congélation équilibrée:

A/Équilibration dans le milieu cryoprotecteur:

C'est une méthode éprouvée depuis plus de 20 ans, pour congeler la plupart des embryons de mammifères. Le principe est d'induire une déshydratation progressive des embryons par substitution d'une partie de l'eau intracellulaire par une solution de cryoprotecteur perméable. Cette technique implique l'utilisation d'un congélateur programmable afin de contrôler l'équilibre de température lors de l'application de la courbe de congélation.

Le cryoprotecteur le plus employé pour la congélation d'embryons bovins est le glycérol. Les embryons sont mis pendant 10 minutes à température ambiante dans du PBS contenant 10% de glycérol (Lehn-Jensen, 1983), une fois ce temps écoulé ils pourront être conditionnés en paillettes.

B/Congélation:

Les embryons conditionnés en paillette sont placés dans le congélateur réglé à -7°C pendant 4 minutes pour une première stabilisation. La cristallisation est ensuite amorcée en touchant chaque paillette avec une pince métallique refroidie dans l'azote liquide. Après deuxième stabilisation de 5 minutes à -7°C , les embryons sont refroidis progressivement jusqu'à -35 (Massip, 1986) à raison de $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ensuite plongé directement dans l'azote liquide.

C/Décongélation et déglycérolisation:

Elle est réalisée en agitant les paillettes dans de l'eau à 20°C jusqu'à disparition de la glace, le glycérol qui a servi comme cryoprotecteur, peut être éliminé de deux manières:

-soit en faisant passer les embryons par 3 bains successifs de concentration décroissante en glycérol (7.5%, 5%, 2.5%), à raison de 5 minutes par bain, et rinçage dans 3 bains de PBS (Lehn-jensen Greve, 1981).

-soit en les faisant passer pendant 10 à 20 minutes dans une solution de sucrose à 1 M avant de les plonger dans du PBS (Lehn-Jensen, 1983).

Après ces opérations seules les embryons non dégénérés seront transplantés. On a pu obtenir jusqu'à 50% de gestation si on congèle des embryons de bonne et d'excellente qualité (Lehn-Jensen et Rall, 1983).

Partie expérimentale

1. Introduction

La production d'embryons, dans l'espèce bovine, par des traitements de superovulation dépend de plusieurs facteurs, tel que la race, l'âge, la saison et l'état de l'ovaire pour ne citer que quelques un. Parmi ceux ci, celui qui a le plus d'impacte est l'extrait hypophysaire utilisé. Ce dernier a une grande importance aussi bien du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif. Suite à cette constatation, nous avons essayé dans ce travail d'étudier la réaction de deux groupes de bovins à deux traitements de superovulation, utilisant deux extraits hypophysaires d'origines différentes et de comparer ainsi les différents résultats. Les extraits hypophysaires utilisés dans cette étude se trouvent dans le commerce et proviennent de deux laboratoires de pays différents. Le premier est produit par la firme espagnole (Pluset), le second est produit par le laboratoire du Prof. Beckers de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'université de Liège en Belgique (Stimufol). Contrairement au Pluset, la dose exacte de FSH et le rapport de LH du Stimufol sont bien connus (Beckers, 1987).

2. Matériel et méthodes

2.1. : Animaux

L'étude utilisant le premier extrait hypophysaire (Stimufol) a été effectuée sur un cheptel de la station expérimentale de la faculté agro-vétérinaire et biologie de l'université Saad Dahleb de Blida, constitué de 06 vaches laitières dont 05 de race pie noire et une de race pie rouge dont l'âge varie de 3 ans à 6 ans. Ces animaux sont en pleine lactation avec une production journalière moyenne de 10 à 15 litres. La majorité de ces vaches (4) sont pluripares (2 à 3 veaux) et les deux autres sont primipares (2). L'examen général et spécial de ces animaux n'a montré aucune affection du tractus génital et un état d'embonpoint variant entre 2 et 3. L'alimentation était composée de fourrage vert (trèfle) de leste (paille de blé et d'orge) ainsi qu'un complément d'aliments concentrés, un supplément minéral était mis à la disposition des bêtes sous forme de pierres à lécher. Tous ces animaux présentent un cycle sexuel régulier.

Le cheptel a été réparti en 02 lots comportant chacun 03 vaches. Les traitements de superovulation ont été effectués à un jour d'intervalle sur chaleurs provoquées et non naturelles (cf. chapitre 2.4) afin de faciliter le travail et de permettre une meilleur surveillance des vaches.

Deux autres vaches pie rouges de la même étable ont été préparées afin de servir de receveuses pour d'éventuels embryons, ainsi que 4 vaches de race locale (Cheurfa), elles étaient dans les mêmes conditions que les donneuses, et alimentées de la même manière.

Les animaux ayant été traités au deuxième extrait hypophysaire (Pluset) a été effectuée sur le cheptel d'une ferme privée dans la localité de Beni Mered à environ 15 Km de l'université composé de 12 vaches laitières dont 7 pie noires, 3 pie rouges et 2 suisses et dont l'âge varie de 2 à 6 ans. Les vaches sont pour la plupart des primipares (7). L'état d'embonpoint varie entre 2 et 3.5, et l'examen clinique n'a révélé aucune affection du tractus génital. L'alimentation était composée de fourrage vert de prairie sans aucun complément.

Le cheptel a été réparti en 4 lot de 3 vaches chacun, les traitements de superovulation ont été effectués, comme pour le premier lot, sur cycle maîtrisé et à un jour d'intervalle entre les lots. Aucune receveuse n'a été préparée.

2.2. : Matériel

Le matériel de récolte, de transfert et de congélation comporte :

- une sonde souple avec mandrin métallique (*sonde de folley*). La sonde est à double voie, une voie pour gonfler le ballonné situé à 5 cm de l'extrémité et une voie d'injection et de récupération du liquide de lavage des cornes utérines.
- une seringue de 50 ml qui sert à administrer et récupérer le liquide de lavage de la corne utérine.
- une bouteille stérile d'un litre permettant de contenir le liquide de lavage.
- une loupe binoculaire indispensable à la mise en évidence des embryons.
- une boîte de pétrie carrée et quadrillée.
- des petites boîtes de pétrie rondes où sont stockés les embryons récupérés avant leur classification, leur lavage et leur équilibration dans des milieux cryoprotecteurs avant congélation.
- une micropipette montée sur une seringue à insuline qui permet la manipulation des embryons.
- un biocongélateur programmable.
- un pistolet de transfert de type Cassou.

2.3. : Extraits hypophysaires et traitements

La solution utilisée est le STIMUFOL produite par l'équipe du Pr. Beckers de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Belgique). Cette solution comporte deux gonadotropines purifiées à partir d'hypophyse porcine, la FSH et la LH avec un rapport

FSH/LH de 40% qui est le plus adéquat pour les traitements de superovulation (Touati K., 1993). Pour le deuxième groupe (ferme de Beni Mered) la solution utilisée est le PLUSET fabriquée par les laboratoires Calier, S.A., Espagne. Le produit comporte les deux hormones gonadotropines (FSH et la LH) avec un rapport de 100% c'est à dire 1000 UI de FSH pour 1000 UI de LH.

Pour la synchronisation nous avons utilisé des spirales vaginales P.R.I.D. imprégnées de progestagènes de synthèse et au dixième jour une injection de PROSOLVIN (Luprostiol) une prostaglandine de synthèse.

Un milieu de lavage des cornes utérine composé d'une solution de sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS) avec un PH de 7,5 et une osmolarité de 290 milli-osmole par litre. Un milieu de conservation des embryons enrichi au sérum d'albumine bovine à 0,4% et (ZA 454, INRA/IMV, France), un milieu de congélation pour transfert directe (ZT 468, IMV , France) composé d'une association de milieux de conservation et de cryoprotecteur (éthylène glycol à 1 molaire).

L'anesthésie locorégionale a été obtenue avec une solution de lidocaïne à 2 %.

2.4. : Protocole de traitement de superovulation et de synchronisation

Le " Stimufol " utilisé dans cette étude est dosé à 40 Unité Armour (1 unité Armour correspond à 1 micro-gramme de FSH pure) avec un pourcentage de 40% de LH. Cette association de FSH /LH est diluée dans 10 ml de solvant fournis par le fabricant et est administrée à concurrence de deux injections à douze heures d'intervalles. Le traitement dure quatre jours. Le troisième jour du traitement qui correspond au retrait de la spirale l'animal reçoit en plus une dose de prostaglandine (prosolvine). L'animal reçoit une double insémination sur chaleurs observées le cinquième jour au soir et le sixième jour au matin. La collecte d'embryons est réalisée le septième jour après la première insémination.

Le protocole de traitement de superovulation est le suivant :

Tableau 12 : protocole de traitement au « Stimufol »

Jours du traitement	Lot 1	Lot 2
Sam 10.05.2003	Pose du PRID	
Dim 11.05.2003		Pose du PRID
Dim 18.05.2003	FSH/LH 2ml (matin et soir)	
Lun 19.05.2003	FSH/LH 1.5 ml (matin et soir)	FSH/LH 2ml (matin et soir)
Mar 20.05.2003	FSH/LH 1 ml (matin et soir)	FSH/LH 1.5 ml (matin et soir)
	Retrait du PRID+ 2ml PG le matin	FSH/LH 1ml (matin et soir)
Mer 21.05.2003	FSH/LH 0.5 ml (matin et soir)	Retrait du PRID+ 2ml PG le matin
Jeu 22.05.2003	IA (matin et soir)	FSH/LH 0.5 ml (matin et soir)
Ven 23.05.2003		IA (matin et soir)
Jeu 29.05.2003	Récolte d'embryons (le matin)	Récolte d'embryons (l'après midi)

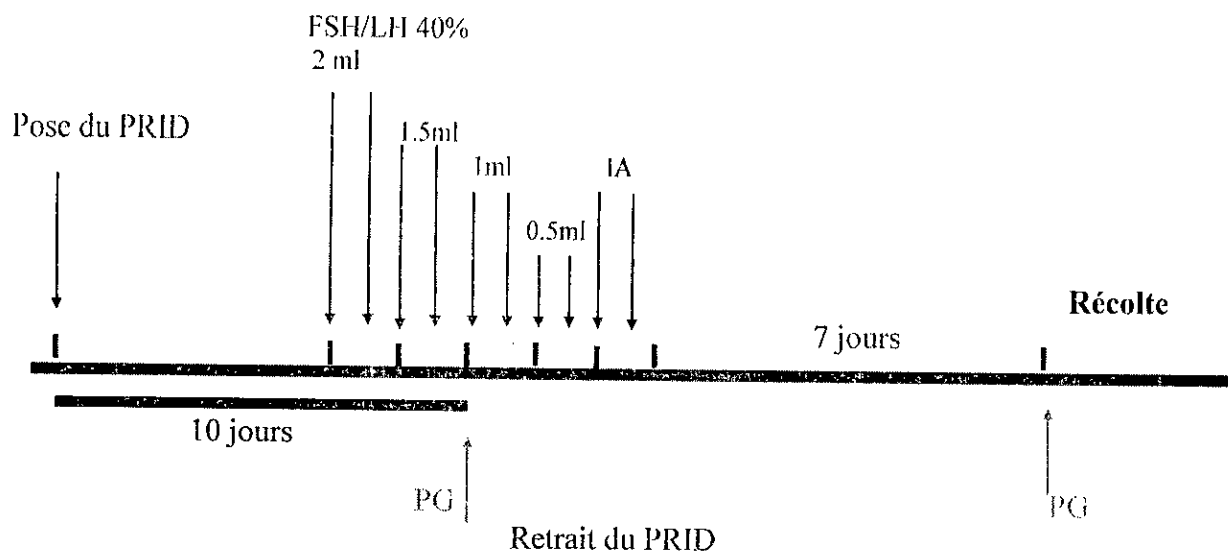


Figure 12 : Protocole de traitement (Stimufol)

Concernant le « Pluset » on a suivi la même démarche qu’avec le « stimufol » sauf pour les IA qui se sont faites 24 heures après la dernière injection de FSH.

Le tableau suivant résume toutes les démarches de ce protocole.

Tableau 13a: Protocole de traitement de superovulation au Pluset du lot 1

Jours	Traitements
Mer 17.04.2002	Pose du PRID
Mer 24.04.2002	4 ml FSH/LH (matin et soir)
Jeu 25.04.2002	3 ml FSH/LH (matin et soir)
Ven 26.04.2002	2 ml FSH/LH (matin et soir) +2ml PG + Retrait PRID
Sam 27.04.2002	1 ml FSH/LH (matin et soir)
Dim 28.04.2002	IA (le soir)
Lun 29.04.2002	IA (le matin)
Dim 05.05.2002	Récolte

Tableau 13 b: Protocole de traitement de superovulation au pluset du lot 2

Jours	Traitements
Jeu 18.04.2002	Pose du PRID
Jeu 25.04.2002	4 ml FSH/LH (matin et soir)
Ven 26.04.2002	3 ml FSH/LH (matin et soir)
Sam 27.04.2002	2 ml FSH/LH (matin et soir) +2ml PG + Retrait PRID
Dim 28.04.2002	1 ml FSH/LH (matin et soir)
Lun 29.04.2002	IA (le soir)
Mar 30.04.2002	IA (le matin)
Lun 06.05.2002	Récolte

Tableau 13 c: Protocole de traitement de superovulation au pluset du lot 3

Jours	Traitements
Ven 19.04.2002	Pose du PRID
Ven 26.04.2002	4 ml FSH/LH (matin et soir)
Sam 27.04.2002	3 ml FSH/LH (matin et soir)
Dim 28.04.2002	2 ml FSH/LH (matin et soir) +2ml PG + Retrait PRID
Lun 29.04.2002	1 ml FSH/LH (matin et soir)
Mar 30.04.2002	IA (le soir)
Mer 01.05.2002	IA (le matin)
Mar 07.05.2002	Récolte

Tableau 13 d: Protocole de traitement de superovulation au pluset du lot 4

Jours	Traitements
Sam 20.04.2002	Pose du PRID
Sam 27.04.2002	4 ml FSH/LH (matin et soir)
Dim 28.04.2002	3 ml FSH/LH (matin et soir)
Lun 29.04.2002	2 ml FSH/LH (matin et soir) +2ml PG + Retrait PRID
Mar 30.04.2002	1 ml FSH/LH (matin et soir)
Mer 01.05.2002	IA (le soir)
Jeu 02.05.2002	IA (le matin)
Mer 08.05.2002	Récolte

2.5. : Collecte d'embryons

La récolte est réalisée 7 jours après IA par voie cervicale grâce à une sonde souple munie d'un ballonnet.

La sonde est introduite à travers le col utérin, une fois au niveau d'une des cornes utérine, le mandrin métallique est partiellement retiré, afin de permettre d'avancer la sonde plus profondément, le ballonnet est alors gonflé grâce à une seringue et le mandrin retiré.

Le rinçage de la corne utérine dans le but de récupérer les embryon qui s'y trouvent, se fait en injectant et en récupérant à travers la sonde une solution de PBS, suivant des doses croissantes et en adoptant la démarche suivante: 2 fois 20 ml, 2 fois 30 ml, 2 fois 40 ml, une fois 50 ml, la dernière seringue comportera 20 ml de PBS et 30 ml d'air. A chaque fois qu'on introduit une quantité de solution on la récupère pour la stocker dans un flacon identifié et propre à chaque vache. On déplace la sonde après avoir remis le mandrin métallique vers

l'autre corne et on effectue la même opération. Toutes ces opérations sont contrôlées par voie rectale.

3. Résultats

3.1. Résultats du groupe traité au « stimufol »

Pour le groupe de vaches traitées au « stimufol » l'analyse des résultats présentés nous permet d'évaluer la réponse des vaches au traitement de superovulation (tableau 14). Nous remarquons ainsi que toutes les vaches du premier lot sont venues en œstrus dans les 48 heures qui ont suivi l'injection de prostaglandine. Les premiers signes œstraux ont été observés chez la vache 2 38 h après l'injection de PG puis la vache 3 40 à 41 h après et enfin la vache 1 (Figure 13). Pour les vaches du deuxième lot ce n'est qu'à partir de 42h après PG qu'on a pu observer les premiers signes d'œstrus chez la vache 1 puis 2, la troisième vache de ce lot n'a présenté ces signes d'œstrus qu'au delà des 48h après injection de prostaglandine (Figure 14). Il est à noter que pour le premier lot les signes œstraux étaient plus intensément exprimés que pour le deuxième, et que la vache 3 les a très peu exprimés. Nous avons également observé une durée assez courte de l'œstrus (environ 6 heures) pour les deux premières vaches du lot 2, tandis que celle des vaches du lot 1 est d'environ 9 heures (de 22h00 à 7h00).

Tableau 14: Evaluation globale de la réponse au traitement de superovulation (Stimufol)

	Nbr de vaches	Oestrus avant 48h Post PG	Oestrus après 48h Post PG
Lot 1	3	3	0
Lot 2	3	2	1
Total	6	5	1

Figure 13: Fréquence de venue en chaleurs des vaches du lot 1 (stimufol)

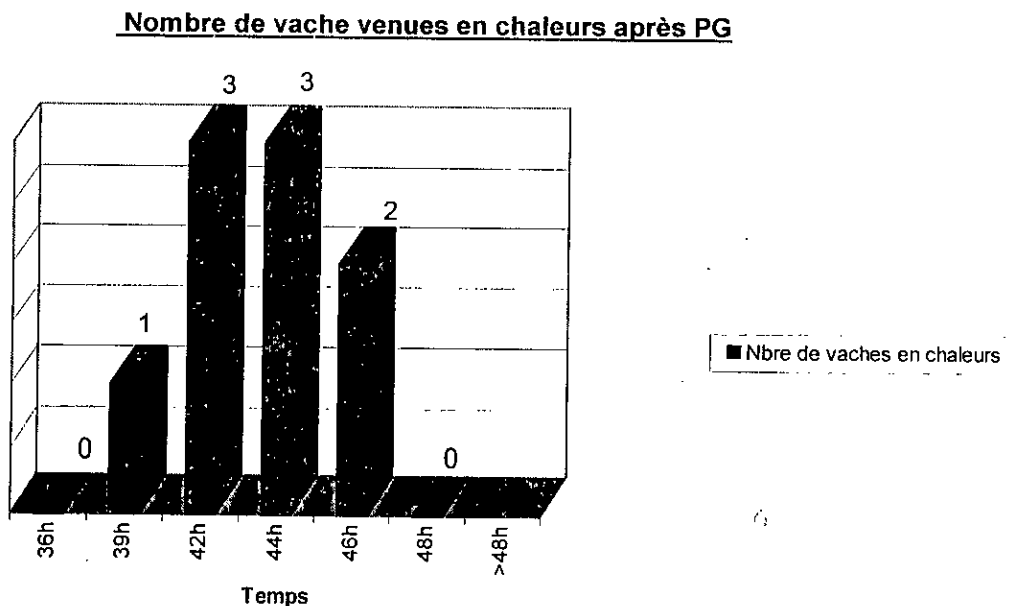
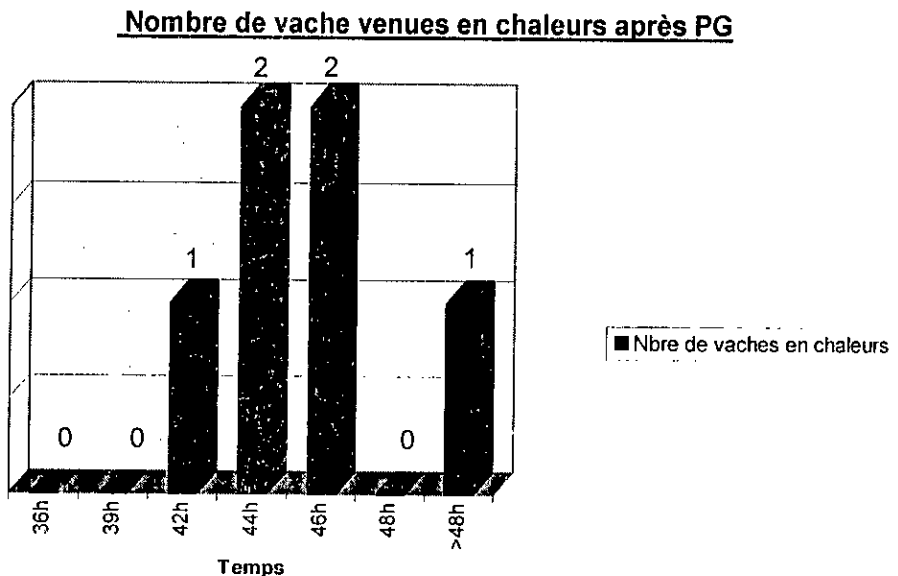


Figure 14: Fréquence de venue en chaleurs pour les vaches du lot 2 (stimufol)



L'examen par voie rectale des ovaires nous a permis une estimation moyenne de 8 CJ par vache pour le premier lot avec un maximum de 13 pour la vache 2. Pour le deuxième lot la moyenne a été estimée à 6 CJ (tableau 15). Il ne faut pas oublier de signaler que dans ce groupe la vache 3 n'a présenté qu'un seul CJ, du reste chez toutes les autres vaches quelque soit le lot la réaction était plus ou moins proche avec un nombre de CJ entre 7 et 9.

La récolte a été réalisée chez toutes les vaches des deux lots (tableau 15), concernant le résultat de la récolte du lot 1, il n'a été satisfaisant que pour une seule vache 2 qui a donné plus de 10 embryons les deux autres ont donné moins de 4 embryons (2 pour la vache 1 et 1 seule pour la vache 3). Concernant le deuxième lot les récoltes ont donné 6 et 7 embryons respectivement pour la vache 1 et 2, pour la vache 3 aucun embryon n'a été récolté, ce qui était prévisible vu la réaction de l'animal, dans d'autres circonstances cette vache n'aurait probablement pas été récolté. La moyenne des embryons récolté (utilisables, dégénérés et ovules non fécondés) par vache est assez proche, respectivement 4.66 pour le premier lot et 4.33 pour le deuxième

Tableau 15: Résultat des récoltes du lot 1 et 2 (stimufol)

	Nbr de vaches récoltées	Nbr CJ moyen par vache	Récoltes avec moins de 4 Emb.	Récoltes avec plus de 10 Emb.	Récoltes nulles
Lot 1	3	8	2	1	0
Lot 2	3	6	1	0	1
Total	6		3	1	1

Les résultats individuels représentés dans le Tableau 15 font état d'une variabilité des réactions au traitement. Pour le lot 1 le dénombrement des CJ montre une très bonne réaction de la vache 2 avec 13 CJ (ovaire droit: 7; ovaire gauche: 6), et une réaction médiocre de la vache 3 avec 4 CJ (2 dans chaque ovaire). Concernant le deuxième lot la réaction est plus stable avec 8 CJ pour la vache 1 et 9 pour la 2, sauf la 3 qui n'a pas répondu au traitement et n'a présenté qu'un seul CJ au niveau de l'ovaire gauche.

La récolte pour le premier lot a révélé des résultats extrêmes avec 11 embryons pour la vache 2 ce qui est considéré comme un très bon résultat (tableau 16), et 1 et 2 embryons respectivement pour la vache 1 et 3 résultat plus que médiocre malgré la présence à la palpation de beaucoup plus de CJ (7 pour la vache 1 et 4 pour la vache 2). Pour ces deux vaches le nombre d'embryons ne traduit pas la réalité de la réponse ovarienne. Concernant le lot 2 le résultats de la récolte sont plus logiques et concordent avec le nombre de CJ présent au niveau des ovaire avec 6 embryons pour la vache 1 (avec 8 CJ) et 7 pour la vache 2 (avec 9

CJ). La troisième vache de ce lot n'a donné aucun embryon ce qui était prévisible vu le nombre de CJ portés sur l'ovaire (1 seul CJ).

Concernant la qualité des embryons récoltés (tableau 15), on note un nombre réduit d'ovocytes non fécondés pour le lot1, deux seulement pour l'ensemble des vaches de ce lot (1 pour la vache 1 et 1 pour la vache 2), tous les autres embryons étaient bons. Nous n'avons pas noté d'embryons dégénérés pour ce lot. Pour le lot 2 le nombre d'ovocytes non fécondés et d'embryons dégénérés était plus élevé que pour le premier: 4 embryons non fécondés (1 pour la vache 1 et 3 pour la 2) et deux dégénérés pour la vache 1, donc finalement 3 embryons non utilisable pour chaque vache.

Il est à noter que les embryons transférables ou congelables sont très importants pour le premier lot au total 12 sur 14 récoltés, dont 10 pour la seule vache 2 qui n'a donné pratiquement que des embryons de très bonne qualité (mis à part 1 non fécondé) (tableau 16), pour les autres vache, malgré le nombre d'embryons réduit à la récolte, 1 sur les deux embryons récoltés pour la **vache 1** était transférable ou congelable, pour la vache 3 le seul embryon récolté est de très bonne qualité.

Tableau 16: Résultats individuels des récoltes du lot 1 et 2 (stimufol).

	Vache N°	Nbr de CJ estimés	Nbr d'embryons récoltés	Non fécondés	Emb. dégénérés	Emb. Transférables	Emb congelés
Lot 1	1	7	2	1	0	1	1
	2	13	11	1	0	10	10
	3	4	1	0	0	1	1
Lot 2	4	8	6	4	1	1	0
	5	9	7	3	0	4	4
	6	1	0	0	0	0	0
Total		42	27	9	2	17	16

Une fois les embryons repérés et isolés, nous les avons classés selon leurs caractères morphologiques (ELDSEN et al., 1978), les résultats sont assez satisfaisants (représentés sur le Tableau 17). Pour le premier lot sur 14 embryons, nous avons obtenu 10 de classe 1 (Excellents) ce qui représente en proportion plus de 71% du total récolté, 14.28% étaient de classe 2 avec 2 embryons et les mêmes chiffres pour les embryons de classe 4 ce qui est globalement un bon résultat (figure 15). Pour le deuxième lot les résultats sont de loin moins brillants car 3 seulement des 13 embryons récoltés sont de classe 1 ce qui représente environ 23%, c'est une proportion très faible, deux pour les classes 2 et 3 (un dans chacune) avec 7.69%, et contrairement au premier lot la plus grande proportion est représentée par les embryons de classe 4 qui étaient au nombre de 8 représentant 61.54%, ce qui est un résultat médiocre (figure 16). Nous remarquons dans ces chiffres que même si le nombre total récolté est très proche pour les deux lots, l'analyse des caractéristiques morphologiques déterminant la qualité des embryons a montré des variations très importantes à un tel point que les proportions sont pratiquement inversées, plus de 71% d'embryons excellents pour le lot 1 alors que pour le lot 2 c'est les embryons de classe 4 qui représentent plus de 61.54%, nous avons constaté aussi qu'il y avait très peu d'embryons de classe intermédiaires aussi bien pour le lot 1 que pour le lot 2.

Tableau 17: Résultat global de la classification des embryons récoltés du lot 1 et 2 (stimufol)

Lot	Nbre d'emb. total	Non Fécondés n (%)	Emb classe 1 n (%)	Emb. Classe 2 n (%)	Emb. Classe3 n (%)	Emb. Classe4 n (%)
Lot 1	14	2 (14.28)	10 (71.42)	2 (14.28)	0	2 (14.28)
Lot 2	13	7	3 (23.07)	1 (7.69)	1 (7.69)	7

Figure 15: Résultat global de la classification des embryons du lot 1 (stimufol)

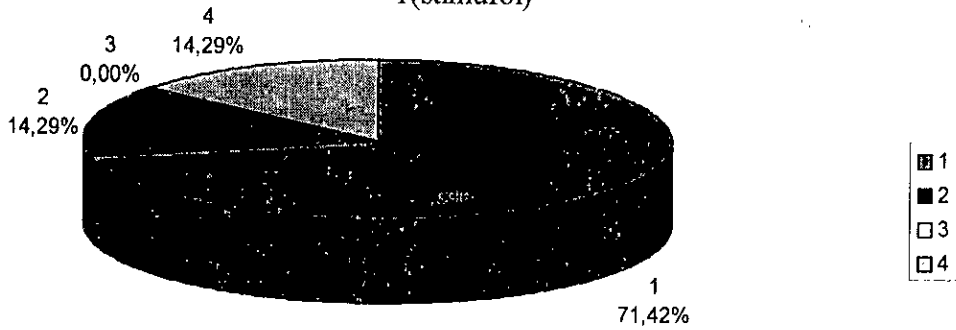
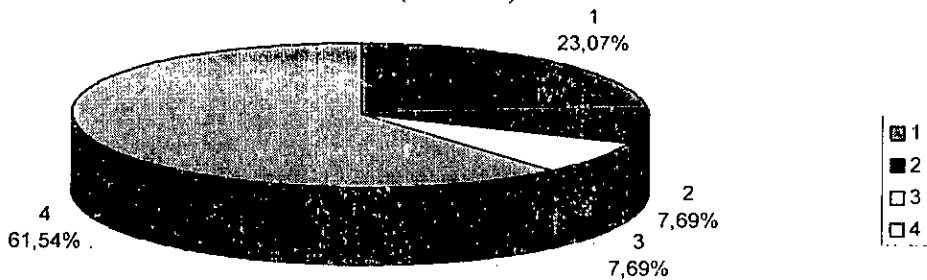


Figure 16: Résultat global de la classification des embryons du lot 2 (stimufol)



Si le résultat global de la classification des embryons montre une disparité entre le lot 1 et le lot 2, le détail donne encore plus de variation et à l'intérieur d'un même lot, comme on peut le remarquer dans le Tableau 18. Concernant le premier lot nous pouvons constater que la vache 2 a donné 78.57% du total des embryons récoltés qui étaient au nombre de 11 et moins de 22% pour les deux vaches restantes (*vache 1* et *3*) réunies, pour le deuxième lot les deux première vaches ont donné presque la moitié chacune, 6 et 7 respectivement pour la vache 1 et 2, avec les pourcentages respectifs de 46.15% et 53.84%. Les résultats individuels de la classification ont révélés pour le lot 1 que la vache 2 a donné la majorité des embryons

de classe 1: 8 embryons sur 10 au total dans cette classe c'est à dire 80% de ces derniers, les 20% ont été obtenus par les deux autres vaches de ce lot avec 10% chacune c'est à dire 1 embryons de classe 1 par vache. Concernant le deuxième lot les proportions sont presque égales en matière de nombres total des embryons pour les vaches: 1et 2 mais seule la vache 2 à donné des embryons de classe 1 et classe 2, alors que la vache 1 n'a donné qu'un seule de classe 3.

Pour les embryons de classe 4 (non utilisable), ils étaient peu nombreux pour le lot 1, au nombre de 2 partagés entre la vache 1 et la vache 2. Dans le deuxième lot 5 et 3 embryons de classe 4 respectivement pour les vaches 1et 2, avec des proportion respectives de 62.5% et 37.5%.

Tableau 18: Détail de la classification des embryons et proportions par rapport aux résultats globaux des différentes classes

Lot	Total emb./lot	Vache N°	Total emb. /vache n (%)	Emb. Classe 1 n (%)	Emb. Classe 2 n (%)	Emb. Classe3 n (%)	Emb. Classe 4 n (%)
Lot 1	14	1	2 (14.28)	1 (10)	-	-	1 (50) (non féç.)
		2	11 (78.57)	8 (80)	2 (100)	-	1 (50) (non féç.)
		3	1 (7.14)	1 (10)	-	-	-
Lot 2	13	4	6 (46.15)	-	-	1 (100)	5 (62.5) (4n.f, 1dég.)
		5	7 (53.84)	3 (100)	1 (100)	-	3 (37.5) (non féç.)
		6	0 (0.00)	-	-	-	-

Toutes les opérations précédentes visent à définir le devenir des embryons récoltés, c'est pourquoi nous les avons divisés en différentes catégories selon ce qu'on envisage d'en

faire. Et on remarque dans le Tableau 19 que sur les 14 embryons récoltés pour le premier lot, 12 sont utilisables (soit pour transfert direct soit pour congélation) avec un rapport embryons transférables/récoltés de 85.71% ce qui est un résultat très satisfaisant globalement (le détail sera étudié séparément). Pour le deuxième lot, 5 embryons seulement sur les 13 récoltés avec un rapport de 38.46% sont utilisables et il est clair que ce taux est très faible, et au regard des résultats du premier lot la différence est très nette. Tous les embryons récoltés pour le premier lot offrent la possibilité aussi bien d'un transfert direct que d'une congélation car comme nous l'avons vu précédemment (Tableau 15 et 16) tous sont de très bonne voir d'excellente qualité, pour le deuxième lot 4 des 5 embryons utilisables sont congelables c'est à dire 30.76%.

Tableau 19: Proportions des différentes catégories d'embryons

Lot	Nbre d'emb. total	Emb. Utilisable n	Emb. Transférables n (%)	Emb. Congelables n (%)	Emb trans/récoltés (%)
Lot 1	14	12	12 (85.71)	12 (85.71)	85.71
Lot 2	13	5	5 (38.46)	4 (30.76)	38.46

L'étude individuelle rapporte plus fidèlement la réalité des résultats obtenus, car si nous analysons les données fournies par le Tableau 20, nous nous rendons compte que pour le lot 1: 10 des 12 embryons utilisables appartiennent à une seule vache qui est la 2 ce qui représente 83.33% de ces embryons, le reste est partagé équitablement entre les deux autres vaches de ce lot avec un embryon utilisable chacune et un pourcentage de 8.33% par vache. Les écarts dans cette catégorie d'embryons pour le deuxième lot sont aussi importants que pour le premier car 4 des embryons utilisables sont issus de la vache 2 avec un pourcentage de 80% des embryons de cette catégorie, contre 1 seulement pour la vache 1 ie 20%. Concernant les embryons utilisables du lot 1, tous offrent les deux possibilités c'est à dire soit transfert soit congélation. Pour le lot 2 les 4 embryons de la vache 2 sont aussi bien transférables que congelables car il sont de très bonne qualité, alors que celui de la vache 1 ne peut être congelé

mais il reste transférable car il est de classe 3, nous l'avons toutefois congelé malgré cela à cause de l'absence de receveuses disponibles. Le rapport d'embryons transférables /récolté est assez bon même si le nombre d'embryons produit par certaines vaches est très faible et ne permet pas une évaluation objective des résultats.

Tableau 20: Détail individuel des différentes catégories d'embryons et proportions par rapport aux résultats globaux

Lot	Vache N°	Emb. Récoltés	Emb. Utilisables n (%)	Emb. Transférables n (%)	Emb. Congelables n (%)	Emb. trans/récoltés %
Lot 1	1	2	1 (8.33)	1 (8.33)	1 (8.33)	50
	2	11	10 (83.33)	10 (83.33)	10 (83.33)	90.90
	3	1	1 (8.33)	1 (8.33)	1 (8.33)	100
Lot 2	4	6	1 (20.00)	1 (20.00)	0 (0.00)	16.66
	5	7	4 (80.00)	4 (80.00)	4 (80.00)	57.14
	6	0	-	-	-	-

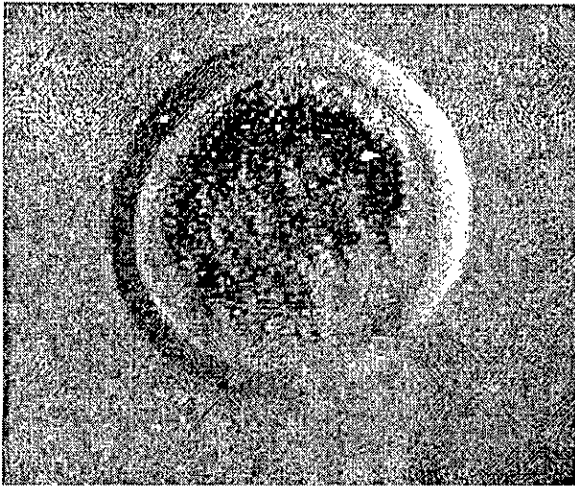


Figure 17: Embryon dégénéré de la vache 1

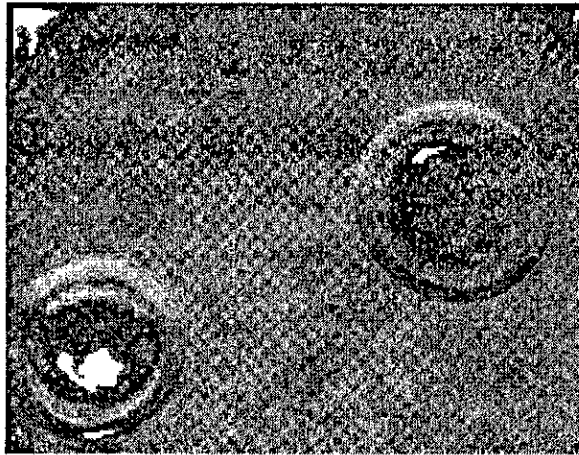


Figure 17b: les 2 embryons obtenus à partir de la vache 1.

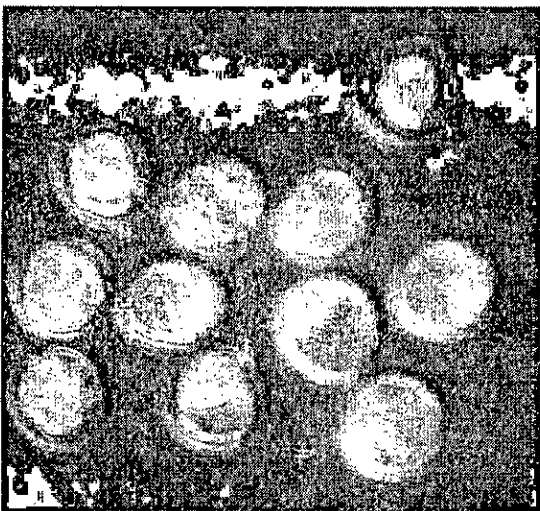


Figure 18: la totalité des 11 embryons de la vache 2 avant classification (embryon dégénéré isolé en haut).

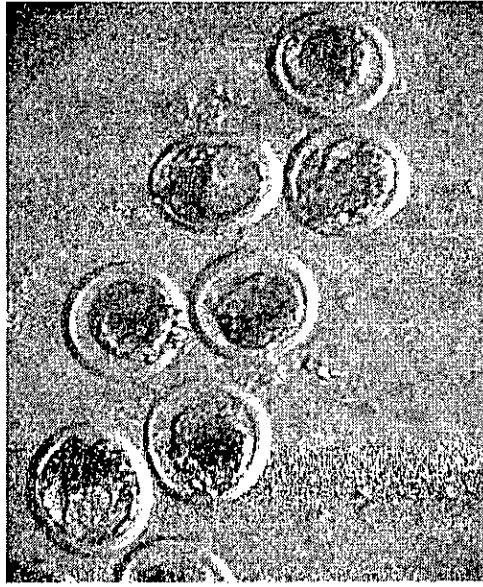


Figure 19 : Quelques uns des embryons de bonne qualité de la vache 2 après classification

3.2. Résultats du groupe traité au « pluset »

Le Tableau 21 révèle que toutes les vaches de ce lot sont venues en chaleurs dans les 48 heures qui ont suivies l'injection de prostaglandine, ce qui est une bonne réaction. L'exploration rectale donne un résultat moyen avec un nombre moyen de CJ de 6.33 par vache environ 3 par ovaire (tableau 22). Toutes les vaches ont été récoltées dans ce lot mais aucun embryon n'a été trouvé.

Comme pour le premier lot, les trois vaches du lot 2 (tableau 21) sont venues en chaleurs dans les 48 heures suivant l'injection de prostaglandine avec une intensité plutôt faible pour les deux premières vache et bonne pour la troisième, le nombre moyen de CJ détecté par exploration rectale était de 4.66 inférieur à celui du premier lot (tableau 22). Toutes les vaches ont été récoltées, mais comme le lot précédent aucun embryon n'a été retrouvé.

Toutes les vaches du lot 3 sont aussi venues en chaleurs dans les 48 heures qui ont suivies l'injection de prostaglandine, comme l'indique le Tableau 21. L'intensité était très bonne pour les deux dernières vache et faible pour la première, avec un nombre moyen de CJ nettement supérieur au deux premiers 9.33 par vache (Tableau 22).

Toutes les vaches ont été récoltées, une seulement à donné plus de 4 embryons, une vache n'a donné aucun embryon, avec un nombre total de 8 embryons et on avait enregistré

une moyenne de 2.66 embryons par vache, même si le résultat est médiocre, ce lot est le meilleur d'entre les 4.

Pour le dernier lot la venue en chaleurs des vaches a été aussi dans l'intervalle de 48 heures après prostaglandine, avec une intensité variable: faible pour la deuxième vache très bonne pour la première et bonne pour la deuxième. Le nombre moyen de CJ 7 jours après IA reste faible (4 par vache). La récolte a donné deux embryons pour l'ensemble avec une moyenne de 0.66 embryons par vache.

Tableau 21: Evaluation globale de la réponse au traitement de superovulation

	Nbr de vaches	Oestrus avant 48h Post PG	Oestrus après 48h Post PG
Lot 1	3	3	0
Lot 2	3	3	0
Lot 3	3	3	0
Lot 4	3	3	0
Total	12	12	0

Tableau 22: Résultat des récoltes du lot 1, 2, 3 et 4

	Nbr de vaches récoltées	Nbr de CJ moyen par vache	Récoltes avec moins de 4 Emb.	Récoltes avec plus de 10 Emb.	Récoltes nulles
Lot 1	3	6.33	3	0	3
Lot 2	3	4.66	3	0	3
Lot 3	3	9.66	2	0	2
Lot 4	3	4	3	0	2
Total	12	-	11	0	10

Pour les résultats individuels des récoltes nous n'allons présenter que les résultats des 2 derniers lots (lot 3 et 4), comme indiqué dans le tableau 23 étant donné que c'est ces seuls lots qui ont donné des embryons. Nous remarquons d'abord un décalage très important entre le nombre de CJ retrouvés à l'exploration rectale et celui des embryons retrouvés. Pour le lot 3 le plus grand nombre d'embryons est retrouvé chez la vache 7 qui a donné 6 embryons vient en deuxième position la vache 9 qui en a donné 3, la troisième n'en a donné aucun. Concernant la qualité des embryons récoltés la plupart étaient non fécondés, 5 pour la vache 7 et 1 pour la 9, le reste, c'est à dire 1 pour la 7 et 2 pour la 9, sont dégénérés.

Pour le lot 4 le décalage entre le nombre de CJ palpés et le nombre d'embryons est aussi net que pour le lot 3, avec un seul embryon pour la vache 10 et de même pour la 12, la première avait 3 CJ et la deuxième en avait 6. Concernant la qualité des embryons récoltés, les deux retrouvés étaient non fécondés.

Il est évident quand on observe les résultats présentés dans le Tableau 23 que les embryons collectés sont de mauvaise qualité et ne sont donc pas utilisables, ni pour transfert direct ni pour congélation, si on avait à les classer ils seraient tous de classe 4 selon les critères établies par Elsdén et al. (1978). Le résultat est donc très médiocre avec une moyenne d'environ 0.91 embryons par vache et aucun utilisable, et cela malgré un nombre de CJ moyen à bon et des chaleurs survenues dans un intervalle acceptable.

Tableau 23: Résultats individuels de la réponse au traitement de superovulation des lots 3 et

4

Lot	Vache N°	Nbre de CJ	Nbre d'embryons récoltés	Non fécondés	Emb. dégénérés	Emb. utilisables
Lot 3	7	13	6	5	1	-
	8	11	0	-	-	-
	9	5	3	1	1	-
Lot 4	10	3	1	1	-	-
	11	3	0	0	-	-
	12	6	1	1	-	-

3.3. Etude comparative des résultats obtenus avec les deux extraits hypophysaires STIMUFOL et PLUSET

L'évaluation globale de la réaction des vaches aux deux traitements, dans le Tableau 24, semble en apparence très proche, ainsi pratiquement toutes les vaches, quelque soit la solution utilisée, sont venues en chaleurs dans les 48 heures qui ont survécu à l'injection de prostaglandine, mis à part une seule traitée au STIMUFOL qui a dépassé de peu ce délai. Le nombre moyen de corps jaunes évalué par exploration rectale à 7 jours de l'IA est lui aussi très proche avec un léger avantage pour le groupe traité par le STIMUFOL qui a donné 7 corps jaunes par vache contre 6.16 pour le deuxième groupe traité au PLUSET, donc sur le plan clinique les vaches ont réagi apparemment de la même manière à la stimulation ovarienne. Après la récolte la réalité de la réaction des animaux apparaît clairement et la différence entre les deux traitements devient très nette, puisque le nombre d'embryons récoltés pour le premier groupe traité au STIMUFOL 27 pour 6 vaches récolté c'est à dire en moyenne 4.5 embryons par vache, alors que les vaches traitées au PLUSET n'ont donné que 11 embryons pour 12 vaches récoltées avec une moyenne de 0.66 embryons par vache, pour ce

même groupe 8 vaches sur 12 n'ont donné aucun embryon ce qui est énorme contre 1 seule vache pour le groupe traité au STIMUFOL, il est à signaler que dans ce dernier une vache a donné plus de 10 embryons.

Tableau 24: Tableau comparatif de l'évaluation globale de la réaction des vaches obtenue avec les deux extraits hypophysaires

Parametres	Traitement à base de STIMUFOL	Traitement à base de PLUSET
Nbre de vaches	6	12
vaches venues en chaleurs 48h après PG	5	12
Nbre moyen de CJ/vache à J7 après IA	7	6.16
Nbre de vaches récoltées	6	12
Nbre de vache ayant données moins de 4 embryons	3	11
Nbre de vaches ayant donné plus de 10 embryons	1	0
Nbre de vaches n'ayant pas donné d'embryons	1	8
Nbre total d'embryons récoltés	27	11
Nbre moyen d'embryons par vache	4.5	0.66

En dehors de l'écart très important dans le nombre d'embryons récoltés entre les deux groupes, il existe une variation tout aussi importante dans la qualité des embryons produits, ce qui est bien élucidé par le tableau 24.

Concernant le nombre d'ovules non fécondées, on a noté 8 sur 11 embryons récoltés pour le groupe traité au PLUSET représentant 72.72% contre 22.22% pour le groupe traité au STIMUFOL, pour les embryon dégénérés assez importante 3 pour le premier groupe (traité au PLUSET) avec une proportion de 27.27%, et 2 pour le deuxième groupe (traité au STIMUFOL) représentant un pourcentage de 7.40%. En ce qui concerne les embryons utilisable seul le groupe traité au STIMUFOL en a procuré avec 17 embryon sur 27 représentant 62.96% de ces derniers, 16 d'entre eux sont congelables (59.25%) (tableau 25).

Tableau 25: Tableau comparatif de la qualité des embryons obtenus avec le STIMUFOL et le PLUSET

Traitement	Nbre de CJ	Nbre d'embryons récoltés	Non fécondés n (%)	Emb. dégénérés n (%)	Emb. utilisables n (%)	Emb. Transférables n (%)	Emb congelables n (%)
Vaches traitées au STIMUFOL	42	27	6 (22.22)	2 (7.40)	17 (62.96)	17(62.96)	16 (59.25)
Vaches traitées au PLUSET	74	11	8 (72.72)	3 (27.27)	0	0	0

La classification des embryons obtenus a montré encore mieux les failles du traitement à base de PLUSET comme indiqué dans le tableau 26 puisque tous ceux récolté chez les vaches de ce groupe sont de classe 4 ne supportant aucune utilisation, au contraire les vaches traitées au STIMUFOL ont donné 13 embryons de classe 1 donc d'excellente qualité avec un pourcentage de 48.14, 3 embryons de classe 2 dont très bons représentants 11.11%, 1 seul de classe 3 et 10 de classe 4 avec un pourcentage de 37.03%.

Tableau 26: Comparaison des embryons produits par les deux extraits hypophysaires après classification

Traitement	Nbre d'emb. total	Non Fécondés n (%)	Emb classe 1 n (%)	Emb. Classe 2 n (%)	Emb. Classe3 n (%)	Emb. Classe4 n (%)
STIMUFOL	27	6 (22.22)	13 (48.14)	3 (11.11)	1 (3.70)	10 (37.03)
PLUSET	11	8 (72.72)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	11 (100)

4. Discussion:

Dans la première partie de ce travail nous avons tenté d'évaluer la réponse des vaches au traitement à base de STIMUFOL, dans un deuxième temps nous avons essayé de comparer nos résultats avec ceux obtenus par un traitement au PLUSET un autre extrait hypophysaire qui a été utilisé une année auparavant dans le cadre d'une thèse de magistère.

La réaction des vaches traitées au STIMUFOL sur le plan clinique était satisfaisante dans l'ensemble, la venue en chaleur s'est fait dans les délais limites (48 heures après injection de prostaglandine), sauf pour une seule vache 6, le nombre de CJ moyen est plutôt faible: 7 CJ par vache, comparé à celui obtenu par Chupin (1988) qui est de 14.7 CJ, pratiquement le double. Chupin et Procureur (1983) obtiennent un nombre de CJ de 15.9 ± 15.0 ($P < 0.05$), la vache 6 n'a donné qu'un seul CJ, cela est considéré comme une réaction négative, cela peut être dû à plusieurs facteurs, le plus important étant le stress, nous avons remarqué qu cette vache réagissait d'une manière agressive, ce qui faisait qu'à chaque injection de STIMUFOL il fallait une contention forcée, d'autre part elle a présenté le jour de la récolte une vaginite qui n'existait pas à l'examen effectué avant la synchronisation, ce qui aurait pu affecter la réponse de l'animal au traitement car quelque soit leurs natures affectent directement le développement folliculaire comme cela a été démontré chez l'Homme et le rat (Tetsuka et al., 1999).

Les résultats obtenus par le STIMUFOL sont très encourageant car c'est la première fois en Algérie qu'on produits autant d'embryons et de bonne qualité pour la plupart 62%. Dans leur globalité nos résultats sont proche de ceux obtenus par Touati en 1993 utilisant le même extrait hypophysaire et avec le même rapport FSH/LH c'est à dire 40% avec un pourcentage de 65.5%, néanmoins le nombre d'embryons est faible: 4.5 par vache avec environ 2.83 embryons transférable loin des chiffres du même auteur qui sont de 8.5 ± 0.54 ($P < 0.01$) embryons récolté et 5.5 ± 0.43 ($P < 0.01$) transférables. Donaldson en 1984 a obtenu des résultats légèrement inférieurs aux notre avec 2.5 ± 3.4 embryons transférable et un pourcentage d'embryons de bonne qualité de 35% et ce en utilisant la FSH BURNS-BIOTEC, Chupin et Procureur (1983) on eu 43% d'embryons de qualité (inférieur à notre résultat, mais un nombre d'embryons transférable nettement supérieur avec 5.3 ± 6.2 ($P < 0.05$).

Notre expérimentation, en dehors de pouvoir produire des embryons, nous a permis d'évaluer l'influence d'un facteur de variation très important, c'est l'extrait hypophysaire utilisé puisqu'on a pu comparer nos résultats avec ceux obtenus par le PLUSET une solution comportant de la FSH et de la LH porcine et à proportions égales. Les travaux ont été effectués à la même période de l'année (avril/mai pour le PLUSET, et mai/juin pour le STIMUFOL) Ce qui nous permet d'écarter l'effet saison qui a été démontré par plusieurs auteurs (Hoffman et al., 1988; Almeida et al., 1987); Gordon et al., 1987; Touati et al., 1989). Les animaux avaient un état d'embonpoint très proche, entre 2 et 3.5, ce facteur aura donc la même incidence sur les deux groupes, et il n'est pas négligeable car Mc Dougal et al. (1995) ont observé chez des génisses ayant une note d'état inférieure, le premier follicule dominant prenait plus de temps à atteindre sa taille maximale. Il y a une petite différence, mais qui a son importance c'est le fait que les vache du groupe traité au PLUSET ont montré une baisse de la note d'état corporelle d'environ 0.5 pour la majorité des animaux, alors que pour le deuxième groupe elle était stable dans les 2 mois qui ont précédés le traitement, et durant ce dernier.

La différence très importante entre les deux groupes (PLUSET et STIMUFOL), réside pour une plus grande part dans l'extrait hypophysaire utilisé. Cette variation est nette si on compare les résultats de travaux utilisant des extraits différents. Ainsi Chupin et Procureur (1983) et Donaldson (1984) trouvent des résultats très différents pour une même dose de FSH et des solutions différentes, 12.2 ± 12.3 embryons récoltés avec 5.3 ± 6.2 transférables pour les premier et 10.1 ± 7.1 embryons récoltés pour le deuxième avec 3.9 ± 2.7 transférables, dans notre cas les vaches traitées au PLUSET n'ont donné aucun embryons utilisable, les seuls obtenus sont soit non fécondé: 8 sur 11 (72.72%) soit dégénérés: les 3 restants (27.27%) contre 6 (22.22%) sur 27 (non fécondés) et 2 (7.40%) pour les vaches traitées au STIMUFOL. Le taux d'ovocytes non fécondés est trop important pour le premier groupe (PLUSET), le décalage entre ces deux groupes concernant le nombre total b'embryons récolés et celui des transférable peut être dû à la composition du PLUSET inadapté car elle utilise des concentration égale de FSH et de LH ce qui est néfaste, car il provoquerait une lutéinisation précoce des follicules les empêchant de poursuivre leur développement (Thatcher et al, 1989; Chupin et al., 1984 et 1985), alors que le STIMUFOL que nous avons utilisé procure 40% de LH, un taux adapté et bien étudié (Touati, 1993). Un autre facteur nous semble aussi important c'est le moment de l'insémination qui a été faite 24h après le début de l'observation des chaleur pour le groupe traité au PLUSET avec un décalage de 12 h par rapport au

deuxième groupe, ce qui est important, les meilleurs résultats ont été obtenus en inséminant les vaches 12 h après la détection des chaleurs (Goulding et al 1994).

5. Conclusion:

Le travail que nous avons effectué avait deux objectifs, le premier est la maîtrise de la technique de superovulation pour la production d'embryon "in vivo", en effet il nous a permis d'approfondir nos connaissances dans ce domaine, afin d'améliorer nos résultats, ce qui était le cas car pour la première fois, nous avons pu obtenir des embryons en nombre acceptable, en majorité de bonne qualité, ce qui est le point fort de ce travail. Pour la première fois aussi on a pu réaliser un transfert sur une vache receveuse préparée, malheureusement les vaches de race locale (Cheurfa) n'ont pas répondu, elles étaient destinées à être receveuses, donc on n'a pu transférer qu'un seul embryon.

Une première aussi, est la congélation des embryons produits, ça nous a permis de nous initier à cette technique, 15 des embryons produits sont actuellement congelés et conservés au niveau du CNIAAG (centre national d'insémination artificielle et d'amélioration génétique) notre partenaire dans ce travail, ces embryons peuvent être utilisés à n'importe quel moment pour d'autres travaux, ou pour la maîtrise de la technique de transfert.

Un autre point positif aussi est que nous avons pu travailler en station expérimentale, ce qui est le mieux pour ce genre de projet, cela nous évite tous les problèmes rencontrés dans les fermes privées malgré la bonne volonté de certains éleveurs, il est à noter aussi que la collaboration du CNIAAG est un atout très important pour la réussite de ces travaux.

Le deuxième élément c'est que nous avons pu constater l'influence du produit utilisé pour la superovulation. L'écart des résultats peut être très important comme nous l'avons vu en comparant nos résultats, utilisant le STIMUFOL, et ceux de notre collègue AMARA une année auparavant, utilisant le PLUSET, et nous avons noté l'importance de la concentration de LH. Les conditions de travail ont contribué sûrement au bon déroulement des différentes étapes de notre travail, car le travail en station expérimentale offre des avantages très importants du fait que les animaux ne sont pas destinés à la production, le contrôle régulier est plus facile, le déplacement ne pose aucun problème et le personnel est qualifié.

On peut signaler aussi le fait que durant ce travail nous avons effectué des prises de sang régulières (toutes les 3 h durant les 48h autour de l'IA) en vue de faire des dosages hormonaux mais faute de moyens ce paramètre n'a pas été pris en considération, cela nous a

permis néanmoins de contrôler les vache toutes les 3 heures et recueillir toutes les informations relatives à l'expression des chaleurs avec exactitude.

Enfin, nous dirons que ce modeste travail doit être une porte ouverte à d'autres travaux dans ce domaine, afin de maîtriser mieux les techniques utilisées et pouvoir commencer un travail de vulgarisation auprès des éleveurs, afin d'en faire une technique d'élevage permettant d'améliorer le rendement de nos vaches possédant un potentiel génétique élevé, et peut être aussi une voie d'amélioration de notre race locale bovine.

6.Recommandations :

Nous avons constaté lors de notre travail que nous pouvions avoir de très bons résultats avec les produits appropriés. La première recommandation est de répéter ces traitements plusieurs fois, en essayant à chaque fois d'éliminer les facteurs limitants, tel que l'alimentation et les facteurs d'environnement, et que ces traitements se fassent d'abord en station, c'est-à-dire au niveau de l'université avant de les appliquer sur terrain, car nous avons vu dans toutes les étapes de ce protocole que la station offrait des avantages non négligeables, dont la liberté d'action sans contraintes imposées par les éleveurs, la proximité des laboratoires et la possibilité de suivi continu.

D'autre part, afin de faciliter le travail, il est impératif de prévoir un équipement adéquat, notamment les loupes appropriées pour l'identification des embryons, il est tout affet possible qu'on soit passé à coté de plusieurs embryons faute de matériel adapté.

Il faudrait penser aussi à la formation du personnel intervenant dans les différentes étapes, ce qui nous donnera plus d'indépendance, d'une part et nous permettra une meilleure maîtrise de la technique, pour envisager d'en faire ensuite une pratique d'élevage.

Enfin, puisque le but essentiel du transfert d'embryon est la sélection, il serait très intéressant d'envisager de faire les mêmes travaux sur la race locale afin de la développer et nous permettre un gain de temps considérable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams G. P., control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implication for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 2000, 53, 1521-1528., 1994
2. Adams G.P., Kot K., Smith C.A., Ginther O.J. 1993, Selection of dominant follicles and suppression of follicular growth in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 259-271.
3. Adams G.P., Matteri R.L., Kastelic J.P., Ko J.C.H., Ginther O.J. 1992, Association between surges of follicles , stimulating hormone and the emergence of of follicle waves in heifers., *J. Reprod. Fert.* 94, 177-188.
4. Adams GP, Pierson R.A, 1995 : Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans . *Theriogenology* 43:113 -120,
5. Adashi E.Y Resnick CE, Hernandez ER. Insulin-like growth factor-1 as amplifier of follicle stimulating hormone action : studies on mechanism (s) and site (s) of action in cultured rat granulosa cells . *Endocrinology*, 1988 ; 122: 1583-1591.
6. Alfuraji M.M., Atkinson T., Broadbent P.J., Hutchinson J.S.M. superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG monoclonal antibodies. *Anim. Sci.* 1993, 33, 99-109.
7. Allen W.R. et Antezak D.F., Equine embryo transfert. *Equine vet. Journal*, 1985. Suppl. 3.
8. Almeida AP. Superovulation in cattle: a combined treatment using synchromate B with either PMSG or FSH. *Theriogenology* 1987; 27,1:203 abstr.
9. Armstrong D.T. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39, 7-24.
10. Assey R.J., Hyttel P., Greve T., PurWantara B., Oocyte morphology in dominant and subordinat follicles. *Molecular reproduction and development*, 37, 335-444. in Ian Gordon , *Reproduction in cattle and buffaloes*. Vol. 1, 1996., 1994;
11. Assey RJ, Hyttel P, Roche JF, Boland M: Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 8-16.
12. Bao B. et Garverick H.A., Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicle during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, 1998. 76, 1903-1921.
13. Bao B., Garverick H.A., 1998, Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves : a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1903-1921.
14. Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E., Younquist R.S. 1997a, Change in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain clivage and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 56, 1158-1168.
15. Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E., Younquist R.S. 1997b Change in messenger RNA encoding 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5, delta4 isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicles, identification of dominant follicles by expression of 3 beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol. Reprod.* 56, 1466-1473.

16. Barraclouchi C.A., Wise P.M. 1982, The role of catecholamine in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion. *Endocr. Rev.* 3, 91-121.
17. Beckers J.F., Closset J. Maghuin -Rogister G., Hennen G., Bovine follitropin. Isolation and characterization of the native hormone and its α and β subunits. *Biochimie*, 1977. 59,825-831.
18. Beckers J.F: Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle. *Theriogenology*. 1987. 27, 213 (Abstr).
19. Behboodi, E., Gutiérrez-Adán, A. and Anderson, G.B. (1997). Inadvertent sex selection in a protocol of in vitro bovine embryo production. *Theriogenology*. 47, 265.
20. Bellow R.A., Staigmiller R.B., Wilson J.M., Phelps D.A., Darling A., 1991. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology*, 35, 1069-1082.
21. Ben Jebara MK, Carriere PD , Price CA : Decreased pulsatile LH secretion in heifers superovulated with eCG or FSH *Theriogenology* 1994;42: 685-694.
22. Bendell J.J., Dorrington J.H. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1990,127, 533-540. In Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F. Hanzen Ch. 2000, le développement folliculaire chez la vache: 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann. Méd. Vet.* 2000, 144, 385-404.
23. Bergfelt DR; Lightfoot KC; Adams GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 895-905.
24. Betteridge, K.J. and Fléchon, J.E. (1988). The anatomy and physiology of reimplantation embryo. *Theriogenology*. 29,155-187.
25. Bevers MM, Dielman SJ : Superovulation of cows with PMSG: Variation plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG in number of preovulatory follicles. *Animal Reproduction Science*, 15 (1987) 37-52.
26. Bo G.A, Pierson R.A, Mapletoft RJ: .The effect of estradiol-valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with synchromate-B implants. *Theriogenology* 1991; 36:169-183.
27. Bo G.A., Adams G.P, Pearson R.A., Mapletoft R.J., Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 1995, 43 31-40.
28. Brand A., Aarts M.H., Zaayer D., Oxender W.D., Recovery and transfert of embryos by non surgical procedures in lactating dairy cattle. *theriogenology*, 1978, 1, 281-291.
29. Breuel K.F., Baker R.D., Butcher R.L., Townsend E.C., Inskip E.K., Dailey R.A. Lerner S.P., effect of breed age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, 1991, 36, 241-255.

30. Bungatz L, Nieman H : Assessment of the presence of the dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination . *J.Reprod Fert* 1994;101 583-591.
- 31.Cahill LP Mauleoni P. Influences of season cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J Reprod Fert* 1980; 24:39-43.
- 32.Caldani M., Caraty A. Pelletier J. Thiery J.C., Tillet Y, 1991. La libération pulsatile de la LH et son contrôle. in: la reproduction chez les mammifères et l'Homme. Ed. Thibault C., Levasseur M., 1991. INRA. Paris, 77-111.
33. Calder M, .Rajamahendran R. : Follicular growth , ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the estrous cycle. *Theriogenology* 1992; 38,1163-1174.
34. Callesen H, Greve T, Hyttel P, : Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle . *Theriogenology* 1986;25:71-86
- 35.Callesen H., Greve T.,Hyttel P., 1987, Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogenology* 1987, 28, 155-166. In: Greve T., Callesen H., Hyttel P., Hoier R., Assey R., 1995. The effect of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995, 43, 41-50.
- 36.Callesen et al, 1987; Callesen, H., Liboriussen, T. and Bak, A. (1997). Application of embryos transfer., in: Liboriussen, T. Andersen, B.B. (Eds.). *Embryo Transfer, Physiological Challenge Test and Nucleus Herd Breeding with Dairy Cattle*, Report no. 737, Danish Institute of Agricultural Sciences, Denmark, pp. 23-46.
- 37.Caraty A., Evans M., Fabre N.Y.S., Karsch F.J., 1995. The preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation. *J. Reprod. Fertil.* 49, 245-255.
- 38.Caraty A., Evans M., Thiery J.C., Malpoux B., Chemineau P., 1997. Contrôle central de la sécrétion des gonadotropines par les neurones à GnRH. In : les gonadotropines. Ed. Combarous Y., Volland-Nail P. INRA, Paris, 225-239.
39. Chagas J; Silva L; Lopes da Costa and Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfert in ovarian function. *Theriogenology*. Vol 58 (1) (2002) pp. 51-59.
- 40.Charbonnel B., Dubourdiou S., 1993. Les antagonistes de la GnRH. *Contracep. Fert. Sex.* 21, 1, 13-21.
41. Chupin D. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Colloque Soc Fr Etude de la fertilité. Masson Ed Paris 1988;26:213-232.
- 42.Combarous Y., 1997. Structure et relation structure médiateurs. In : les gonadotropines. Ed. Combarous Y., Volland-Nail P. INRA, Paris, 225-239.
- 43.Combarous Y., Volland-Nail , 1997, les gonadotropines, I.N.R.A., Paris.

44. Cushman R.A; De Souza J.C; Hedeth V.S and Britt J.H. Effect of long term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory reponse of superovulated cattle. *Theriogenology*, Vol 55 (7) (2001) pp. 1533-1547.
45. D'occhio MJ, Sudha G, Jillella D, Whyte T, Maclellan L.J, Walsh J, Trigg T.E, and Miller D : Use of GnRH to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH : A new model for superovulation
46. Darrow M.D., Lindner G.M., Goemann G.G., superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows. *Theriogenology*, 1982, 17 (1), 84.
47. Davoren J.B., Hsueh Aaron J.W. Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insuline-like Growth factor I in vivo. *Endocrinology*, 1986, 118, 888 (Abst.).
48. Davoren J.B., Hsueh Aaron J.W. Choh hao Li. Somatomedin C augments FSH-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Am. J. physiol. Sc.* 1985, 249, E26.
49. Delacharlerie P.F., Manciaux I., Charreaux F., Marie M., 1995. Relationships between diet and response to superovulation in dairy cows. in: Merieux Ch. (ed): Imme colloque scientifique de l'AETE, 8-9 septembre 1995, Hannover, Allemagne. 160 (Abstr).
50. Demoustier M.M., Beckers J.F., Van Der Zwalmen P., Closset J., Gillard I.J., Ectors F., Determination of porcine plasma follicitropine levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 1988, 30, 379-386., 1988
51. Dhont D., Bouters R., Spincemaille J., Coryn M., Vandeplassche M., The contrôle of superovulation in the bovine with a PMSG-antiserum. *Theriogenology*, 1978, 9, 529-534.
52. Dieleman SJ, Bevers MM, Poortman J, van Tol HTM. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *J Reprod Fertil* 1983; 69:641-649.
53. Donaldson L.E., Effect of age of donor cows on embryo production., 1984
54. Donaldson L.L., Dose of FSH-p as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology*, 1984b, 22, 205-212.
55. Donaldson LE. LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cow. *Theriogenology* 1985; 23 (3): 441-447.
56. Driancourt M.A, Thatcher W.W, Terqui M., Andrieu D. 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and inresponse to PMSG. *Dom. Anim. Andocrinol.*, 8, 209-221.
57. Driancourt M.A. Gougeon A., Royere D., Thibault C. 1991. la fonction ovarienne. In Thibault C., Levasseur M.C. INRA (Edts), la reproduction chez les mammifères et l'Homme. INRA, 273-278.

58. Driancourt MA, Gougeon A; Monniaux D, Royere D, Thibault C. Folliculogenèse et ovulation. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C et Levasseur MC Eds Ellipses INRA 2001. 317-335.
59. Drion PV ; Remy B ; Houtain J.Y ; Mc Namara M; Baril G; Heyman Y; Cognie Y; Theau-Cleent MC; Leboeuf B; Ectors F; Segers K; Beckers JF: Utilisation répétée des gonadotropines exogènes dans le contrôle de la reproduction : justifications, relations structure-activité biologique, effets secondaires potentiels. Une synthèse. *Ann Méd Vet*, 1998, 142, 373-396.
60. Eldsen R.P., Nelson L.D., Seidel G.E.Jr, Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 1978, 9, 17-26.
61. Ellington, J.E. (1995). The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet.* 81, 313-328.
62. Pannuyer M., 2000. Les vagues folliculaires chez la vache: applications pratique à la reproduction. *Point vet.* 2000, 31 (209), 377-383.
63. Erickson B.H., 1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fert.*, 10, 97-105. In: Drion et al., 2000. *Anim. Méd. Vét.* 144: 385-404.
64. Erickson G.F. Hsueh A.J.W. 1978. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 102, 1275-1282. In Hanzen et al., 2000.
65. Farrin W., Britt J.H. Shaw D.W., Slenning B.D. 1995. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 44,339-349.
66. Fieni F., Tainturier D., Bruyas J.F., Battu L., 1995. Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache. 4-B. 512, 35-49.
67. Findlay J.K. an update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, 1993, 48, 15-23.
68. Fortune J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, 1994, 50, 225-232.
69. Fortune JE, Sirois J, Quirk SM. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrus cycle. *Theriogenology* 1988 ; 29 : 95-109.
70. Fujimoto T., Yoshimaga K., Kond I. 1985. Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat. Rec.* 211, 271-278. In Drion et al., 2000.
71. G.A, Caccia M, Martinez M, Adams GP, Piersson R.A, Mapletoft R.J: The use of estradiol 17 β and progestogen treatment for the control of follicular wave emergence in beef cattle *Theriogenology* 1994; 41-65 abstr.
72. Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Modena, S., Bianchi, R. and Passoni, L. (1993). Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 189-192.

73. Gielen J.Th., Aguer D., Optimum time of Neutra-PMSG administration in superovulated dairy cows for embryo transfert. 4 th Scientifique meeting of A.E.T.E., Lyon, 1988, 111 (Abstr).
74. Ginter O.J., Kot K., Kulick L.J., Martin S., Wiltbank M.C., 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 108, 271-279.
75. Ginther O. J., Kastelic J.P., Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 1989, 20, 187-200. In: Hanzen Ch., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le developpement folliculaire chez la vache: Aspect morphologique et cynétique. *Anim. Méd. Vét.* 2000, 144, 223-235.
76. Gong JG; Bramley TA ; Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod Fert.* 1993. 97 : 247-254.
77. Goodman RL, Karsh FG. Pulsatile of luteinizing hormone: differential suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1980;107:1286-1290.
78. Goodrowe K.L., Howard J.G., Wild D.E. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol 17 B, and progesterone profiles in domestic cats (*Felis Atus*) at natural or induced oestrus. *J. Reprod. Fertil.*, 1988, 82, 553-561.
79. Gordon I., 1996 Reproduction in cattle and buffalos . Vol. 1, Cab international, UK.
80. Gospodarivicz D., Birdwell C.R.. Effects of Fibroblast and epidermal growth factor on ovarian cell proliferation "in vitro". *Endocrinology.* 1977, 100, 1108 (Abst).
81. Goulding D, Williams D.H, Duffy O, Boland M.P, Roche J.F : Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology* 1990; 34:767-778.
82. Gray B.W, Cartee R.E, Stringfellow D.A : The effects of FSH-Priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle . *Theriogenology* 37:631-640,1992 .
83. Greenwald G.S., Terranova P.F. Follicular selection and its control. In the physiology of reproduction ed.E. Knobil et J. Neill et al. Raven press, Ltd., New York, 1989, 11, 387.
84. Greve T., Callesen H., Hyttel P., Hoier R., Assey R., 1995. The effect of exogenous gonadotrophine on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 34, 41-50.
85. Greve T., Embryo-transplantation in dairy cattle: an attempt to analyse factors that may affect embryo number and quality. Deuxième congrès international: "transfert d'embryons chez les mammifères", 1982, 251-276.
86. Grippo, A.A., Henault, M.A., Anderson, S.H. and Killian, G.J. (1992). Cation concentration in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 75, 58-65.
87. Guibault L.A; Grasso.F; Lussier J.G; Rouillier P; Matton P: Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in presence of a dominant follicle. *J.Reprod.Fertil* 1991; 91

88. Guilbault LA; Kohram H; Twagiramungu, H Bousquet, D Dufour, JJ. Control of follicular dominance and synchronization of follicular waves improve superovulation in cattle. 12^{ème} A.E.T.E–Lyon 13-14 Septembre 1996. 61-71.
89. Hahn J: Attempts to explain and reduce variability of superovulation . *Theriogenology* 1992; 37; 269-275.
90. Hanzen Ch., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le developpement folliculaire chez la vache: Aspect morphologique et cynétique. *Anim. Méd. Vét.* 2000, 144, 223-235.
91. Hill B.R., Kuchner L.F., 1996. follicle aspiration prior to superovulation cat, afield study. *Theriogenology*, 45, 324.
92. Hirshfield AN. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol. Reprod*, 1989, 40 : 181-190.
93. Holm, P; and Calesen, H. (1998). In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 579-597.
94. Hughes F.M., Gorospe W.C., 1991. biochemical identification of apoptosis (programed cell death) in granulosa cells: Evidence for potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 192, 2415-2422.
95. Hutchinson L.A. Findlay J.K., De Vos F., 1987. Effect of bovine inhibin, transforming growth factor-b and bovine activin-A on granulosa cells differentiation. *Bioc. Biop. Res., Commun* 146, 1405-1412.
96. Hyttel P., Callesen H., Greve T., Schmidt M., 1991. oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 35, 91-108. in Greve T., Callesen H, Hyttel P., Hoier R., Assey R., 1995. the effect of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 41-50.
97. Hyttel P., Lovendahl P., Bak A., Greve T., 1995 Factor affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dayry cattle. *Journal of animal science* 73, 1539-1543.
98. I.N.R.A. Blastographie du developpement précoce de l'embryon bovin superovulé. *Elev. Et insém.*, 1980, 178, 1-27.
99. Ireland (J.J) et Roche (J.F). Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrus cycle . Dans *follicular growth and ovulation rate in farm animals* . JF Roche and O'Callaghan (Eds) *Mareinus Nijhoff Dordrecht* 1987:1-18.
100. Ireland J.J., Roche J.F. Hypothesis regarding development of dominant follicles during a bovine oestrous cycle. In: J.F. Roche and D. O'Callaghan (Ed). *Follicular Growth and ovulation rate in farm animals*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The netherlands, 1987, 1-17.
101. Jones P.B.C., Welsh Jr.T.H.Hsueh A.J.W. regulation of ovarian progesterin production by epidermal growth factor in cultured granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 1268.

102. Kactelic J.P., Knopf L., Ginther O.J., 1990. Effect of day of prostaglandin F₂-alpha treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 169-180.
103. Kane, M.T., Morgan, P.M. and Coonan, C. (1997). Peptide growth factors and reimplantation development. *Hum. Reprod. Update* 3, 137-157.
104. Kaneko H, Wastanabe K, Taya K, Sasamoto S : Changes in peripheral levels of bioactive and immunoreactive inhibin, estradiol-17b, progesterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone associated with follicular development in cows induced to superovulate with equine chorionic gonadotropin . *Biol reprod* 1992;47:76-82
105. Kastelic J.P. Ginther O.G. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim. Reprod. Sci.*, 26, 13-24.
106. Kastlic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers *Theriogenology* 1990 ; 34 : 499-509.
107. Kastrop PMM; Hulshof SCG; Bevers MM; Destree OHJ, TAM. The effects of A-amanitin and cycloheximide on nuclear progression protein synthesis and phosphorylation during bovine maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 1991;28:249-254.
108. Kennedy L.G., Boland, M.P., Gordon I., 1983. the effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 19, 823, 832.
109. Knopf L., Kastelic J.P., Schallenberger E, Ginther O.J., 1989: Ovarian follicular dynamics in heifers : test of two waves hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. End.* 6: 111-119.
110. Ko J.C.H., Kastelic J.P., Del Compo M.R., Ginther J.O. Effects of ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifer. *J. Reprod. Fert.*, 1991, 91, 511-519.
111. Kohram H; Bousquet D; Durocher J; Guilbault LA : Follicular status and superovulation in cattle : a field trial. *Theriogenology* 1995; 43:252.
112. Kruip T.A.M., Dieleman S.J. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Develop.* 22: 465-473.
113. Leese, H.J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fert.* 82, 843-856.
114. Lehn-Jensen H., Rall W.F., Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology*, 1983, 19, 263-277.
115. Lehn-jensen H., Greve T., Survival of cow blastocysts using short freezing curves. *Nord. Vet. Med.*, 1981, 33, 523-529.
116. Lehn-Jensen H., Survival of cow blastocysts using cooling rates of 1°C/min to -25°C before plugging. *Theriogenology*. 1983, 19, 138 (Abstr).

117. Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L., Monson, S. and Rutledge, J.J. (1999). Hatching ability of in vitro produced cattle embryos is related to time of blastocoele appearance in culture. *Theriogenology*. 51(1), 325.
118. Leibo S.P et Mazur P., Methode for the preservation of mammalian embryos by freezing. In "Methods in mammalian reproduction". Ed. J.C. Daniel, Academic press N.Y., 1978, 179-201.
119. Leibo S.P., Mazur P., Jackowski S.C., Factors affecting survival of mouse embryos during during freezing and thawing, *Exptl. Cell. Res.*, 1974, 89, 79-88.
120. Leibo S.P., Fundamental cryobiology of mouse ova, and embryos. In: The freezing of mammalian embryos. Ciba foun. Sym. 52, Elsevier Excerpta Medica. North Holland, 1977, 69-96
121. Leibo S.P., Mc Grath P., Carvalho E.G., Microscopic observation of intracellular ice formation in mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, 1975, 12, 579.
122. Leibo S.P., Preservation of ova and embryo by freezing. In « New technology in animals breeding » Eds. B.J. Brakett, G.E. Seidel and S.M., Academic press, N.Y., 1981, 127-140.
123. Lopes da Costa L; Chagas J; Silva E; Robalo J; Silva J . Superovulatory response embryo quality and fertility after treatment with different gonadotropins in native cattle . *Theriogenoly Vol. 56 (1) (2001) pp. 65-77.*
124. Lovelock J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1953, 11, 28-36.
125. Lucy M.C. Savio J.D. , Badinga L. De La Sota R.L. Thatcher W.W. Factors that affect ovarian follicle dynamics incattle. *J. Anim. Sci.*, 1992, 70, 3615-3626.
126. Lucy M.C., Savio J.D. Badinga L., De La Sota R.L., Tatcher W.W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.*, 70, 3615-3026.
127. Lussier J.G., Matton P., Guilbaut L.A., Grasso F., Mapletoft R.J., Carruthers T.D., 1994. Ovarian follicular development and endocrin responses in follicular fluid treated and hemi-ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102, 95-105.
128. Lussier JG and Carruthers TD: Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovine follicular fluid . *Theriogenology* 1989; 31: 779-794.
129. Lussier JG; Matton P, Duffour JJ: Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod Fertil* 1987. 81:301-307.
130. Mapletoft RJ, Bo GA, Pierson RA : Factors affecting superovulation in the cow : Practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsl* 1993 ; 11:14-24.
131. Mapletoft RJ, Bo GA, Pierson RA : Factors affecting superovulation in the cow : Practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsl* 1993 ; 11:14-24.
132. Mapletoft RJ, Bo GA, Pierson RA. Recruitment of follicles for superovulation: Food animal; 1994;6 (1): 127-142.

133. Mariana J.C., Millier C. Application de quelques modeles de dynamique des population à l'état de la folliculogenèse ovarieenne. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 1977, 17, 193-206.
134. Massip A., Développement, ultrastructure et cryoconservation de l'oeuf des mammifères. Thèse 1986, 190p.
135. Matton P., Adelakoium V. Couture Y, Duffour J.I., 1981. Growth and replacement of the ovarian bovine follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 52: 813-820.
136. Mazur P., Leibo S.P., Farrant J., Chu E.H.Y., Hanna M.G., Smith L.H., interaction cooling rate , warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In "The frozen cells" (Ciba fond. Symp.) eds. G.E.W. Wolstenholme and M.O'Connor. Churchill, London, 1970, 69-88.
137. Mazur P., The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1965, 125, 658-676.
138. Menezo, Y. (1982). Métabolisme et régulation des premiers stades du développement embryonnaire. Embryo transfer and in vitro fertilization 2nd world conference. Annecy, 20, 21-22 Septembre, P. 17-25.
139. Meryman H.T., Osmotic stress as amechanism of freezing injury. *Cryobiology*, 1971. 8, 489-500
140. Monget P, Monniaux D, Pisselet C, Durand P. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 1993;132:1438-1446.
141. Monniaux D, Chupin D, Saumande J: Superovulatory responses of cattle *Theriogenology* 1983; 19:55-81.
142. Monniaux D., Mandon-Pépin B., Monget P. 1999: L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. *Médecine/Science* 15, 157-166.
143. Monniaux D., Monget P. gonadotropines et régulation paracrine ovarienne. 1997. Intégration des mécanismes de régulation d'un processus physisologique complexe, la folliculogenèse ovarienne. In Combarous Y., Volliland-Neil P. (Fds), les gonadotropines. INRA. Paris, 267-284.
144. Moore N.W. et Bilton R.J. Frozen storage of embryos of farm animals: Progress and implications. In "the freezing of mammalian embryos" Ciba foundation symposium, Eds K. Elliot et J. Whelan, Elsevier Excerpta Medica., Amsterdam, 1977, 52, 203-219.
145. Moser MT, Garverick HA Smith MF. Follicular growth and endocrine patterns of prepubertal heifers administred bovine follicular fluid and and (or) follicle stimulating hormone *Anim. Reprod Sci* 1989. 18 : 227-242.
146. Newcomb R., Investigation of factors affecting superovulation and non surgical embryo recovery from lactating British Fiesen cows. *Vet. Rec.*, 1980. 106, 48-52.
147. Nibart M, Slimane N, Herrera R, Jeanguyot N, Mechkour F, Humblot P, Thibier M. Variations des concentrations plasmatiques des hormones gonadotropes (FSH et LH) et des steroïdes

- (oestradiol-17 β et progestérone) après différents traitements de superovulation chez la vache. *Elevage & insémination* 1988;226:11-30.
148. Nibart M. et Bouyssou B., La transplantation embryonnaire chez les bovins. *Rec Méd. Vét.*, 1981, 157, 71-87.
149. Nibart M. et Thibier M., le transfert embryonnaire en France. 3^{ème} colloque scientifique de l'AETE, Lyon, 1987, 27-39.
150. Nibart M. Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage. *Rec Med Vet* 1991; 167:261-290.
151. Nibart M; Humblot, P. Utilisation des hormones gonadotropes chez les bovins. In *Les gonadotropines*. Y Combarous et P Volland-Nail. Edition INRA Paris. 1997. pp 377-394.
152. Nibart M; Humblot, P. Utilisation des hormones gonadotropes chez les bovins. In *Les gonadotropines*. Y Combarous et P Volland-Nail. Edition INRA Paris. 1997. pp 377-394.
153. Pedersen T., follicle growth in the mouse ovary. In Biggers J.D., Schuetz A.W., oogenesis, Butterworths, London, 1972. 361.
154. Peters A.A., Ball P.J.H., 1987. *Reproduction in cattle*. Butterworths England.
155. Peters the development and maturation of the ovary. *Ann. Biol. Biophys.*, 1976, 16, 271-278. in : Hanzen Ch. Lourtie O., Drion P.V., 2000. le développement folliculaire chez la vache : I. aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vét.* 2000, 144, 223-235.
156. Petr J; Milka J; Jilek F: The effect of PMSG-priming on subsequent superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 1990; 33: 1151-1155.
157. Picton H.M., Tsonis C.G., McNeilly A.S., 1990. FSH causes a time dependant stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in exxes chronically treated with GnRH agonist. *J. End.* 126: 297-307.
158. Pierson RA, Ginter OJ, Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Therio* 1988, 29 : 21-37.
159. Putney D.J., Drost M., Thatcher W.W., Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *theriogenology*, 1988, 30, (2), 195-209.
160. Rajakoski E. . The ovarian follicular system in sexually mature heifers iwth special reference to seasonal , cyclical and left right variations *Acta.endocr*, 1960 suppl 52, 1-67.
161. Rajamahendran R, Canseco R.S, Denbow C.J: Effect of low dose of FSH given at the beginning of the oestrus cycle and subsequent superovulatory response in holstein cows . *Theriogenology* 1987; 28:59-65 .

162. Rajamahendran R., Sianangama P.C : Effect of human chorionic gonadotrophin (HCG) on dominant follicles in cows. Accessory corpus luteum formation progesterone production and pregnancy rates . J.Reprod.Fert.1992; 95:577-584 .
- 163.Rall W.F., Czlonowska M., Barton S.C., Polge C., Cryoconservation of day-4 mouse embryos by methanol. J. Reprod. Fertil., 1984. 70, 293-300.
- 164.Ravindra JP; Rawlings NC; Evans A.C.O; Adams GP. Ultrasonography study of ovarian follicular in ewes during the estrus cycle. J.Reprod Fert. 1994, 101, 501-509.o
- 165.reenan J.M. et Beeham D., Methods of induction of superovulation in the cow and transfert results. Proc. EEC conference "Egg transfert in cattle", CEC Eur. 5491, 1976, 19-34. Shea B.F., Evaluating the bovine embryo. Theriogenology, 1981. 15, 31-42.
- 166.Renard J.P., La conservation d'embryons chez les mammifères. In « le transfert d'embryons chez les mammifères », C. Merieux et M. Bonneau (Eds), 1982, 287-307, fondation Mrieux , Lyon..
167. Rettmer I; Stevenson J.S; et Corah L.R: Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection og a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus J. Anim Sci. 1992. 70:508
168. Rieger D ; Desaulnier D ; and Goff AK : Ovulatory response and embryo yield in superovulated Holstein heifers given priming dose of FSHp at a day 2 of the estrous cycle Theriogenology 1988; 30: 695-699.
169. Roberge S; Rieger D; Rawlings NC. Perioovulatory LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers .Theriogenology 1995; 44:59-70,
170. Romero A ; Albert J ; Brink Z ; Seidel GE Jr. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle . Theriogenology 1991; 35: 265 (Abstr).
- 171.Saumand J. la folliculogénèse chez les ruminants. Rsc. Méd. Vét. 1991, 167, 205-218.
172. Saumande J., 1980. Concentration of luteinizing hormone, œstradiol-17 bêta and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. Journal of Endocrinology, 84 : 425-437.
173. Saumande J. La production d'embryons chez les bovins: quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation? INRA Prod Anim 1995; 8(4): 275-283.
174. Saumande J: Induction d'une superovulation dans l'espèce bovine . Caractéristiques de l'agent stimulant. Effet sur la croissance folliculaire. Traitements utilisés Conséquences hormonales. Ann. Med. Vét. 1977. 121, 449-477.
175. Saumande J: Relationships between ovarian stimulation by PMSG and steroid secretion. In : Control of reproduction in the cow (Sreenan J.M Ed). pp 169-194. Martinus Nijhoff, The Hague. 1978.
176. Saumande J: Superovulation in cattle : last improvements and prospects. 3rd meeting european embryo transfer association. Lyon 4-5 septembre 97-141. 1987.

177. Saumande J; Procureur R; Chupin D: Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology*. 1984; 21; 727-731.
178. Savio J.D., Boland M.P., Hyne N., Mattiacci M.R., Roche J.F. Will the first follicle of the oestrous cycle of heifer ovulate following luteolysis on d7. *Theriogenology*, 1990b, 33, 667-687.
179. Savio J.D., Boland M.P., Hyne N., Roche J.F. 1990a. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 88, 569-579.
180. Savio J.D., Boland M.P., Hyne N., Roche J.F. 1990b. Development of dominant follicles and length of ovaian cycle in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 88, 581-591.
181. Savio J.D., Keenan L., Boland M.P., Roche J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of hifers. *J. Reprod. Fertil.* 1988, 83, 663-671.
182. Schallenberger E., Knopf L., Veh F.V., Tenhumberg H., Aumuller R., Endocrine and ultrasonic evaluation of avarian response in cattle to superovulation induced by continus FSH administration, repeated FSH injection or PMSG injection. *Theriogenology*, 1988, 29 (1), 302.
183. Schams D., Menzer C., Scallenberger E., Hoffmann B. Hanh J, Hahn R., Some studies on pregnant mare serum gonadotropine (PMSG) and on endocrine response after application for superovulation in cattle. In „controle of othe reproduction in cow“. (Sreenan J.M. Ed.), 1978. 122-143. Martinus Nijhoff, the Hague.
184. Schneider H.J.Jr., Castelberry R.S., Griffin J.L., commercial aspects of bovine embryo transfert. *Theriogenology*, 1980. 13, 73-85.1980;
185. Schneider U. et Mazur P., Osmotic consequence of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 1984. 21, 68-79.
186. Scriban R., *Biotechnology*, 5^{ème} edition, 1999. p 629-761.
187. Secchi , 1976. in : Deltang F. Et Hivorel F., to control reproduction is to control the futur. Doc. SANOFI S.A.
188. Seidel G.E.Jr., Seidel S.M., Traoining manual for embryo transfert in cattle. FAO , 1991, animan production and health paper, 77.
189. Sirard M.A., Florman H.M., Leiberied-Rutledge M.L., 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.* 40: 1257-1263.
190. Sirois J., Fortune J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifer monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 1988, 39, 308 (Abst).
191. Sirois J., Fortune J.E., 1990. Lengthening the bovine estrus with low level of exogenous progesterone : a model for studying ovarian follicle dominance. *Endocrinology* 127: 916-925.
192. Sirois J., Fortune J.E., 1990. Monitoring ovarian follicular development in cattle by ultrasound imaging: A 1990 update, embryo transfert. *Newsletter.* 8: 9-16.

193. Skinner M.K. Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology*, 1987, 121, 1892-1896.
194. Slimane N, Nibart M, Thibier M. Délais d'apparition de l'oestrus et des ovulations après traitement de superovulation chez des femelles bovines de race laitière. *Elevage & insémination* 1984;199:21-29.
195. Snow M.H.I., Monk M., 1983. Emergence and migration of mouse primordial germ cells. In McLaren A., Wylie C.C. (Eds). Cambridge university press. 115-135.
196. Spicer L.J., Echterkamp S.E. 1986a. ovarian follicular growth function and turnover in cattle : a review. *J. Anim.Sci.* 62: 428-451.
197. Staigmiller et England 1982) Staigmiller RB and England BG : Folliculogenesis in the bovins . *Theriogenology* 1982; 17: 42-52.
198. Stevenson B.R., Paul B.L., 1989. The molecular constituents of intercellular junction. *Cur. Opin. Cell. Biol.* 1: 884-891.
199. Sunderland S.J., Crowe M.A., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J. 1994, Selection dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* 101, 547-555.
200. Taylor C., Rajamahendran R., 1991. Follicular dynamics corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71: 61-68.
201. Thibault C., Levasseur M.C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'Homme. Coédition INRA-Elipse, Paris, 928p.
202. Todoroki J; Yamakuchi, H; Mizoshita, K; Kubota N; Tabara N; Noguchi J; Kikuchi K; Watanabe G; Taya K; and Kaneko H : Restoring ovulation in beef donor cows with ovarian cysts by progesterone-releasing intravaginal silastic devices . *Theriogenology*, Vol. 55 (9) (2001) pp. 1919-1932.
203. Touati et al, 1989a Touati K., Van Der Zwalnen, Ectors FS., Beckers JF., Ectors F: Low doses of FSH early in estrous cycle enhances superovulatory response in heifers *Theriogenology* 1989;31:269 (abstract).
204. Touati K, Beckers J.F, Ectors F : Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: Better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment (abstract) .*Theriogenology* 1991; 35:285
205. Touati K., Van Der Zwalnen, Ectors FS., Beckers JF., Ectors F: Low doses of FSH early in estrous cycle enhances superovulatory response in heifers *Theriogenology* 1989;31:269 (abstract).
206. Touati, K, (1993). Contribution à l'étude de la production et de la cryoconservation d'embryons et demi-embryons dans l'espèce bovine ; Thèse de doctorat vétérinaires, 106 pages.
207. Trounson A.O., Willadsen S.M, Rowson L.F.A., Newcomb R., The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fertil.* 1976, 46, 173-178.

208. Turzillo A.M., Fortune J.E. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifer. *J. Reprod. Fert.* 89, 643-653. In: Prion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen Ch. 2000, le développement folliculaire chez la vache 2: Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post partum. *Ann. Méd. Vét.* 2000, 144, 385-404.
209. Turzillo AM, Fortune JE. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J Reprod Fert.* 1990. 89 : 643-653.
210. Twagiramungu H; Guilbault L.A; Duffour J.J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle : a review. *J. Anim Sci* 1995. 73:3141.
211. Twagiramungu H; Guilbault L.A; Proulx J et Duffour J.J. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in post-partum cyclic cows treated with buscrelin and cloprosténol *J Anim Sci* 1994;72: 1796.
212. UNCEIA, Octobre 93-Juillet 95
213. Vallet J.C., Casamitjana P., Bribion P. Perrin J. Technique de production de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Rec. Méd. Vét.*, 1991, 167, 293-301).
214. Van Der Schams A., Prediction of follicular development and embryo production by echography after superovulation induction. *Theriogenology*, 1988. 29 (1), 321.
215. Van der Schams A., Van Der Westerlaken L.A.J., De Wet A.A.C., Eyestone Wh., De Boer H.A., 1991. Ultrasound Guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35, 265 (Abstr).
216. Wandji S.A., Fortier M.A., Sirard M.A. 1992, Differential response to gonadotropins and prostaglandins E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. *Biol. Reprod.* 46, 1034-1041.
217. Wandji S.A., Fortier M.A., Sirard M.A., 1992. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. *Biol. Reprod.* 46: 1034-1041.
218. Wang H. Wu M., Xu K., Hagel W.C., Mapeltoft R.J., Control of the superovulation in the cow with a pMSG antiserum. *Theriogenology* , 1987. 27, 292.
219. Webb R., Gong J.G., Bramley T.A. 1994, Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 41, 25-30.
220. West G., West C., Risley D., Donaldson L.; Regime on percent ova fertilized in superovulation cows. *Theriogenology*, 1984, 21 (1), 273.
221. Westergaard L. Callesen H. Hyttel P., 1985. Meiosis inducing substance (MIS) in bovine preovulatory follicles. *Zuchthygiene*. 20: 217-221.

222. Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P., Survival of mouse embryos frozen to -196°C and 269°C . *Science (Wash D.C.)* 1972, 178, 411-414.
223. Whittingham D.G., Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In Ciba foundation symposium, Eds. K. Elliott et J. Whelan, Elsevier excerpta medica, Amsterdam, 1977, 52, 97-108.
224. Whittingham D.G., Wood M., Farrant J., Lee H., Halsey J.A., Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . *J. Reprod. Fertil.* 1979, 56, 11-21.
225. Willadsen S.M., Trounson A.O., Polge C., Rowson L.E.A., Newcomb R., Low temperature preservation of cow egg. In "Egg transfert in cattle" ed. L.E.A. Rowson, EEC commission luxembourg, 1976. 117-127.
226. Willadsen S.M., Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. "In the freezing of mammalian embryos". Ciba foundation symposium, Eds. K. Elliott et J. Whelan, Elsevier excerpta medica, Amsterdam, 1977, 52, 175-193.
227. Willet E.L., Black W.G., Casida L.E., Stone W.H., Buckner P.J. Successful transplantation of afertilized bovine ovum. *Science*, 1951, 113, 247 (Abst.).
228. Willet E.L. et Buegner P.J., Refractioness of cows repeatedly superovulated with gonadotrophins 1953, 36, 1083-1088.
229. Williams J.S., The surface activity of PVP and other polymers and their antihaemolytic capacity. *Cryobiology*, 1983. 20, 521-526.
230. Wilmot I. Rowson L.E.A., Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 1973. 92, 686-690.
231. Wilmot I., Podge C., Rowson L.E.A., The effect on cow embryos of cooling to $20, 0$ and -196°C . *J. Reprod. Fertil.*, 1975. 45, 409-411.
232. Wilson J.M., Jones A.L., Moor K., Looney C.R., Bondioli K.R., 1993. Superovulation in cattle with a recombinant DNA bovine follicle stimulating hormone. *Ann. Reprod. Sci.* 33, 71-82.
233. Witschie E. 1948. Migration of the germ cells of the human embryos from the yolk to the primitive gonadal fold. *Contrib. Embryol.* 32: 67-80.
234. Wright J.M., Non-surgical embryo transfert in cattle: embryo recipient interactions. *Theriogenology*, 1981, 15, 43-56.
235. Xiao S., Findley J.K., Robertson J.M., 1992., the effect of bovine activin and follicle stimulating hormone (FSH) suppressing protein / follistatin on FSH induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol. Cel. End.* 133: 134-139.
236. Yadav MC, Walton JS, Leslie KE. Plasma concentration of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotropin. *Theriogenology* 1986;26 (4):523-540.

237. Ynagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil E., Neil J.D. (Eds). The physiology of reproduction. Second edition. Raven press Ltd, Neww York 1994. 189-317. In Hanzen Ch., Lourtie O., Drion P.V. 2000. Le developpement folliculaire chez la vache: aspects morphologiques et cynétiques. Ann. Méd. Vét. 2000, 144, 223-235.
238. Zeitoun M.M., Yassen A.M., Hassan A.A., Fathelbas A.Z., Wise T.H., Maurer R.R., Superovulation using PMSG and anti-PMSG in beef cows. Theriogenology, 1988, 29 (2), 339.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents, ma mère et mon père, qui par leurs encouragements et leur disponibilité, m'ont poussé à persévérer et à donner le mieux de moi-même. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A feu mon grand père Cheikh M'Hamed que le destin ne m'a pas permis de connaître, mais qui demeure pour moi un exemple de sagesse et de dévouement pour les bonnes causes.

A mes frères et ma sœur, pour leur soutien et leur bienveillance.

A tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu et encouragé, plus spécialement oncle Toufik qui était aussi préoccupé par mon avenir que par celui de ses propres enfants et oncle Kamal pour son aide technique.

A celle qui portera bientôt mon nom, Amina, qui a su par sa présence me donner le soutien moral et technique durant toutes les étapes de ce travail, qu'elle trouve ici le signe de mon profond respect et ma grande gratitude.

A ma future belle mère, belles sœurs, beaux frères pour leur gentillesse

A feu Saïdi Noureddine, puisse Dieu lui accorder sa sainte miséricorde.

Remerciements

A Monsieur le docteur Lafri M. mon promoteur, pour m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail. A Monsieur le docteur Touati K. mon co-promoteur pour son aide précieuse, aussi bien sur le plan technique que logistique dans toutes les étapes de la réalisation de cette thèse.

A Monsieur Guétarni D. grâce à qui nous avons pu faire ce travail au niveau de la station expérimentale, mais aussi pour son soutien et sa disponibilité. A Monsieur Ferrouk M. pour ses conseils et son aide précieuse.

A mes confrères Dr Gharbi S., Saadaoui R., Latreuch M., pour leur aide sur le terrain.

A mon collègue Amara R. pour son aide précieuse.

A Messieurs : Niar A., Kaidi R. et Ferrouk M., d'avoir voulu examiner mon travail.

A Monsieur Moghni M., directeur général du centre d'insémination artificielle et d'amélioration génétique (CNIAAG), ainsi que Monsieur Boudjakdji A. pour leur collaboration.

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

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce projet.

Résumé

Dans un objectif de sélection et d'amélioration des performances de production des animaux de rente, la biotechnologie se propose d'utiliser la physiologie de la vache pour arriver à ces fins. C'est ainsi que les chercheurs dans ce domaine ont mis au point une méthode qui nous permet d'utiliser le potentiel reproductif de la vache en limitant le gaspillage, par atrésie, des ovocytes présents au niveau de l'ovaire. En effet, en injectant une gonadotropine à certains moment du cycle on peut produire une superovulation. Comme l'utérus de la vache ne peut contenir plusieurs fœtus en même temps, on a pensé au devenir des ces embryons produits après insémination de ces vaches, on a donc pu les transférer sur des vaches porteuse, ou encore les congeler.

Le problème est que la vache est soumise à des facteurs qui donnent une variabilité importante des résultats, dans la qualité des embryons ou leur quantité.

Notre travail met le point sur un des facteurs de variation les plus important qui est la qualité de l'extrait Hypophysaire utilisé. Nous avons vu qu'avec un produit du commerce (Pluset), les résultats étaient très faibles avec un nombre réduit d'embryons et tous de mauvaise qualité avec un pourcentage de non fécondé très élevé. Le Stimufol qui est produit dans les laboratoires du Dr Beckers J.F., au niveau de la faculté de médecine vétérinaire de Liège (Belgique), a donné des résultats remarquables et très différents de ceux du premier produit. Cela est du au degrés de la solution et du respect des proportion FSH/LH respectées et adéquates. Nous avons pu ainsi récolter 27 embryons, parmi eux 15 ont été congelés et un transféré. D'autres travaux sur un nombre de récoltes plus important sont nécessaires pour plus de certitude. Cela nous permettra aussi de maîtriser la technique et de pouvoir la proposer aux éleveurs.

Mots clef : Superovulation, extraits hypophysaires, transfert d'embryons,

Table de matières

Dédicace	
Remerciements	
Résumé	
Table de matière	
Abréviations	
Tableaux et figures	

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale.....	01
<u>CHAPITRE I</u> : Rappels physiologiques	
I. Rappels physiologiques sur le fonctionnement ovarien dans l'espèce bovine.....	03
I.1. Introduction.....	03
I.2. Les différentes phases de la croissance folliculaire.....	03
I.2.1. Phase de multiplication.....	03
I.2.2. Phase de croissance.....	04
I.2.2.1. Follicule primordial.....	04
I.2.2.2. Follicule primaire.....	05
I.2.2.3. Follicule secondaire.....	05
I.2.2.4. Follicule tertiaire.....	05
I.2.2.5. Follicule mûr:.....	06
I.2.3. Phase de maturation.....	07
I.2.3.1. La maturation nucléaire de l'ovocyte.....	07
I.2.3.2. Maturation cytoplasmique.....	08
I.2.3.3. Maturation membranaire.....	08
I.3. L'atrésie folliculaire.....	08
4. Régulation hormonale de la folliculogenèse.....	09
I.3.1. Phase gonadotrope indépendante.....	09
I.3.2. Phase gonadotrope dépendante.....	10
— I.4. Dynamique de la croissance folliculaire.....	11
I.4.1. Notion de vagues folliculaires.....	11
I.4.2. recrutement.....	12

3.3. Traitements à base de liquide folliculaire.....	43
3.4 Les traitements physiques.....	44
A/Méthodes par électrocautérisation.....	44
B/Méthodes par rupture manuelle du follicule dominant.....	44
3.5. Les traitements hormonaux.....	45
3.5.1. Les traitements à base de valérate d'oestradiol.....	45
3.5.2. Les traitements à base de human-Chorionic-Gonadotropine (h.C.G) ...	47
3.5.3. Les traitements par des agonistes de la GnRH.....	47
3.5.4. Utilisation de la FSH recombinante bovine.....	49
4. Caractéristiques physiologiques des animaux superovulés.....	49
4.1. Endocrinologie chez les donneuses superovulées.....	49
4.2. Caractéristiques de l'œstrus et des ovulations.....	50
4.3. Caractéristiques des profils hormonaux de la LH.....	51
4.4. Caractéristiques du profil hormonal de la FSH.....	52
4.5. Caractéristiques du profil hormonal de E2.....	54
4.6. Caractéristiques du profil hormonal de la Progestérone (P4).....	55
4.7. Caractéristiques ultra-structurales des ovocytes.....	56
5. Facteurs de variation de la réponse aux traitements superovulatoires.....	57
5.1. Facteurs intrinsèques.....	57
5.1.1. Etat des ovaires.....	57
5.1.2. L'âge.....	58
5.1.3. La race.....	58
5.1.4. Intervalle post-partum.....	58
5.1.5. La production laitière.....	59
5.2. Facteurs extrinsèques.....	59
5.2.1. La saison.....	59
5.2.2. Alimentation, éléments d'ambiance et stress.....	59
5.2.3. Effet de l'extrait hypophysaire utilisé.....	60
6. Collecte d'embryons.....	62
7. Classification des embryons.....	63
8. Cryoconservation des embryons.....	67

I.4.3.sélection.....	12
I.4.4.dominance.....	13
II. Caractéristiques du cycle oestral chez la vache.....	15
II.1.Introduction.....	15
II.2.Hormone intervenants dans la régulation du cycle oestral.....	15
II.2.1.Hormone hypothalamique (GnRH).....	15
II.2.2.Hormones Hypophysaires (FSH, LH).....	17
II.2.3.Les stéroïdes ovariens.....	17
II.2.4.Les peptides ovariens.....	18
II.3.Rétrocontrôle stéroïdien sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	18
II.3.1. Le feedback négatif.....	18
II.3.2. Le feedback positif.....	20
II.4.Les différentes phase du cycle oestral chez la vache.....	23
II.4.1.Le proestrus.....	23
II.4.2.L'oestrus.....	23
II.4.3.Le metoestrus.....	24
II.4.4.Le dioestrus.....	24
III. Fécondation et développement embryonnaire.....	25
III.1. Fécondation.....	25
III.2.Développement embryonnaire précoce.....	26
III.2.1.Premières divisions cellulaires.....	28
III.2.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation.....	30
III.2.3. L'implantation.....	31

CHAPITRE II : production et transfert d'embryons

1. Introduction.....	33
2. Les différentes Hormones utilisées dans le traitement de superovulation.....	34
2.1Utilisation de l'eCG (PMSG).....	34
2.2. Utilisation de la FSH.....	38
3. Voies d'amélioration des résultats de la superovulation.....	40
3.1 Introduction.....	40
3.2 Les prétraitements de gonadotropines ou «Gonadotropin priming ».....	41

8.1. Rappels physiologiques et biophysiques sur la cryoconservation.....	68
8.1.1. Cristallisation.....	68
8.1.2. Addition de cryoprotecteurs dans le milieu de congélation.....	69
8.1.3. Vitesse de congélation et de déshydratation de l'embryon.....	71
8.1.4. La décongélation.....	71
8.1.5. Retrait du cryoprotecteur.....	71
8.2. Protocole de cryoconservation.....	72
8.2.1. La congélation équilibrée.....	72
A/Equilibration dans le milieu cryoprotecteur.....	72
B/Congélation.....	73
C/Décongélation et déglycéolisation.....	73

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Introduction.....	74
2. Matériel et méthodes.....	74
2.1. : Animaux.....	74
2.2. : Matériel.....	75
2.3. : Extraits hypophysaires et traitements.....	75
2.4. : Protocole de traitement de superovulation et de synchronisation.....	76
2.5. : Collecte d'embryons.....	81
3. Résultats.....	82
3.1. Résultats du groupe traité au « stimufol ».....	82
3.2. Résultats du groupe traité au « pluset ».....	92
3.3. Etude comparative des résultats obtenus avec les deux extraits hypophysaires Stimufol et Pluset.....	95
4. Discussion.....	99
5. Conclusion.....	102
6. Recommandations.....	104

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abréviations

- µm : micromètre
CJ : corps jaune
e.C.G : equine chorionic gonadotrophin
E2: estradiol
EGF: epidermal growth factor
Emb.: embryon
FD: follicule dominant
FGF: fibroblast growth factor
FSH: follicle stimulating hormone
GH: growth hormone
GnRH: gonadotrophine releasing hormone
hCG: human chorionic gonadotrophine
I.A: insémination artificielle
I.V: intra veineuse
IGFPB: insulin-like growth factor binding protein
LH: luteinising hormone
M: mole
mg: miligramme
mm: millimètre
Nbr.: nombre
NPY: neuropeptide Y
OPU: ovum pick up
P4: progesterone
PBS: phosphate buffered saline
PG: prostaglandine
PGF2α: prostaglandine F2α
PM: poids moléculaire
PMSG: pregnant mare serum gonadotrophine
TGF: transforming growth factor
TNF: tumor necrosis factor
U.I.: unité internationale

ZP: zonal protein

Tableaux et figures

Figure 1 : différentes phases de la croissance folliculaire (Peters et Ball, 1987).....	19
Figure 2 : Description d'une vague folliculaire (Ennuyer, 2000).....	26
Figure 3 : Evolution des vagues folliculaire au cours.....	26
d'un cycle chez la vache (Ennuyer, 2000)	
Figure 4 : Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire	35
(Peters et Ball, 1994)	
Figure 5 : Evolution des différentes hormones au cours.....	37
du cycle chez la vache (Ennuyer 2000)	
Figure 6 : Fécondation et premières division de l'embryon (Secchi, 1976).....	42
Figure 7 : Correspondance de l'état d'évolution de l'embryon.....	44
avec son âge(Peters et Ball, 1994)	
Figure 8 : Schéma du traitement à la PMSG sur chaleurs naturelles.....	50
Figure 9a : Schéma du traitement à la PMSG sur cycle maîtrisé(Chupin, 1988).....	50
Figure 9b : Protocole de superovulation à la FSH sur chaleurs naturelle et sur cycle maîtrisé (Nibart 1991).....	52
Figure 10 : protocole de superovulation pour OPU (Guilbault et al., 1996).....	62
Figure11 : Evolution des concentrations hormonales au cours d'un traitement de superovulation(Nibart et al, 1988).....	66
Figure 12 : Protocole de traitement (Stimufol)	92
Figure 13 : Fréquence de venue en chaleurs des vaches du lot 1(stimufol).....	97
Figure 14 : Fréquence de venue en chaleurs pour les vaches du lot 2 (stimufol).....	97
Figure 15 : resultats global de la classification des embryon du lot 1 (stimufol)).....	101
Figure 16 : resultats global de la classification des embryon du lot 2 (stimufol).....	101
Figure 17a : Embryon dégénéré de la vache 1	105
Figure 17b : les 2 embryons obtenus à partir de la vache 1.....	105
Figure 18 : la totalité des 11 embryons de la vache 2 avant classification	105
Figure 19 : quelques uns des embryons de bonne qualité de la vache 2 après classification.....	106

Tableau 1: chronologie du développement de l'embryon bovin (Menezo et al, 1982).....	39
Tableau 2 : Effet de l'injection d'Anti-PMSG sur le nombre d'ovulations et la qualité des embryons (3000 UI PMSG). (Saumande et al, 1984).....	48
Tableau 3 : Protocole de traitement PMSG/Anti-PMSG(Sreean et Beeham, 1976).....	49
Tableau 4: Préparations commerciales hypophysaires utilisées pour la superovulation (Baril et al,1993; Nibart et al, 1997).....	73
Tableau 5: Effet de la dose de FSH sur la production d'embryons chez les bovins (Donaldson, 1984).....	74
Tableau 6 : Productions d'embryons par de vaches superovulées par FSH selon le lot de fabrication (Données UNCEIA, Octobre 93-Juillet 95).....	75
Tableau 7 : Nombre et moyenne d'embryons récoltés après un ou deux lavages des cornes utérines (Touati, 1993).....	76
Tableau 8: Diamètres externe (DE) et épaisseur de la pellucide (EP) d'embryons bovins en fonction du stade de développement embryonnaire (Lonergan, 1992).....	77
Tableau 9: le stade du développement embryonnaire normal en fonction du jour de l'oestrus (Seidel et al., 1991).....	78
Tableau 10: Les taux de gestation des embryons classés dans 4 groupes basé sur la morphologie (Shea, 1981).....	80
Tableau 11 : Evolution de la cryoconservation chez les différentes espèces (Touati 1993)...	81
Tableau 12 : protocole de traitement au « Stimufol ».....	91
Tableau 13a: Protocole de traitement de superovulation au Pluset du lot 1.....	92
Tableau 13 b: Protocole de traitement de superovulation au pluset du lot 2.....	93
Tableau 13 c: Protocole de traitement de superovulation au pluset du lot 3.....	94
Tableau 13 d: Protocole de traitement de superovulation au pluset du lot 4.....	95
Tableau 14: Evaluation globale de la réponse au traitement de superovulation (Stimufol)...	96
Tableau 15: Résultat des récoltes du lot 1 et 2 (stimufol).....	98
Tableau 16: Résultat individuel des récoltes du lot 1 et 2 (stimufol).....	99
Tableau 17: Résultat global de la classification des embryons récolté du lot 1 et 2 (stimufol).....	100
Tableau 18: Détail de la classification des embryons et proportions par rapport aux résultats globaux des différentes classes (stimufol).....	102

Tableau 19: Proportions des différentes catégories d'embryons (stimufol).....	103
Tableau 20: Détail individuel des différentes catégories d'embryons et proportions par rapport aux résultats globaux (stimufol)(embryon dégénéré isolé en haut).....	104
Tableau 21: Evaluation globale de la réponse au traitement de superovulation.....	107
Tableau 22: Résultat des récoltes du lot 1 et 2.....	107
Tableau 23: Résultats individuels de la réponse au traitement de superovulation des lots 3 et 4.....	109
Tableau 24: Tableau comparatif de l'évaluation globale de la réaction des vaches obtenue avec les deux extraits hypophysaires.....	110
Tableau 25: Tableau comparatif de la qualité des embryons obtenus avec le STIMUFOL et le PLUSET.....	111
Tableau 26: Comparaison des embryons produits par les deux extraits hypophysaires après classification.....	112

Partie Bibliographique

INTRODUCTION GENERALE

Contrairement à ce qui se passe chez le mâle où la production des spermatozoïdes se fait d'une manière continue dès la puberté, chez la vache le capital de cellules reproductrice est acquit dès les dernières périodes de la vie foetale. Dès la puberté, chez plusieurs espèces, un certain nombre de follicules entament une croissance, un à deux seulement arrivent à maturité donnant ainsi un à deux produits si la fécondation a eu lieu et la gestation menée à terme.

L'atrésie sera le sort de la plupart des follicules sortis du pool de réserve. Sachant que durant sa carrière une vache, portant un potentiel de 100.000 cellules reproductrice, donnera naissance à environ une dizaine de produits seulement, ce qui nous permet de dire qu'il existe d'un gaspillage énorme ; de ce fait, la recherche sur les biotechnologies de la reproduction ont permis une avancée importante dans la réduction de cette perte. En effet la superovulation a pour objectif d'améliorer l'utilisation du patrimoine d'ovocytes que possède la femelle à la naissance, elle propose de multiplier le nombre d'ovulations simultanées, ce qui a pour conséquence une augmentation considérable du nombre de produits par vache en les transférant sur d'autres vaches appelées porteuses. Cela est surtout intéressant pour les animaux à haut potentiel génétique qu'il serait dommage de ne pas exploiter au maximum.

Les premières tentatives de transfert d'embryons ont été faites avec succès chez la lapine et ce en 1890, ce qui prouve que l'idée est assez ancienne, mais cela n'intéressait que des animaux de laboratoire. Ce n'est qu'en 1951 que le premier veau issu de transplantation embryonnaire est né à l'université du Wisconsin (Willet et al., 1951). Ces travaux restent au stade de recherches, ce n'est que quelques années plus tard que le transfert d'embryon devient une technique d'élevage, surtout avec l'avènement des traitements de maîtrise du cycle.

En Europe le transfert d'embryons bovins est devenue presque une technique courante, cela est démontré par l'évolution du nombre d'embryons transplanté durant ces dernières années, ce qui montre l'importance de cette méthode tant sur le plan économique que scientifique car elle a permis de faire des avancées importantes dans la connaissance de la physiologie de la reproduction chez la vache et d'autres espèces où la technique ne cesse de se développer tel que les ovins (Vallet et al., 1991), les équins (Allen et Antezak, 1985) et même les carnivores (Goodrowe et al., 1988).

Le transfert d'embryons comporte plusieurs étapes dont le bon déroulement est nécessaire à la réussite de l'opération. D'abord la production d'embryons dont le nombre peut être augmenté par la superovulation, en utilisant une gonadotropine à un stade précis du cycle oestral. Ces embryons produits peuvent avoir deux destinations: la première est la transplantation directe sur des receveuses préalablement préparées, mais il arrive que le nombre de receveuses est insuffisant; la deuxième alternative s'offre alors à travers la congélation et le conditionnement en paillettes ce qui permet de conserver les embryons produits et c'est ce qui a permis aussi les échanges commerciaux entre pays.

Notre travail tente de vérifier le degré d'influence de ce facteur aussi bien sur la quantité que sur la qualité des embryons produits.

Chapitre I :

Rappels physiologiques

I.RAPPELS PHYSIOLOGIQUES SUR LE FONCTIONNEMENT DE L'OVAIRE DANS L'ESPECE BOVINE

I.1.Introduction

L'ovaire des mammifères est un organe de stockage des ovocytes qui se forment durant la vie embryonnaire (Driancourt et al., 1991), constituant une réserve de follicules. Il est en perpétuel remaniement, c'est ainsi que tous les stades du développement folliculaire peuvent coexister sur un même ovaire. Dès la puberté, un certain nombre de follicules quittent régulièrement (à chaque cycle d'environ 21 jours) leur réserve pour ovuler ou le plus souvent s'atrophier. Les différentes étapes conduisant à l'ovulation constituent la folliculogénèse, Sa durée est variable selon les espèces. Elle débute chez la vache vers la 6ème semaine de gestation

I.2.Les différentes phases de la croissance folliculaire:

On désigne sous le terme de folliculogénèse, l'ensemble des processus de croissance et de maturation des follicules ovariens entre le stade de follicule primordial et l'ovulation (Monniaux. et al., 1999), c'est un phénomène continu puisque, chaque jour, des follicules entrent en phase de croissance (Driancourt et al., 1991; Hanzen et al, 2000). La différenciation et la croissance des follicule passe par 3 étapes essentielles: une phase de multiplication qui débute durant la vie embryonnaire, une phase de croissance et une phase de maturation où on a le plus de modifications au niveau de l'ovocyte, elle détermine sa capacité à être fécondé.

I.2.1.Phase de multiplication:

Chez le foetus bovin durant la 6ème semaine de gestation les cellules germinales migrent vers la crête génitale et donnent naissance aux ovogonies. Les facteurs impliqués sont de nature mécanique (Snow et Monk, 1983), et chimique par la fibronectine et des substances chimotactiques d'origine gonadique (Witschie, 1948; Fujimoto et al, 1985). Après leur migration les ovogonies vont se multiplier entre le 60^{ème} et le 170^{ème} jour de gestation (wandji et al., 1992). C'est ainsi que se forme durant la gestation un stock de 2 millions d'ovogonies qui entament, après avoir terminé la phase mitotique, une phase méiotique pour se bloquer en prophase 1 donnant ainsi des ovocytes primaires. L'induction de la méiose serait sous le

contrôle d'un facteur mésosphérique appelé MIS (Meiosis inducing substance), synthétisé par les cellules mésenchymateuses de l'ovaire (Westergaarde et al., 1985). Le contact des ovogonies avec les cellules mésosphérique est donc indispensable pour assurer leur transformation en ovocytes primaires. Durant cette même période quelques cellules endothéliiformes et une membrane conjonctive viennent entourer l'ovocyte formant des follicules primordiaux.

L'importance du stock de follicules constitué dépend de l'espèce (chez la vache il est de 235000), de la race, de l'individu, de l'âge et du niveau hormonal ou du statut de reproduction (Driancourt et al., 1991; Peters, 1976; Cahill et Mauleon, 1980). Progressivement ce stock décroît et est estimé à 40000 vers l'âge de 2 à 3 ans, et 2500 entre 12 et 14 ans.

I.2.2.Phase de croissance

Cette phase ne concerne que 10% du stock de follicules, elle est comprise entre la moment où le follicule quitte la réserve jusqu'à l'ovulation. Sa durée est variable en fonction des espèces et elle concerne à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme.

Pour arriver au stade dit de « De Graaf », le follicule doit passer par plusieurs étapes en commençant par le follicule primordial et en passant par le follicule primaire, secondaire et tertiaire ou cavitaire ou encore appelé antral, c'est ce qu'on appelle la folliculogénèse. Elle est caractérisée par des modifications morphologiques du follicule en développement et est sous la dépendance de certains facteurs hormonaux ou autres comme les facteurs de croissance par exemple

I.2.2.1.Follicule primordial:

C'est le plus petit follicule observés, il est constitué d'un ovocyte ayant un diamètre compris entre 20 et 35 μm bloqué au stade dyplotène (Hanzen et al., 2000) entouré d'un nombre variable de cellules aplaties (Driancourt et al, 1991b) ou rondes, leur taille ainsi que le nombre de cellules rondes de la granulosa est très hétérogène et cela conditionne leur entrée en croissance. Les follicules primordiaux constituent la réserve à partir de laquelle l'ovaire puise les follicules à chaque vague. Le blocage de l'ovocyte est du à un facteur polypeptidique produit par la granulosa qui est l'OMI (oocyte meiosis inhibitor) (Sirard et al., 1989). Sur une

coupe de l'ovaire les follicules primordiaux apparaissent au niveau des couches périphériques et mesurent environ 40 μm de diamètre.

I.2.2.2.Follicule primaire:

Lors du passage du follicule primordial au stade primaire, on note une augmentation du diamètre et l'organisation des cellules folliculeuses en une couche régulière de cellules cubiques. L'élément le plus important durant cette phase c'est l'apparition d'une couche hyaline poreuse constituée de glycoprotéines synthétisées par l'ovocyte lui même, cette enveloppe est la zone pellucide qui a une épaisseur d'environ une dizaine de microns. Trois glycoprotéines majeures composent la zone pellucide: la ZP1, la ZP2 et la ZP3 avec un poids moléculaire respectif de 200, 120 et 83 KD. Lors de la fécondation il n'y a que la ZP3 qui est reconnue par le spermatozoïde (Yanagimachi, 1994). A ce stade du développement, le follicule atteint un diamètre de 60 à 80 μm (Hanzen et al., 2000)

I.2.2.3.Follicule secondaire:

Durant cette phase la zone pellucide est très bien différenciée. L'ovocyte atteint un diamètre de 60 μm , deux à trois couches de cellules cubiques entourent l'ovocyte formant la granulosa. L'ensemble est limité par une membrane basale qui donnera la membrane de Slavjanski. Le diamètre du follicule atteint 200 à 300 μm .

Le follicule secondaire ainsi que les deux autres, forment une réserve folliculaire au repos et occupent les zones les plus périphériques de l'ovaire.

I.2.2.4.Follicule tertiaire:

Il est appelé aussi cavitaire en raison de l'apparition au niveau de la granulosa de petites cavités remplies par un transsudat plasmatique et des sécrétions des cellules folliculaires. Ces cavités grandissent peu à peu jusqu'à ce qu'elles confluent pour n'en former qu'une seule, appelée l'antrum. L'augmentation progressive de la taille de ce dernier entraîne la séparation des cellules de la granulosa et la formation du cumulus oophorus, les cellules qui entourent directement l'ovocyte se différencient et forment la corona radiata ; plusieurs zones de jonction de type GAP junction relient ces cellules entre elles et constituent un moyen de communication entre l'ovocyte et la cavité folliculaire. Deux couches de cellules très

importantes entourent le follicule vers l'extérieur, la première est appelée thèque interne, constituée de cellules riches en ARN et d'enzymes nécessaires à la stéroïdogénèse, la deuxième est appelée thèque externe, elle est formée d'un tassement du tissu conjonctif du stroma ovarien (Hanzen et al, 2000). A ce stade les follicules atteignent une taille de 3 à 4 mm et les ovocytes un diamètre de 100 à 130 μm leur nombre dépend du nombre de follicules entrants en croissance, du taux de croissance folliculaire et de celui des follicules atreétiques (Armsrong, 1993).

I.2.2.5.Follicule mûr:

Encore appelé follicule de « De Graaf », représente la phase terminale du développement, qui ne concerne en fait qu'un sur mille follicules entrés en croissance (Saumande, 1991). Chez la vache ce follicule atteint une taille maximale de 25 mm. Il est formé du nombre le plus élevé de cellules folliculeuses qui ont une activité mitotique minimale. L'ovocyte est toujours entouré par les cellules de la corona radiata et du cumulus oophorus. La cavité folliculaire est gonflée par le liquide folliculaire, les deux théques sont bien différenciées et la membrane de Slavjanski est bien visible. A ce stade la thèque interne devient une glande à part entière et la thèque externe ne forme qu'une couche fibreuse. Lorsque l'antrum est bien formé l'ovocyte entretient des échanges métabolique avec le liquide folliculaire à travers les cellules du cumulus et avec le sang à travers les cellules de la granulosa et la membrane basale.

La durée qui permet toutes ces étapes excède de beaucoup la durée du cycle chez toutes les espèces (Monniaux et Monget, 1997). Chez la vache il faut 42 jours pour permettre à un follicule de 0.13 mm d'arriver au stade préovulatoire (Lussier et al., 1987).

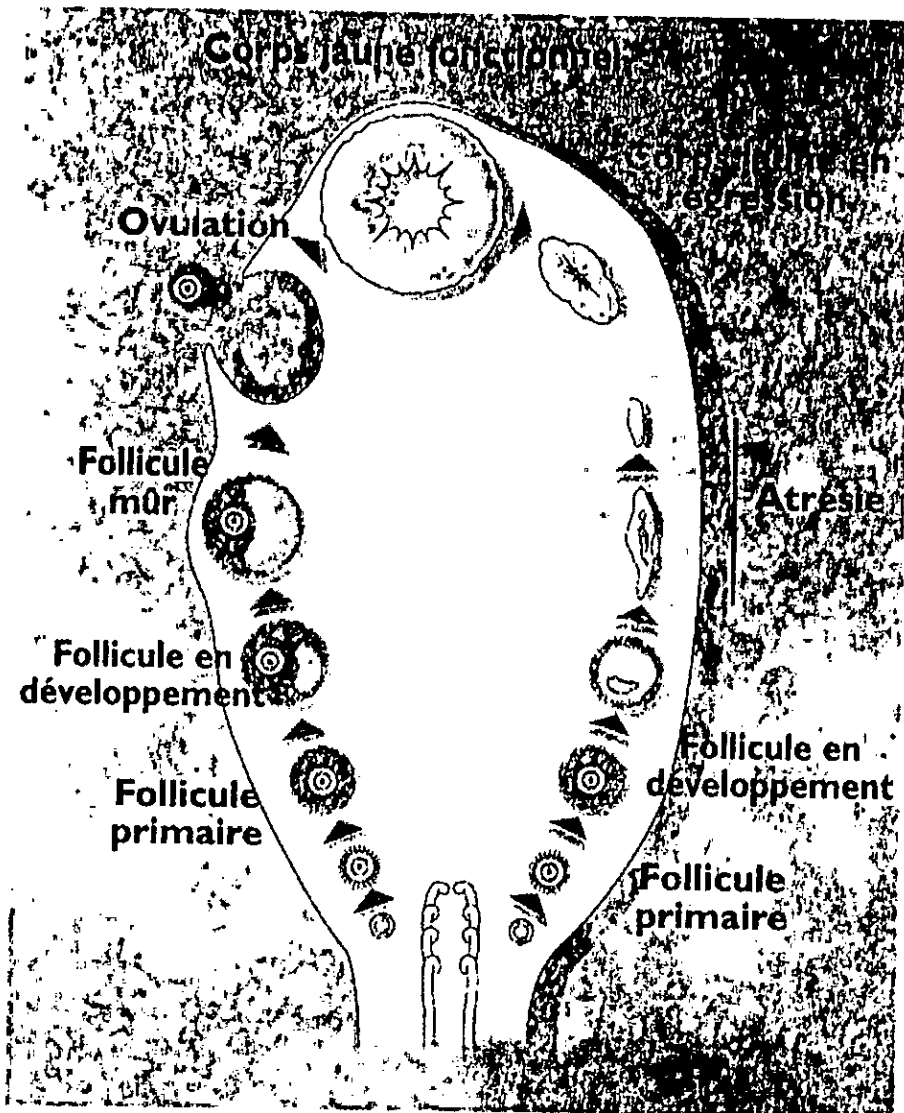


Figure 1 : les différentes phases de la croissance folliculaire (Peters et Ball, 1987)

I.2.3.Phase de maturation:

Elle représente l'étape ultime du développement et concerne plus l'ovocyte ; elle représente l'ensemble des modifications cytoplasmiques et membranaires permettant la constitution d'une réserve suffisante d'ARNm, de ribosomes et de protéines, pour permettre ainsi la fécondation et le début du développement embryonnaire. Cette phase est induite par le pic préovulatoire de LH.

I.2.3.1.La maturation nucléaire de l'ovocyte:

En premier lieu, la maturation nucléaire aboutit à la transformation de l'ovocyte primaire en ovocyte secondaire avec l'expulsion d'un premier globule polaire, les points les

plus importants de cette phase sont, la différenciation des crêtes mitochondriales, le dépôt de vitellus, la synthèse d'ARNm et la disparition des centrioles. Seul persiste le matériel péri centriolaire qui forme une masse filamenteuse appelé centre organisateur des microtubules (MTOC) qui contribue à la formation des fuseaux méiotiques.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'induction de la maturation nucléaire, parmi eux ont retrouvé le MPF (Maturation promoting factor ou meiosis promoting factor), qui a été d'abord découvert chez les batraciens. Ce facteur injecté à des ovocytes stimulés par la progestérone induit immédiatement la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire et la formation de deux fuseaux méiotiques. Ce facteur n'est pas spécifique aux batraciens mais existe chez tous les mammifères dont la vache. L'EGF (epidermal growth factor) et un autre facteur de la maturation ovocytaire, il intervient aussi dans les premières divisions du zygote. Une fois le premier globule polaire expulsé l'ovocyte et à nouveau bloqué mais en métaphase II sous l'influence de facteurs dont le MSF (meiosis stabilising factor) jusqu'à la fécondation.

I.2.3.2. Maturation cytoplasmique:

Elle est caractérisée par la migration des granules corticaux à partir de l'appareil de Golgi vers la membrane cytoplasmique, ils jouent un rôle très important lors de la fécondation en évitant la polyspermie, provoquant lors de leur libération un durcissement de la zone pellucide incompatible avec une autre fécondation. Cette phase de la maturation ovocytaire est caractérisée aussi par l'acquisition d'un facteur protéique appelé MPGF (male pronucleus growth factor) responsable de la décondensation de la chromatine et de la modification des protéines nucléaires.

I.2.3.3. Maturation membranaire:

Ce phénomène est nécessaire du fait qu'il permet à l'ovocyte par le biais de sa membrane pellucide de reconnaître le spermatozoïde de son espèce. Cela consiste principalement en l'acquisition des fractions glycosylées des protéines de la membrane pellucide (ZP3) qui serait responsable de la première reconnaissance du spermatozoïde.

I.3. L'atrésie folliculaire:

L'atrésie est un élément important de la régulation du nombre d'ovulations. Elle concerne la majorité des follicules présents dans l'ovaire (99.9%) (Hanzén et al., 2000). Cytologiquement sa détection n'est possible que chez les follicules primaires, secondaires ou tertiaires par la mise en évidence de pycnose (Hirshfield, 1989; Erickson, 1966) ou d'apoptose dans les cellules de la granulosa (Hughes et Gorospe, 1991) ou par détection de processus dégénératifs (opacification) au niveau de l'ovocyte (Kruip et Dieleman, 1982). Sur le plan fonctionnel, l'atrésie s'accompagne de changements se traduisant par la disparition des activités qui caractérisaient le follicule sain et la mise en place de mécanismes aboutissant à son involution. Ainsi la granulosa disparaît progressivement et le cumulus se dissocie, l'ovocyte (dégénéré) reste la cellule la plus identifiable. Dans les follicules primaires et préantraux, c'est l'ovocyte qui entre en premier en apoptose, alors que dans les follicules à antrum c'est les cellules de la granulosa qui débutent l'apoptose. L'atrésie se termine par l'écrasement du follicule et l'invasion de l'antrum par des fibres conjonctives (Thibault et Levasseur, 2001).

I.4.Régulation hormonale de la folliculogénèse:

Deux phases sont à distinguer à ce sujet ; la première est indépendante des gonadotropines, elle est sous la dépendance de facteurs intra ovariens dont l'activine (Drion et al. 1998), elle concerne chez la vache les follicules de taille inférieure à 5 mm. La deuxième phase dépend des gonadotropines (FSH et LH) ainsi que d'autres facteurs intra et extra ovariens.

I.4.1.Phase gonadotrope indépendante:

Dès la puberté, régulièrement et selon un rythme circadien un certain nombre de follicules quittent la réserve ovarienne pour ovuler ou, pour la plupart, évoluer vers l'atrésie. Le nombre de follicules qui débutent leur croissance atteint un maximum chez la vache entre l'âge de 3 mois et 2 ans et décroît régulièrement par la suite (Saumande, 1991). L'entrée en croissance est sous la dépendance de facteurs encore très mal connus, la mobilisation initiale a été imputée par Greenwald et téranova (1989) à plusieurs facteurs dont la proximité des vaisseaux, des terminaisons nerveuses, du corps jaune ou des gros follicules. Après la sortie du pool de réserve un certain nombre de facteurs permettent aux follicules d'arriver au stade primaire. Bendell et Dorrington (1990) évoquent une régulation paracrine assurée par des

facteurs de croissance produits localement. Certains interviendraient essentiellement dans la multiplication cellulaire comme la cybernine, l'EGF (Jones et al., 1982), le FGF (Gospodarowicz et Bridwell, 1977), le TGF β (Skinner, 1987). D'autres se comporteraient comme agonistes des gonadotropines dans la stéroïdogénèse (Davoren et al., 1985) tel que les somatomédines (IGF I et IGF II) (Davoren et al., 1986). A ce stade du développement on parle de phase gonadotrope indépendante car les hormones gonadotropes n'ont pas de rôle directe sur la croissance du follicule, L'administration d'agonistes de la GnRH, inhibant ainsi la libération de la FSH, n'empêche pas chez la vache certains follicules d'évoluer à un diamètre de 6 à 7 mm (Webb et al., 1994). La FSH agirait, à ce stade du développement, plus sur les capacités de synthèse et de maturation des cellules de la granulosa que sur la croissance proprement dite (Driancourt et al., 1991). Ce sont les facteurs de croissance produits localement qui jouent le plus grand rôle dans le développement folliculaire et dans la préparation à l'entrée dans la phase gonadotrope dépendante. Ainsi l'activine synthétisée par les cellules de la granulosa, serait responsable de l'acquisition par les cellules de la granuleuse de récepteurs à la FSH (Xiao et al., 1992) et ce, à la différence de l'IGF I, en absence même de FSH (Adashi et al., 1988). En présence de FSH l'activine est capable de promouvoir la synthèse de l'oestradiol, l'acquisition de récepteurs à la LH et la production d'inhibine et de follistatine (Hutchinson et al., 1987; Findlay, 1993). Cette étape du développement folliculaire est qualifiée de folliculogénèse basale (Driancourt et al., 1991).

1.4.2.Phase gonadotrope dépendante:

Chez la vache lorsque le follicule a atteint une taille limite de 4mm (Moser et al., 1989), commence la deuxième phase du développement folliculaire qui est gonadotrope dépendante ou encore appelée folliculogénèse tonique (Driancourt et al., 1991). Après l'acquisition d'une thèque vascularisée qui autorise plus d'échange, la capacité de synthèse des stéroïdes augmente, la multiplication s'accroît puis diminue lorsque le follicule atteint sa taille préovulatoire. Ces différents phénomènes résultent de l'interaction entre les hormones gonadotropes (FSH et LH) et les facteurs de croissance à action stimulatrice (IGFs, activine, TGF-beta) ou inhibitrice (IGFBPs, follistatine, inhibine, interleukine-6, TNF-alpha (Monniaux et al., 1997). Ces substances peuvent avoir une action indirecte, en agissant par rétroaction négative sur l'hypophyse, ou directe sur l'ovaire en agissant d'une manière paracrine.

I.5. Dynamique de la croissance folliculaire:

L'analyse des follicules "in vivo" par échographie chez la vache (Driancourt et al., 1991), (Hanzen et al., 2000), a fourni des éléments très importants sur la dynamique de la croissance folliculaire. C'est ainsi qu'on a pu mettre en évidence que des follicules croissent en permanence au cours du cycle sexuel sous forme de vagues (Savio et al., 1988 ; Ginther et al., 1996),

I.5.1. Notion de vagues folliculaires:

Les premières études faites sur la cinétique du développement folliculaire, étaient basées sur des observations histologiques ou macroscopiques de l'ovaire après abattage des animaux ou par laparotomie. Ces études ont révélé que la croissance folliculaire est un phénomène continu indépendant du stade du cycle (Spicer et Echterkamp, 1986). D'autres équipes ont démontré une corrélation avec la phase lutéale, ainsi, deux périodes de croissance folliculaire ont été identifiées, l'une apparaissant au début de la phase lutéale et évolue vers l'atrésie, la seconde en fin de phase lutéale et aboutie à l'ovulation (Rajakoski, 1960; Matton et al., 1981; Ireland et Roche, 1987).

C'est l'avènement de l'échographie (Pierson et Ginther, 1988) qui a permis de décrire d'une manière plus précise la cinétique de la croissance folliculaire, et de confirmer la théorie selon laquelle le développement folliculaire apparaît non pas d'une manière aléatoire, mais sous forme de croissance et de régression de plusieurs follicules synchrones, appelée vague folliculaire. Chaque 7 à 9 jours environ, émerge une vague de plusieurs follicules, de diamètre égal ou supérieur à 5 mm parmi lesquels apparaît le follicule dit dominant (Sirois et Fortune, 1988; Fortune et al., 1988). D'autres états physiologiques comportent aussi des vagues de croissance folliculaire, tel que la gestation (Ginther et al., 1989; Savio et al., 1990a), la période prépubertaire (Adams et al., 1993) et le post-partum (Savio et al., 1990a, Savio et al., 1990b).

Chez la vache les vagues folliculaires ne sont pas observées seulement pendant la période préovulatoire comme chez certaines espèces (femme, ratte, truie) mais aussi durant la phase dioestrale du cycle (Fortune, 1994). Une à quatre vagues sont observées durant le cycle (Lucy et al., 1992; Mariana et Millier, 1977), cependant, habituellement, il ne comporte que 2 à 3 vagues (Savio et al., 1988; Sirois et Fortune, 1988; Knopf et al., 1989; Driancourt et al., 1991a; Ko et al., 1991; Taylor et Rajamahendran, 1991; Lucy et al., 1992; Fortune 1993;

Adams, 1994). En cas d'émergence de trois vagues, elles débiteront aux jours 2, 9 et 16 du cycle; si celui-ci ne comporte que deux, elles apparaissent aux jours 2 et 11 (Sirois et Fortune, 1988; Savio et al., 1988; Taylor et Rajamahendran, 1991; Ginther et al., 1989a; Lucy et al., 1992). Ennuyer (2000) rapporte des chiffres similaires concernant les cycles à deux vagues, mais concernant les cycles à trois vagues. Ces dernières débiteraient aux jours 2, 8 et 14 du cycle, il ajoute que les cycles à trois vagues sont plus fréquents chez les génisses et que ceux à deux vagues sont plus retrouvés chez les vaches adultes.

I.5.2. Recrutement:

C'est le phénomène par lequel un certain nombre de follicules émerge à partir de la réserve ovarienne de follicules antraux de 2 à 4 mm et commence à se développer très tôt durant le cycle oestral. Cette entrée en croissance est principalement imputable à la FSH (Picton et al., 1990). Ce n'est pas le cas de toutes les espèces, Ravindra et al. (1994) n'ont observé aucune corrélation chez la brebis entre l'émergence de follicules en croissance et un pic de FSH, chez la vache par contre, plusieurs travaux ont démontré la relation entre la FSH et la phase de recrutement. Ainsi on a pu observer une augmentation de FSH dans les 2 à 4 jours qui précédaient chaque vague de croissance folliculaire (Adams et al. 1992), (Sunderland et al., 1994). Turzillo et Fortune (1990) ont pu, en inhibant le pic de FSH le jour de l'ovulation grâce à du liquide folliculaire renfermant de l'inhibine, retarder l'apparition de la première vague folliculaire, ce qui montre une fois encore l'importance de cette hormone à cette étape de la croissance folliculaire.

I.5.3. Sélection:

C'est durant cette phase qu'un seul follicule sélectionné acquiert la compétence pour aller vers l'ovulation évitant l'atrésie, en effet après 2 à 4 jours de recrutement, plusieurs follicules de taille moyenne (6 à 9 mm) peuvent être détectés par échographie (Lucy et al., 1992). Ce phénomène est étroitement lié au climat hormonal, les concentrations de gonadotropines doivent être parfaitement réglées, toute déficience conduit à l'atrésie. La LH induit la production d'androgènes (androsténédione et testostérone) par les cellules de la thèque interne (Driancourt et al., 1991a) à partir du cholestérol apporté par les lipoprotéines sanguines. La FSH induit l'aromatisation de ces androgènes en oestrogènes (principalement

du 17 β oestradiol) au niveau des cellules de la granulosa. L'oestradiol produit, en synergie avec la FSH, se fixe sur ses récepteurs assurant la multiplication des cellules de la granulosa et contribuant à la formation du liquide folliculaire et l'augmentation de la taille de la cavité antrale. La sélection du follicule dominant se fait 36 à 48 heures après le début du recrutement (Bao et al.1997 a) et est liée à l'expression des récepteurs à LH (Bao et al.1997 a et 1997b). C'est donc le follicule comportant des récepteurs à LH qui deviendra dominant, car il est capable de répondre aux gonadotropines (Bao et Garverik, 1998).

I.5.4.Dominance

La dominance est le moyen par lequel le follicule sélectionné empêche le recrutement d'une nouvelle cohorte de follicules. C'est en effet le follicule dominant qui est le seul capable de provoquer la régression des autres follicules en développement ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (Sirois et Fortune, 1990) et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (Gong et al.,1993). Lors d'examen échographique de l'ovaire durant la période de dominance aucun follicule supérieur à 5 mm de diamètre n'est détecté (Lucy et al.,1992), ce qui confirme l'inhibition du développement d'autres follicules par le follicule dominant.

Le follicule dominant de la première vague reste actif jusqu'au milieu du cycle oestral (j8 à j11) (Ginter et al., 1989b) ; une injection de prostaglandine à ce moment peut conduire ce lui-ci à l'ovulation, cependant dans la majorité des cycle ce follicule régresse (Savio et al., 1988; Sirois et fortune, 1988; Ginter et al., 1989). La maturation du follicule dominant coïncide avec la régression spontanée du corps jaune, ce follicule ovulera après la lutéolyse (Savio et al., 1988; Sirois et fortune, 1988: Taylor et Rajamahendran, 1991).

Sur le plan morphologique, le follicule dominant croît de manière linéaire pendant plusieurs jours jusqu'à atteindre la taille de 9 mm (Ginter et al., 1989; Guilbault et al., 1991). Son évolution dépend du climat hormonal et donc de la phase du cycle oestral où il se développe. Une fois que ce diamètre est atteint le follicule pourra exercer une dominance fonctionnelle, il sécrète une quantité élevée d'oestrogènes et d'inhibine qui vont, par feed-back négatif provoquer la diminution de la FSH (Ennuyer, 2000). Mis à part ce contrôle par voie générale, il existe une interaction entre les différents follicules par l'intermédiaire de substances peptidiques telles que les cybernines (EGF, FGF, TGF β) (Ireland, 1987) qui agissent par régulation intra et inter folliculaire.

C'est le follicule dominant de la dernière vague de croissance qui va ovuler (Lucy et al., 1992; Maariana et Millier, 1977), sauf en cas d'apport de prostaglandines exogènes , ainsi

Kastélic et al. 1990b) et Savio et al. (1990) ont noté que le follicule de la première vague peut ovuler si la régression du corps jaune est produite par des prostaglandines exogènes aux jours 5 à 8 du cycle.

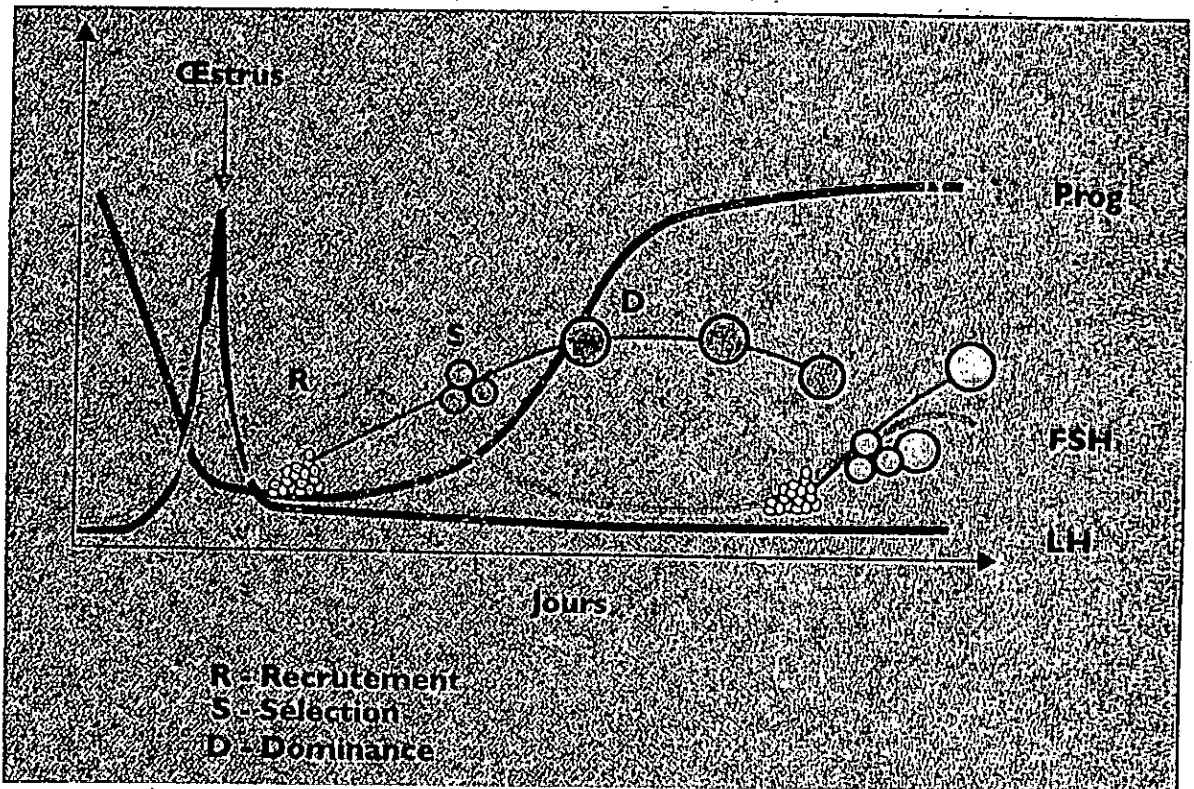


Figure 2 : Description d'une vague folliculaire (Ennuyer, 2000)

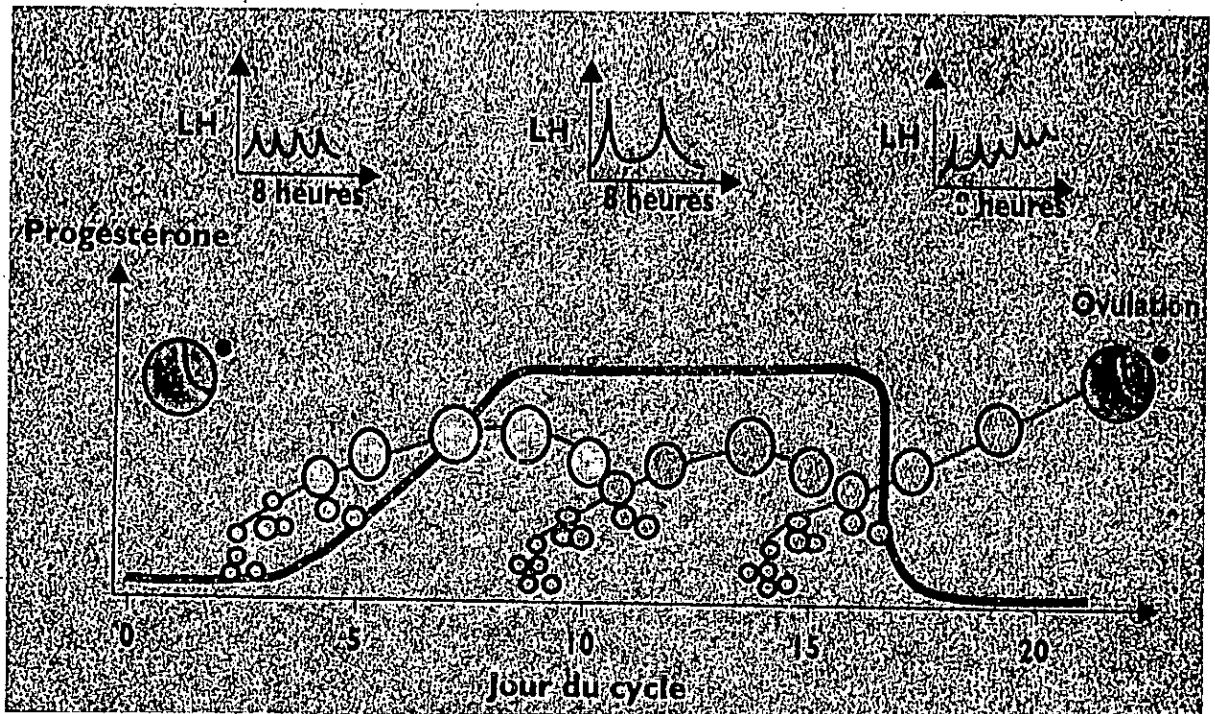


Figure 3 : Evolution des vagues folliculaires au cours d'un cycle chez la vache (Ennuyer, 2000)

II. CARACTERISTIQUES DU CYCLE OESTRAL CHEZ LA VACHE

II.1. Introduction

La vache est une espèce polyoestrienne à ovulation spontanée. Le cycle dure en moyenne 20 à 21 jours et l'oestrus est assez court: de 14 à 15 heures (24 heures au plus) et l'ovulation survient après la fin des chaleurs (10 à 15 heures). Le cycle oestral est divisé, sur le plan hormonal, en deux phases: la première oestrogénique et la deuxième progestéronique séparées par l'oestrus. La phase oestrogénique dure 3 jours et correspond à la croissance et à la maturation folliculaire, le taux d'oestrogène présente une augmentation progressive jusqu'au pic qui coïncide avec le début des chaleurs. Ce pic est nécessaire au développement terminal des follicules car il induit une sécrétion de gonadotropines responsables de la maturation finale. Après ovulation une structure très importante se développe sur l'ovaire, c'est le corps jaune qui sécrète de la progestérone, son taux augmente à partir du jour 3 pour atteindre un maximum au jour 7, il se maintiendra durant 11 jours. Les concentrations diminuent ensuite, suite à l'action lutéolytique de la $PGF2\alpha$ pour permettre l'établissement d'un nouveau cycle.

II.2. Hormones intervenants dans la régulation du cycle oestral

II.2.1. Hormones hypothalamiques (GnRH)

La GnRH est un décapeptide dont le poids moléculaire est de 1,18 KD, elle provient d'une préhormone (de 92 acides aminés) synthétisée par les neurones hypothalamiques et est scindée en plusieurs fragments, dont la GnRH proprement dite est un "GnRH- associated-peptide", le GAP, qui est aussi présente dans les neurones à GnRH, mais dont le rôle n'est pas connu (Caladani et al, 1991).

La GnRH représente un régulateur majeur de l'expression des gènes des sous unités des gonadotropines et de la libération de LH et FSH. Dans la majorité des situations physiologiques, le peptide est libéré dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire sous forme de pulses, émissions très brèves de sécrétion. Toute fois, il existe quelques situations où le peptide est libéré selon un mode continu par exemple pendant le pic préovulatoire (Caraty et al, 1995).

De plus, la sécrétion de FSH pourrait ne pas dépendre exclusivement du GnRH. Par exemple, l'immunoneutralisation du GnRH endogène entraîne une diminution des taux de FSH mais ne supprime pas la pulsativité de cette hormone alors que celle de LH est abolie. L'existence d'un FSH-RH spécifique est évoquée depuis longtemps, mais n'a jamais été démontré clairement (Caraty et al, 1997).

Le caractère pulsatile de la sécrétion du GnRH semble jouer un rôle important dans la libération des gonadotropines. En effet, l'administration exogène continue de peptide à une dose relativement élevée, soit *in vivo*, soit *in vitro*, provoque dans tous les cas une perte progressive de la réponse LH et FSH de l'hypophyse. La nature de la liaison entre le système nerveux central et l'hypophysaire via le système porte hypothalamo-hypophysaire, permet une stimulation très fine des cellules gonadotropes. C'est à ce niveau que le message hormonal, plus lent, sert à coder l'état physiologique. Ainsi chaque pulse de GnRH est suivi d'un pulse de LH, lui-même suivi d'un pulse d'oestradiol ou de progestérone. Enfin, à côté de son action sur la sécrétion des gonadotropines, le GnRH stimule la biosynthèse de LH et de FSH (Caraty et al, 1997).

Le mode d'action de la GnRH est double. D'une part, elle entraîne une libération rapide et transitoire des gonadotropines et d'autre part, elle exerce une stimulation à long terme sur la synthèse de ces hormones. Cette action est consécutive à la fixation de la GnRH avec une affinité sur des récepteurs membranaires de nature glycoprotéique. La GnRH est une des rares hormones à induire la synthèse de ses propres récepteurs (Katt et al., 1985). Ceci se produit lorsque les cellules gonadotropes sont exposées à de faibles concentrations en GnRH. Inversement, l'exposition prolongée de cellules gonadotropes à la GnRH ou à une analogues agoniste (molécule de synthèse présentant une activité hormonale similaire) se traduit par une diminution du nombre de récepteurs et entraîne une chute de sécrétion de LH (Charbonnel et Dubourdiou, 1993). Ce phénomène appelé désensibilisation est à prendre en compte dans le cadre des applications médicales du GnRH (Fieni et al, 1995).

La synthèse pulsatile de la GnRH est responsable d'une sécrétion hypophysaire pulsatile de LH et de FSH. Chez la brebis, en phase folliculaire, la pulsativité de la FSH-LH est de 1/h contre 1/3h30 en phase lutéale. Chez la vache le pic préovulatoire de LH (50 fois le niveau de base) dure 6 heures et précède de 24h l'ovulation (Fieni et al, 1995).

De même, le blocage de l'action de la GnRH par immunisation ou par déconnexion hypothalamo-hypophysaire provoque une diminution plus lente des concentrations plasmatiques de FSH alors que la libération de LH est sévèrement réduite. Les stéroïdes sexuels, les opioïdes, le neuropeptide Y et la leptine sont capables d'affecter la sécrétion de la GnRH et donc indirectement une incidence sur les niveaux de synthèse et de libération des gonadotropines.

II.2.2.Hormones Hypophysaires (FSH, LH)

Appelées encore gonadotropines, ceux sont des glycoprotéines formées de deux sous-unités α et β , ces sous-unités sont dissociées à pH acide ou basique, par élévation de température ou en présence de guanidine ou d'urée. La sous-unité α est commune à toutes les hormones hypophysaires dans une même espèce, la sous-unité β est spécifique à chaque hormone (Combarrous et Volland-Nail, 1997). Les gonadotropines sont au nombre de deux: la première est la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone), leur sécrétion est sous la dépendance de la GnRH, qui pourrait avoir un rôle dans la condensation des granules de sécrétion (Sion et al., 1989), mais il a aussi un rôle dans la stimulation de la biosynthèse de LH et de FSH (Caraty et al, 1997).

Les deux hormones agissent en synergie, la FSH induit le recrutement des follicule, assure leur croissance et intervient dans la conversion des androgènes en oestrogènes et stimule l'activité aromatasé des cellules de la granulosa responsable de la conversion des androgènes en oestrogènes (Erickson et al., 1978). Ces actions ne sont possibles qu'en présence d'une sécrétion basale de LH (Picton et al., 1990). La FSH agit plus sur les follicule ayant un diamètre de 2 ou 4 mm que sur les follicules plus petit au sein des follicules recrutés (Lussier et al., 1994)

La LH assure la maturation folliculaire, puis provoque l'ovulation, la formation du corps jaune et la production de progestérone par les cellules lutéales (Fieni et al., 1995). La synthèse pulsatile de la GnRH est responsable d'une sécrétion hypophysaire pulsatile de LH et de FSH. Chez la brebis, en phase folliculaire, la pulsativité de la FSH-LH est de 1/h contre 1/3h30 en phase lutéale. Chez la vache le pic préovulatoire de LH (50 fois le niveau de base) dure 6 heures et précède de 24h l'ovulation (Fieni et al, 1995).

II.2.3.Les stéroïdes ovariens

Les stéroïdes impliqués directement dans le contrôle de la reproduction chez la femelle sont l'oestradiol et la progestérone, elles sont chimiquement apparentées au cholestérol à partir duquel elles sont produites. Les besoins des cellules en cholestérol stéroïdogène sont assurés par les lipoprotéines de basse densité (LDL).

C'est au niveau des cellules de la thèque qu'est produite la progestérone à partir du cholestérol. Ce sont Les seules cellules qui sont capables de métaboliser la progestérone en androgène, mais elles sont par contre pauvres en aromatasé qui permet la conversion des

androgènes en oestrogènes, c'est au niveau des cellules de la granulosa que se fait cette réaction suite à la stimulation de la FSH (Driancourt et al., 1991).

Les stéroïdes gonadiques ont une double action sur l'hypophyse : directe et indirecte.

- Action directe sur l'hypophyse : l'oestradiol et la progestérone répriment la transcription des gènes α et FSH β dans des cellules hypophysaires ovines en culture primaire et inhibent à des degrés divers l'expression des gènes α , LH β et FSH β chez le rat. Après castration, il a été observé une augmentation de 5 à 15 fois des ARNm des 3 sous unités α , LH β , FSH β . L'injection d'un antagoniste supprime les effets de la castration.

- Action indirecte sur l'hypophyse : Les stéroïdes inhibent l'activité des gènes des gonadotrophines, en réduisant la sécrétion de la GnRH. Chez le rat, les androgènes inhibent *in vitro* l'expression des gènes des trois sous unités chez la femelle, et seulement l'expression de α et LH β chez le mâle.

Ils stimulent par contre chez ce dernier l'expression du gène FSH β . Il est intéressant de noter que cet effet stimulant de la testostérone est masqué *in vivo* par l'action du GnRH et ne s'observe qu'après administration d'un antagoniste du GnRH.

II.2.4. Les peptides ovariens

L'inhibine, l'activine et la follistatine, des peptides produits en fin de diœstrus et durant la période préovulatoire par les follicules ovariens, sont connus pour jouer sur la sécrétion de FSH. L'activine stimule, et l'inhibine déprime, l'expression du gène FSH β , principalement. Ces effets sont observés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, chez les rats, ovins ou bovins. La follistatine complexe l'activine et peut donc agir, de cette manière, indirectement sur le gène FSH β .

On sait à présent que ces peptides sont exprimés dans une grande variété de tissus non gonadiques, y compris dans les cellules gonadotropes et le placenta suggérant l'implication d'interactions autocrines et paracrines.

II.3. Rétrocontrôle stéroïdien sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

II.3.1. Le feedback négatif

Il peut s'exercer à la fois sur l'hypophyse et l'hypothalamus qui possèdent, tous les deux, des récepteurs aux stéroïdes. L'effet modulateur des stéroïdes sur la production de GnRH s'exerce par des interneurons établissant des contacts synaptiques, directement avec les neurones à GnRH indirectement par d'autres neurones peptidergiques ou à neuromédiateurs classiques.

Parmi eux, les neurones GABAergiques de l'aire préoptique/hypothalamus antérieur pourraient jouer un rôle de premier plan : Ainsi la plupart des neurones GABAergiques (70-80%) contiennent des récepteurs à E2 et libèrent du GABA sous influence de E2.

Le GABA exercerait une inhibition présynaptique sur la libération de noradrénaline. le GABA pourrait réduire la libération de GnRH : par blocage de la voie catécholaminergique excitatrice; Une alternative peut aussi être proposée :

a/ Le GABA pourrait exercer un effet inhibiteur direct sur les neurones à GnRH

b/ La noradrénaline pourrait stimuler la libération de LH en réduisant l'inhibition GABAergique sur ces neurones hypothalamiques.

L'effet feedback négatif de E2 sur la libération de LH pourrait donc mettre en jeu des neurones à GABA de l'aire préoptique et de l'hypothalamus antérieur (Combarnous et Volland-Nail, 1997). Chez la ratte ovariectomisée, la région aire préoptique est le siège d'une libération pulsatile de noradrénaline avec une fréquence supérieure à celle des "pulses" de LH. D'autres études suggèrent au contraire un rôle inhibiteur de la noradrénaline sur la pulsativité de la sécrétion de LH. Il est donc possible d'envisager un effet (stimulant ou inhibiteur) tributaire des modalités de délivrance de la NOR et/ou de la présence des hormones ovariennes.

L'oestradiol active les systèmes cathécholaminergiques, notamment ceux utilisant la dopamine qui inhibe la fréquence des pulses de GnRH. Son action s'exerce au niveau de l'aire préoptique et de l'hypothalamus antérieur, mettant en jeu les noyaux dopaminergiques intrinsèques à l'hypothalamus (Barraclough et Wise, 1982)

La P4 réduit la fréquence des décharges de LH durant la phase lutéale, en activant des neurones à certains opioïdes endogènes du noyau arqué. Son action s'exerce à travers une interaction avec un système à B-endorphine qui est impliqué dans l'inhibition des pulses de GnRH chez les mammifères (Combarnous et Volland-Nail., 1997)

L'intervention des neurones à endorphine pourrait être impliquée également dans l'inhibition gonadotrope observée : durant un stress chronique (libération d'opioïdes accrue). Il est donc tentant d'attribuer aux opioïdes endogènes du cerveau un rôle important dans le feedback négatif des stéroïdes ovariens. Parmi les neurones du noyau arqué présentant une activité tyrosine hydroxylase, révélée par immunocytochimie (neurones à dopamine), 30 % environ concentrent l'œstradiol H3 et 90 % possèdent des récepteurs à la progestérone.

Ces neurones dopaminergiques qui émettent des prolongements voisinant dans l'E.M. avec les terminaisons à GnRH, sont aussi des candidats pour le contrôle de la libération de GnRH par la P4, La P4 stimule la sécrétion de DA dans le sang porte et que cette catécholamine peut inhiber celle de GnRH.

III.3.2. Le feedback positif

La sécrétion pulsatile de GnRH augmente chez plusieurs espèces (rate, lapine, brebis, guenon et femme) au moment où va se produire le « pic ovulatoire » de LH, en proestrus du cycle oestrien ou au milieu du cycle menstruel, c'est-à-dire en fin de phase folliculaire. L'augmentation de la sécrétion pulsatile de GnRH à cette phase du cycle, va de pair avec un accroissement vraisemblable de la synthèse de ce neuropeptide.

La sécrétion de LH commence par baisser (phase de feedback négatif) qui dure quelques heures puis s'élève plusieurs heures après injection de l'œstradiol (phase de feedback positif) au cours de laquelle la fréquence de pulsation de la GnRH est augmentée. Chez des brebis ovariectomisées, dont la sécrétion de GnRH endogène est supprimée par rupture chirurgicale des relations anatomiques entre l'hypothalamus et l'hypophyse, l'injection de E2 provoque une réponse biphasique à l'administration pulsatile de GnRH.

Des études *in vitro*, conduites sur des cellules hypophysaires en culture primaire, montrent que l'œstradiol exerce un feedback positif direct sur la sécrétion de LH en augmentant la sensibilité à la GnRH par induction de la synthèse de ses récepteurs après quelques heures d'exposition aux stéroïdes.

La P4 augmente la réponse à la GnRH, seulement sur une hypophyse préalablement exposée à E2. La présence de P4 amplifie et prolonge l'effet feedback positif de E2. Ces

quelques faits expérimentaux soulignent l'existence d'un feedback positif de E2 et P4 dont un des sièges est l'hypophyse elle-même.

Plusieurs ensembles neuroniques sont impliqués dans ce type feedback positif :

- Des neurones catécholaminergiques du locus coeruleus sont capables de concentrer l'oestradiol. Une éventuelle excitation de ces neurones à noradrénaline/adrénaline pourrait entraîner celle des neurones à GnRH.

- Des neurones NPYergiques interviennent dans un feedback positif de E2.

L'hypothalamus contient beaucoup de NPY et de nombreuses fibres NPYergiques sont présentes dans l'aire préoptique, le noyau arqué et l'E.M. du rat.

De surcroît, la majorité des corps cellulaires NPY (+) du tronc cérébral contiennent aussi de la Noradrénaline (locus coeruleus) ou de l'Adrénaline (noyau du tractus solitaire) or, certains neurones catécholaminergiques, susceptibles d'être aussi NPYergiques, innervent l'hypothalamus et peuvent stimuler, directement ou indirectement, la sécrétion de GnRH. Le NPY stimule in vitro la sécrétion basale de GnRH par des fragments d'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane de rates ovariectomisées, injectées de E2 et de P4.

Chez la rate, au cours du cycle oestrien, les concentrations de NPY et de GnRH dans le sang porte-hypophysaire évoluent parallèlement ; ainsi, une sécrétion brutale de NPY précède-t-elle celle de LH dans la période du proestrus. Le NPY qui n'a guère d'effet propre sur la sécrétion basale de LH par des fragments d'hypophyses ou des cellules adénohypophysaires de rates en culture, amplifie la réponse à la GnRH. L'administration de NPY dans l'hypothalamus de rates ovariectomisées, prétraitées par des E2 et de la P4, accroît la sécrétion pulsatile de GnRH.

Suite à toutes ces données expérimentales, on peut émettre l'hypothèse que l'effet stimulant du NPY sur la fonction gonadotrope prédomine chez les animaux dont le SNC est sous imprégnation oestro-progestéronique. En tout état de cause, la décharge de LH induite par les oestrogènes ne peut se produire que si le blocage de la fonction gonadotrope par un feedback négatif est levé. Les neurones à opioïdes endogènes exerceraient une influence inhibitrice tonique sur les systèmes neuroniques NPYergiques et adrénérique;

la levée de cette inhibition aboutirait ainsi à l'activation des neurone à GnRH et à la décharge de LH en phase préovulatoire ou à la suite d'un traitement approprié aux stéroïdes sexuels. Cette hypothèse est compatible avec le fait que les E2, seuls ou associés à la P4, réduisent, la densité des récepteurs aux opioïdes dans de nombreuses régions du cerveau et que E2 diminue, la quantité d'ARNm de la POMC dans l'hypothalamus de rat.

L'accroissement des taux de E2 pourrait ainsi lever l'inhibition exercée par la β -Endorphine sur la libération de GnRH. Ces actions des stéroïdes sexuels peuvent aussi rendre compte du fait que, chez la rate à cycle oestrien normal, la sensibilité à la morphine est plus grande en œstrus que l'après-midi du œstrus, quand va survenir la décharge de LH qui précède l'ovulation de quelques heures.

La prédominance d'un type de feedback sur l'autre est fonction de l'état endocrinien des animaux et plus particulièrement des concentrations relatives des stéroïdes sexuels gonadiques à un moment donné du cycle oestrien ou menstruel ainsi que de la sensibilité des structures hypothalamo-hypophysaires aux stéroïdes, neurohormones ou neuromédiateurs