

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER

المدرسة الوطنية للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

Contribution à l'étude du transfert
embryonnaire chez la vache laitière en
Algérie

Présenté par : BARKA Imane

TCHEANDJIEU Catherine

Soutenu le : 15/07/2010

Le jury :

- **Président :** Mme TEMIM. S, professeur à l'ENSV
- **Promoteur :** Mr KHELEF.D, maitre de conférence classe A à l'ENSV
- **Examineur :** Mr LAMARA.O, maitre de conférence classe B à l'ENSV
- **Examineur :** Mr ADJERAD.A, maitre assistant classe A à l'ENSV

Année universitaire : 2009/2010

REMERCIEMENTS

★ **Au nom de Dieu,**

Le clément et miséricordieux, qui par sa seule grâce nous avons pu réaliser ce travail.

★ **Au professeur TEMIM. S**

De l'école nationale supérieure vétérinaire

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire,

Hommage respectueux

★ **Au docteur ADJREAD. O**

De l'école nationale supérieure vétérinaire

Qui nous a fait l'honneur de juger ce travail,

Tous nos remerciements

★ **Au docteur LAMARA. A**

De l'école nationale supérieure vétérinaire

Qui nous ont fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire,

Sincères remerciements

★ **Au docteur KHELLAF. D**

De l'école nationale supérieure vétérinaire

Qui a encadré notre travail,

Pour la grande patience et la confiance dont il a fait preuve,

Qu'il soit assuré par notre gratitude

★ **Au docteur ADEL. D**

De la faculté des sciences agro-vétérinaires de Blida

Pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide et ses conseils si généreusement accordés,

Qu'il soit assuré de notre plus profonde reconnaissance

★ **Nos remerciements les plus attentionnés s'adressent à :**

▪ **Pr CH. HANZEN, Pr J.F. BECHERS**

De la faculté de médecine vétérinaire de Liège (Belgique)

DEDICACE

Que ce soit au cours de mes études vétérinaires ou pour ce mémoire, je dédie cette première réussite :

A mes chers parents,

*Pour m'avoir permis d'arriver là sans trop d'encombres,
Pour tout ce qu'ils m'ont offert,
Pour leur confiance, leur soutien sans faille, financier et moral, et leur amour.
Aucune phrase ne sera le juste reflet de mes sentiments.
Pour leurs encouragements ininterrompus durant toutes ces années,
Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.*

A mes sœurs, Sarra et Hadjer,

Pour tout le bonheur qu'elles mettent dans ma vie

A mon petit frère Abdou,

*Pour toutes les disputes, les concurrences et surtout pour l'amour non dit,
mais bien présent.*

A Samir, comment m'exprimer en quelques lignes,... même si les kilomètres sont plus forts, il a toujours su être avec moi, m'encourager et m'aider à supporter des moments très difficiles pendant mes études.

A Mes grands parents, yema et baba, qu'ils trouvent ici le témoignage de mon estime.

A mes tantes, lamria et yamina, qui ont toujours su me soutenir.

A Souad, ma copine de chambre durant tout mon cursus, pour le pire et surtout pour le meilleur.

A mes amies Hadjer et Imene,

Pour leur compagnie toujours agréable et instructive,..... Les bons moments passés à l'école et les déjeuners partagés ensemble ... , inoubliables souvenirs.

A mes camarades « groupe 01 », pour la bonne humeur, les moments de rigolade, et les discussions durant les séances de clinique..... , tout en faisant du bon travail.

Enfin, à tous ceux qui m'ont demandé souvent : **« Et ton PFE ? »**

« Imane »

Dédicace

Je dédis ce travail à :

A mes parents

Qui m'ont toujours aimé et soutenu toute ma vie et grâce à qui j'ai pu réaliser ce travail.

Je vous aime de tout mon cœur.

A mes frères et sœurs

*Pour tout l'amour et toute l'attention que vous me portez ; spécialement à mon frère **Christian** qui m'a épaulé, chéri, écouté pendant mes moments difficiles en Algérie et aidé à réaliser ce travail.*

A mon oncle François Xavier

Qui m'a également beaucoup soutenu durant mes études en Algérie

A son excellence Monsieur l'ambassadeur et tous le personnel diplomatique de l'ambassade du Cameroun en Algérie

Grâce à qui j'ai passé mes cinq années d'études dans la paix.

Merci pour votre soutien et votre gratitude

A mes ami(e)s et compatriotes Camerounais (se)

Qui ont su rester à mes côtés et avec qui j'ai partagé des moments de joie et de peine tout au long de ces années d'études passées en Algérie.

A tous mes ami(e)s Algérien(ne)s et de L'ENSV

Qui m'ont ouvert leurs bras et m'ont accueilli à plein cœur dans leurs pays

Catherine Inès

Abréviations

Cj: corps jaune

GnRH: gonadotrophin reasing hormone

FSH: follicule stimuling hormone

LH: luteotrophin hormone

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotrope

OPU: ovum pick up

TE : transfert embryonnaire

FIV : Fécondation in vitro

COC : cumulus oophurus compact

IA : Insémination artificiel

OPS: open pulled straw

FAO: Food And Agriculture Organization

IETS : international embryos transfert society

CNIAAG: Centre National d'insémination artificielle et d'amélioration génétique.

hCG: Human Chorionic Gonadotrope

IM: intra musculaire

hMG: Human Ménopausal Gonadotrope

OMI: Ovocyte Méiotique Inhibitor

MPF: Meiotic Promoting factor

TALP: Thyrode Albumine Lactate Pyruvate

SOF: Synthétique oviductal fluid

ESB: Encephalite spongiforme Bovine

Sommaire

Partie bibliographique

Introduction

générale.....1

Chapitre I : Production d'embryons invivo.....3

I) La superovulation.....3

I-1) Critères de choix de ladonneuse..... 3

I-2) Les traitements desuperovulation.....3

I-3) Les facteurs influençant les réponses des traitements de superovulation5

I-4) Insémination artificielle de la donneuse superovulée.....7

II) La récolte des embryons.....7

II-1) Méthodologie.....7

II.1.1) Méthode chirurgicale.....7

II.1.2) Méthode non chirurgicale.....7

II-2) Détermination de la qualité des embryons.....8

II.2.1) Rappel du développement embryonnaire durant le stade libre.....8

II.2.2) Première différenciation.....9

II.2.3) Chronologie du développement embryonnaire.....9

II.2.4) Appréciation de la qualité des embryons.....10

II.2.5) Classification des embryons.....10

Chapitre II : Production d'embryons in vitro.....11

I. Prélèvement des ovocytes.....11

I-1) Récolte d'ovocyte à partir d'ovaires d'abattoir.....11

I-2) Prélèvement in vivo.....11

II.	Classification des ovocytes.....	13
III.	Maturation ovocytaire.....	13
	III-1) Maturation in vivo des ovocytes.....	13
	III-2) Maturation in vitro des ovocytes.....	14
IV.	Capacitation des spermatozoïdes.....	14
V.	Fécondation in vitro.....	14
VI.	Culture des embryons.....	15

Chapitre III : Conservation des embryons.....16

I)	Nature des agents cryoprotecteurs.....	16
	I.1) les cryoprotecteurs pénétrant.....	16
	I.2) les cryoprotecteurs non pénétrants.....	16
II)	Les différentes techniques de cryoconservation.....	17
	II.1) Congélation lente.....	17
	II.2) Vitrification.....	18
	III.3) Vitrification rapide (OPS) et ultra rapide.....	18
III)	Facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation.....	18

Chapitre IV : Transfert embryonnaire.....19

I)	préparation des receveuses.....	19
	I.1) choix des receveuses.....	19
	I.2) synchronisation des receveuses.....	19
II)	protocole de transfert proprement dit.....	20
III)	Facteur influençant les résultats.....	21
III)	Intérêts et limites du transfert embryonnaire.....	21

Chapitre V : Le transfert embryonnaire dans le monde et en Algérie...23

Introduction.....	23	
I) Historique.....	23	
II) Actualité de transfert embryonnaire dans le monde entre 2000 et 2005.....	25	
	III-1) Résultat de transfert après superovulation.....	25
	III-2) Résultat de transfert après fécondation in vitro.....	27
III) Activité de transfert embryonnaire en Algérie.....	29	
	IV-1) La superovulation et transfert.....	29
	IV-2) Activité de fécondation in vitro en Algérie.....	31

Partie pratique

Introduction.....	35
-------------------	----

I) Protocole de récolte.....	35
I.1) matériel.....	35
I.2) Technique.....	36
II) Mise en place de l'embryon.....	39
Conclusion	40
Perspectives	40

Introduction générale

La reproduction est la fonction capitale assurant l'apport des denrées alimentaires d'origine animale et ses dérivés nécessaires à la consommation humaine. Cependant la reproduction de façon naturelle ne permet pas l'expression de la performance du troupeau ce qui entraîne une insuffisance des produits sur le marché. Pour une production optimale, il est impératif de maîtriser les paramètres de production c'est-à-dire :

- la bonne gestion de l'élevage par :
 - une organisation des troupeaux en fonction de leurs caractères phénotypiques
 - une alimentation correcte et appropriée
 - une bonne conception des bâtiments associée à une bonne hygiène
- la maîtrise de la fonction de reproduction.

Les biotechnologies appliquées à la reproduction telles la synchronisation des chaleurs, l'insémination artificielle (IA), le transfert embryonnaire (TE), la fécondation in vitro (FIV) sont parmi les facteurs mis en place pour l'amélioration de la production. C'est d'une part grâce à ces biotechnologies que la Nouvelle Zélande produit plus de 245 millions de tonnes de lait et de produits laitiers par an et est classée 1er exportateur de lait en poudre dans le monde avec 35% de la production mondiale (FAO 2009).

L'Algérie étant un pays à forte croissance démographique, les besoins en viande et en lait augmentent chaque année. Malgré les améliorations obtenues grâce à l'IA, les produits

locaux plus particulièrement laitiers dont le pays est un grand consommateur restent toujours insuffisants ceci à cause de :

- Un faible taux d'intégration de la production nationale dans le processus de transformation.
- Une faible productivité des élevages due à une topologie des élevages ne permettant pas la modernisation, une prédominance de race locale faiblement productrice, une alimentation inadéquate...etc. (M.C Ould holcine ; conférence 8^{ème} journée sciences vétérinaire ; 2010).

Cette situation a incité les pouvoirs publics à recourir à l'importation de viandes dites congelées et de lait en poudre (1,3 milliards L de lait/an, avec un budget évalué à 1.06 milliards de dollars en 2007 qui s'élève à 1.29 milliards de dollars en 2008 (El Watan 2009). Ce qui entraîne une perte économique très importante pour le pays. Afin de réduire la facture des importations, l'une des voies permettant l'amélioration des productions pourrait être le recours aux biotechnologies appliquées à la reproduction tel l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire ; ce dernier encore à l'état expérimental en Algérie.

L'objectif de notre travail est de :

- Faire un état des lieux du transfert embryonnaire dans l'espèce bovine en Algérie.
- Nous initier à la technique de transplantation embryonnaire chez la vache laitière.

Chapitre I : PRODUCTION IN VIVO D'EMBRYON

I) LA SUPEROVULATION

Au cours de la phase folliculaire du cycle œstral et suivant les espèces, un ou plusieurs follicules arriveront à maturité. Ce sont les follicules « dominants », les autres subiront l'atréisie. Devant ce gaspillage considérable entre la réserve de départ et le nombre d'œufs émis au cours de la vie génitale de la femelle, la superovulation a permis de réduire fortement cet écart et d'augmenter la production d'embryons lors de chaque cycle.

Le principe de la superovulation chez les bovins repose sur la stimulation ovarienne à l'aide d'hormones gonadotropes administrées en période pré-ovulatoire. Les substances généralement employées doivent avoir un "effet FSH" qui est l'hormone responsable de la sélection et de la maturation des follicules ovariens.

I.1) Critères de choix de la donneuse :

Habituellement, l'éleveur choisit une génisse ou une vache à haut potentiel laitier ou viandeux. Il convient alors d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité. De même, il s'avère indispensable d'identifier la présence éventuelle de lésions du tractus génital (L'animal ne devrait pas présenter de complications puerpérales ou du post-partum telles qu'une rétention placentaire, une infection utérine, une fièvre vitulaire ou de l'acétonémie). Elle aura mis bas depuis 60 voire 90 jours au moins et sera en phase de bilan énergétique positif. Elle aura manifestée deux ou trois chaleurs à intervalles réguliers. A l'exploration manuelle, le col et les cornes utérines seront de diamètre normal (< 5 cm). Un corps jaune sera présent sur l'ovaire. L'examen vaginal au moyen d'un spéculum éliminera la possibilité d'une

infection utérine. Les traitements antiparasitaires et vaccinations auront été effectués avant le traitement de superovulation.

I.2) Les traitements de superovulation :

a. La Pregnant Mare Serum Gonadotrophin

La PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) extraite du sérum de jument gravide entre le 42^{ème} et le 100^{ème} jour de gestation possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange de FSH et de LH. Ce rapport dépend du stade de gestation de la jument. La concentration de la PMSG est maximale dans l'organisme 15 à 32 heures après son injection. La PMSG est douée d'une double activité à la fois de type FSH et LH avec un rapport constant FSH/LH égal à 0.2. Elle est injectée par voie IM à une dose comprise entre 2.000 et 3.000 UI, elle a une demi-vie particulièrement longue (120 heures) imputable à sa richesse en acide sialique (13 %) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale. Aussi est-il indispensable de lui adjoindre l'injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG (obtenus sur moutons) au moment des chaleurs. Ces anticorps ont pour objet d'inhiber l'action de la PMSG et ce faisant le développement d'une seconde vague de croissance folliculaire et d'éviter la formation de follicules kystiques. La répétition des injections de PMSG à 1 voire deux mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné la réaction antigénique possible (annexe 1).

b. La Human Menopausal Gonadotrophin

L'hMG (Human Menopausal Gonadotrophin) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé.

c. Les extraits hypophysaires

Les extraits hypophysaires (d'origine porcine le plus souvent, pFSH, mais aussi bovine, bFSH, ou ovine) sont de plus en plus largement utilisés. Possédant une demi-vie plus courte (5 à 6 heures) que la PMSG, étant donné leur moindre richesse en acide sialique (5 %) ils doivent faire l'objet d'injections répétées. Leur concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et ne sont plus décelables 12 heures après l'injection. Leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la PMSG. Les doses sont comprises entre 32 et 50 UA (Unité Armour) administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bijournalières (matin et soir) pendant 4 jours, la dose de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA chez la vache viandeuse. Les doses de FSH sont exprimées en mcg Armour : une unité

Armour est équivalente à 10 mcg de FSH pure. Les FSH sont présentées sous forme lyophilisées et reconditionnées avant l'emploi au moyen de sérum physiologique (annexe1).

I.3) Les facteurs influençant les réponses des traitements de superovulation :

La variabilité de la réponse au traitement de superovulation chez la vache, d'origine plurifactorielle, est un facteur limitant dans l'usage de la technique de transfert embryonnaire (Hahn, 1992) :

Sélection de donneuses potentielles :

De nombreux travaux ont rapporté des méthodes qui sont employées pour choisir des vaches potentiellement donneuses d'embryons, avant même qu'elles soient acceptées pour le traitement de superovulation. Au Canada Desaulniers et al. (1995) trouvent que suivre le développement folliculaire et le profil endocrinien sur des vaches matures (non utilisée pour la production laitière) , était un moyen très limité pour prévoir la réponse de superovulation, ils ont aussi trouvé que la superovulation a révélé des désordres endocriniens et folliculaires chez les vaches matures superovulées (Gordon,1996).

Intervalle post-partum :

Il semble qu'un intervalle de 60 jours entre le vêlage et la collecte soit le minimum à respecter pour que l'utérus ait subi son involution et pour que les ovaires répondent au traitement de FSH de superovulation (Nibart, 1991).

L'âge :

Il est admis que l'âge des donneuses influence la production d'embryons et d'embryons viables. Des chercheurs tel Lerner (Gordon, 1991), ont affirmé que la réponse maximale de superovulation chez les vaches Holstein se situe vers 5 à 6 ans d'âge, les même auteurs notent qu'une augmentation de la dose de FSH parmi les vieilles donneuses Holstein, les aident à augmenter leurs rendements d'embryons, mais sans corriger complètement les effets négatifs de l'âge.

Pathologie :

L'apparition d'état pathologique (état infectieux, structures ovariennes kystiques, maladies métaboliques) peuvent également interférer avec la réponse à la superovulation.

Race :

Aux USA, Breuel et al.(1991) ont enregistré un rendement important d'embryons transférables chez des donneuses de race Simmental comparativement à ceux de races Angus, Charolaise et Polled Hereford. De ce fait, ils ont spéculé que la Simmental était plus sensible aux gonadotrophines que les autres races.

Nutrition et effets des saisons :

Des études ont permis de conclure que la population ovarienne de follicules antraux chez les bovins, pouvait être influencée par le niveau énergétique, imposé pendant le cycle œstral. Peu d'études ont été conduites pour évaluer l'incidence exacte de l'alimentation sur la réponse au traitement de superovulation. Delacharlerie et al.(1995) ont obtenu moins d'embryons de bonne qualité chez des vaches de race Montbéliarde après une alimentation de type extensif, à base d'herbe, que chez des femelles de même race alimentées de façon intensive (à base d'ensilage d'herbe ou de maïs).

L'effet du follicule dominant :

Des études portant sur les relations entre fonction ovarienne et réponse au traitement de superovulation ont montré que le nombre d'ovulations dépendait de l'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation gonadotrope (présence d'un follicule dominant, nombre de follicule de plus de deux millimètres de diamètres).

La variabilité individuelle :

Selon chupin (1985), la femelle elle-même est responsable de plus de 50% de la variabilité de la réponse ovarienne et de la production d'embryons. Cette variabilité peut avoir une origine physiologique ou génétique. Généralement, le taux d'ovulation et la production d'embryons sont relativement constants chez le même individu (Mapletoft, 1993).

Repeat breeders et les problèmes chez la vache :

En Irlande, la superovulation et la récolte embryonnaire non chirurgicale sur des vaches laitières normales ou repeat breeders ont montré une diminution significative du rendement embryonnaire chez les repeat breeders, suggère qu'une telle diminution de fertilité était due à l'environnement utérin hostile.

I.4) Insémination artificielle de la donneuse superovulée :

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

L'usage de la prostaglandine pour le TE en clinique, pour contrôler le moment de chaleurs permet justement avec une précision de donner des recommandations sur la façon dont l'IA doit être faite. Les donneuses sont attendues pour rentrer en œstrus à environ 2 jours après l'administration de la prostaglandine. L'IA doit se faire le matin et le soir à condition que les vaches aient montrée des signes de chaleurs tôt dans la journée. Mais si l'œstrus se produisait plus tard alors, l'insémination se fera l'après midi et le lendemain matin.

II) RECOLTE DES EMBRYONS

II.1) Méthodologie :

a) Méthode chirurgicale :

La récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous anesthésie générale le plus souvent au niveau de la ligne blanche en avant du pis. Une fois l'utérus extériorisé, une incision d'1cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter à deux voies (sonde de Folley). Le ballonnet était ensuite gonflé. Le liquide de récolte était injecté au moyen d'une seringue et d'une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet. Après récolte, le ballonnet était dégonflé, l'utérus suturé et on procédait de la même manière pour l'autre corne utérine. Cette technique offrait l'avantage d'un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80 %), de pouvoir juger de la réponse ovarienne au traitement de superovulation. Elle fut pratiquement abandonnée étant donné l'infrastructure de mise en place requise mais aussi la difficulté de répéter souvent l'intervention sur le même animal. (Ch.Hanzen 2009).

b) Méthode non chirurgicale ou collecte transcervicale :

Cette procédure plus ou moins récente a permis de faciliter la récolte embryonnaire pour les praticiens du TE, en plus de la réduction des risques de complications chez la donneuse (complications opératoires et postopératoires) : (I. Gordon ; 1996).

Elle consiste au prélèvement dans les voies génitales (cornes utérines) des embryons au 7ème jour après l'œstrus (annexe2) avant que ceux-ci ne sortent de leurs membranes pellucides (9ème jour) et après leurs migration de l'oviducte au cornes utérines (j4 à j5). La membrane pellucide constitue une excellente barrière de protection de l'embryon

de la plus part des germes pathogènes. De plus seul les embryons entourés de cette membrane supportent bien la congélation.

Traitement par la Prostaglandine après la récolte embryonnaire :

En Espagne ; Lopez Gatus (1995) a conclu que la récolte et le lavage utérin n'induisaient pas la lutéolyse chez la plupart des génisses superovulées ; les embryons qui restent dans l'utérus étaient capables de produire une gestation normale jusqu'à terme d'où la nécessité d'un traitement lutéolytique post-flushing (prostaglandine) (Gordon, 1996).

II.2) Détermination de la qualité des embryons :

a. Rappel du développement embryonnaire durant le stade libre :

Cette phase se situe entre la fécondation et la migration du zygote à l'intérieur des trompes utérines, c'est la période qui précède la nidation et la fixation du blastocyste sur la paroi de l'endomètre en d'autre terme ce stade correspond à l'étape morula. L'œuf résultant de la fécondation commence aussitôt à se diviser : deux, quatre, huit, puis seize cellules, toujours entourées de la zone pellucide. Ce petit amas qui n'a fait que diviser le cytoplasme de l'ovule sans augmenter de volume ressemble, au microscope, à une petite mûre, morula en latin. Ce stade est atteint au bout de 3 à 4 jours tandis que l'œuf descend lentement l'oviducte vers l'utérus, poussé par les mouvements ciliaires et les contractions. Durant les 15 à 30 jours suivants, selon les espèces, l'œuf va vivre libre dans l'utérus.

b. La première différenciation :

Après ces premières divisions à l'intérieur de la zone pellucide, celle-ci s'amincit puis disparaît, et l'œuf continue à multiplier ses cellules. Bientôt les cellules jusque là toutes semblables, vont se différencier et s'organiser :

- Quelques cellules plus volumineuses se regroupent en une petite masse, le bouton embryonnaire, premières cellules de l'embryon, futur organisme.
- Les autres cellules, plus petites, se placent à la périphérie formant une couche appelée trophoblaste : ces cellules donnent naissance aux enveloppes chargées de nourrir l'embryon (enveloppe externe ou chorion).
- L'ensemble embryon plus trophoblaste se creuse d'une cavité remplie de liquide et prend le nom de blastocyste. L'œuf devenu blastocyste poursuit sa croissance,

le bouton embryonnaire se développe en embryon, le trophoblaste se développe en enveloppe.

c. Chronologie du développement embryonnaire :

Jour	Heures	Evènements Taille
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 conceptus-endomètre
35		Implantation
40-50		Fin de l'organogénèse

d. Appréciation de la qualité des embryons :

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 de gestation. D'autres moins couramment utilisés se basent sur le nombre de cellules identifiées à un stade de développement donné, l'activité enzymatique ou métabolique (consommation de glucose en culture, synthèse de lactate déshydrogénase) ou encore sur le délai voire les modalités d'éclosion du blastocyste une fois sa phase d'expansion réalisée.

e. Les (Kennedy et al. 1983) classes d'embryons distinguées:

- - **Classe 1** (excellent)

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

- - **Classe 2** (bon)

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

- - **Classe 3** (Moyen)

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

- - **Classe 4** (mauvais)

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

- - **Classe 5** (dégénérés)

La dégénérescence peut parfois être évidente à un point qu'il n'est plus possible de reconnaître le stade de développement. L'embryon prend parfois une configuration anormale.(annexe 3)

Chapitre II : PRODUCTION IN VITRO D'EMBRYON

Hors mis les demandes d'embryons de plus en plus importantes pour les études fondamentales et les nouvelles applications tel la transgénèse et le clonage, la méthode de production d'embryon in vivo présente de multiples limites qui ont amené les chercheurs à mettre au point de nouvelles techniques de récupération d'ovocytes et de fécondation in vitro faisant ainsi intervenir les processus de maturation ovocytaire et de capacitation de spermatozoïde.

I) RECOLTE DES OVOCYTES

La récolte des ovocytes peut se faire soit à partir des ovaires prélevés à l'abattoir sur des follicules de diamètre compris entre 0.3-0.8mm (follicules antraux précoces) et 3-8 mm ; soit par laparoscopie (avec une récolte importante du nombre d'ovocyte mais les conditions liées à cette technique la rend onéreuse) ou encore par ponction écho guidée des follicules ovariens.

I.1) Récolte d'ovocyte à partir d'ovaires d'abattoir

Les ovaires doivent être récupérés dans les 2 heures suivant l'abattage de l'animal, stockés à une température de 24 à 30°C et les ovocytes prélevés au plus dans les 4

heures suivantes (annexe 4). Le prélèvement des ovocytes peut se faire par aspiration du liquide folliculaire (méthodes les plus anciennes avec collecte de 9 à 16 ovocytes par ovaire) ou par dissection préalable des follicules (on a 16 à 17 follicules par ovaire avec un plus grand nombre de ovocytes morphologiquement normaux) mais le protocole est plus lent que le précédent. La découpe de l'ovaire en tranches (slicing ovary) ou une pré digestion de l'ovaire au moyen de la trypsine sont également des méthodes utilisées.

I.2) Prélèvement in vivo

La première collecte avait été réalisée par laparoscopie para lombaire droite en 1985 sur femelles superovulées, puis le développement de l'échographie en gynécologie animale permit l'utilisation de la ponction transvaginale écho-guidée (annexe 5) ou OPU (ovum pick up) des follicules ovariens.

L'OPU est la technique la plus habituellement utilisée et ne nécessite pas de stimulation hormonale préalable cependant, il semblerait qu'une pré stimulation à la FSH augmenterait le nombre de blastocyste et donc d'embryons obtenus sans augmenter le nombre d'ovocytes ni de follicules ponctionnés (Googhand et al ; 1996, 1997, 1999, 2000, R De Roover, Ch Hansen et al 2008) ; aussi, un apport énergétique adéquat, les hormones de croissances et l'acide rétinoïde (métabolite du rétinol) amélioreraient la qualité des ovocytes. De plus elle n'est pas douloureuse puisque réalisée sous anesthésie épidurale.

Le prélèvement des ovocytes peut être effectué de façon hebdomadaire ou bihebdomadaire sans altérer les fonctions et l'anatomie des ovaires même après 5 mois de ponctions bihebdomadaires (Pieterse et al 1991b, Van der Schans et al 1991, Simon et al 1993). D'ailleurs, une collecte bihebdomadaire donnerait un plus grand nombre d'ovocytes de meilleure qualité qu'une collecte hebdomadaire (I Gordon, 2003).

Le pourcentage moyen d'ovocytes récoltés est de 57 % mais varie selon les auteurs entre 19 et 70 %.

II) CLASSIFICATION DES OVOCYTES

Selon la répartition du COC (Cumulus Oophorus Complex) autour de l'ovocyte et la transparence de l'ooplasm, les ovocytes sont divisés en 4 classes ; ces différences identifiées lors de l'examen peuvent être attribuées à différents stades de maturation. Ainsi on distingue (annexe 6) :

classe 1 : Le COC a un aspect transparent. Le cumulus (cellules de la granuleuse) est compact et entoure complètement l'ovocyte. L'ooplasme ovocytaire a un aspect homogène.

Classe 2 : Le COC a le même aspect que dans la classe 1 mais l'ooplasme a un aspect plus irrégulier, une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie.

Classe 3 : L'ensemble du COC est sombre, le cumulus est moins compact, l'ooplasme est plus irrégulier et présente des amas plus sombres

Classe 4 : Le cumulus est complètement expansé voire absent (oocytes nus : naked oocytes).

III) MATURATION DES OVOCYTES

III.1) Maturation in vivo des ovocytes

La décharge préovulante de LH induit le phénomène de maturation chez le follicule antral ce processus se définit par 2 grands événements :

- **La maturation nucléaire.** Elle aboutit à la libération du premier globule polaire. En effet, dans le follicule terminal prêt à ovuler la décharge de LH provoque d'une part la levée d'inhibition des OMI (ovocytes méiotique inhibitor) induit par le follicule antral et d'autre part la synthèse des stéroïdes activateurs de la méiose appelée MPF (Meiotic Promoting Factor) qui déclenche ainsi la méiose.
- **La maturation cytoplasmique.** La maturation cytoplasmique est en majeure partie caractérisée par la migration des granules (granules corticaux) vers la corticale en s'associant au cytosquelette afin d'empêcher la polyspermie. Pendant cette phase on note également la multiplication des organites cellulaires (mitochondries et appareils de golgi) et une protéosynthèse accrue préparant l'ovocyte à la fécondation et au développement embryonnaire précoce.

III.2) maturation in vitro des ovocytes.

La maturation in vitro vise à obtenir la maturation nucléaire et surtout cytoplasmique des ovocytes ayant déjà acquis la croissance et la compétence méiotique (follicules antraux). Pour cela, diverses méthodes ont été proposées mais la méthode la plus habituelle reste la

culture des ovocytes (10 à 20 ovocytes) dans des micropuits contenant 100 à 200 microlitres de milieu à 39°C.

La maturation ovocytaire est influencée par plusieurs facteurs encore inconnus pour la plus part (moyenne 60 à 85 % des ovocytes maturés in vitro sont fécondés et se divisent, mais seuls 25 à 30 % atteignent le stade blastocystes). Cependant, sa réussite dépend de la composition du milieu et la technique utilisée.

Les milieux de maturation diffèrent selon les espèces chez la vache, les milieux couramment utilisés sont : le milieu TCM 199, le milieu TALP (thyrode albumine lactates pyruvate) ou encore le krebs ringers bicarbonates tous enrichis au sérum de composition variable et bien d'autres substances comme le liquide folliculaire à faible dose, l'adrénaline, les antibiotiques (pénicilline G et aminosides)...etc.

Plusieurs études ont montrés que l'addition des cellules de la granulosa au milieu de culture était essentiel à l'acquisition de la compétence au développement in vitro des ovocytes (Chian et al, 1994 ; Yang et al, 1995 ; Machatkova et al, 2001). La GH et la FSH agissant de façon différente sur la maturation nucléaire, améliorent la compétence de développement des ovocytes à la maturation in vitro (I. Gordon, 2003).

Au microscope, le premier signe de maturation in vitro est la reprise de la méiose exprimée par l'expulsion du premier globule polaire et des modifications cytoplasmiques (redistribution des organites intracellulaires). La maturation ovocytaire dure en général 18 à 24h.

L'évaluation de la qualité de maturation de l'ovocyte se fait par simple observation du COCs : ils doivent présenter une expansion du COCs, un globule polaire et le noyau ovocytaire en métaphase II.

IV) CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES

C'est l'acquisition par les spermatozoïdes du pouvoir fécondant ; in vivo elle est induite par les stéroïdes ovariens associés à une forte concentration d'ions Ca^{++} ; a lieu quelques heures avant l'ovulation et dure 4 à 6h chez les bovins. In vitro elle comporte 3 étapes : **la sélection** obtenue soit par centrifugation pendant 15min, soit par la méthode de swing-up (nage ascendante) pendant 1h (en incubation) ; **la capacitation** induite par l'héparine à 10 voir 20mcg/ml contenu dans un milieu de culture avec des spermatozoides de

manière à avoir 2 000 000 de ces derniers par ml et enfin **l'induction et l'entretien de la mobilité**; favorisés par la caféine et la théophylline.

IV) FECONDATION IN VITRO.

Les spermatozoïdes capités sont co-incubés avec l'ovocyte mature (une vingtaine d'ovocytes et 100 000 spermatozoïdes) pendant 18h à 39°C dans 50 à 100 microlitres de milieu (milieu TALP à PH=7,4 ; une atmosphère à 5% de CO₂ et une pression osmotique comprise entre 280 et 300 mOs). Il s'ensuit alors la fécondation (annexe 7). La GH-RH, la prostaglandine et l'acide hyaluronique y jouent un rôle important.

La fécondation est évaluée in vitro par : l'expulsion du deuxième globule polaire ; la présence de spermatozoïdes accessoires ou le taux de clivage de ces derniers. Le taux de fécondation varierait entre 30 et 85% alors que le taux d'embryons atteignant le stade blastocyste n'est que de 7 à 50 %. Notons que le taux de polyspermie est élevé lors de la fécondation in vitro à cause du grand nombre de spermatozoïdes nécessaire à la fécondation.

VI) CULTURE DES EMBRYONS.

Les zygotes obtenus après fécondation in vitro sont débarrassés mécaniquement de leurs cellules péri ovocytaires (pour éviter l'appauvrissement du milieu de culture) puis cultivés dans un milieu de culture adapté jusqu'au stade blastocyste. Le développement du zygote jusqu'au stade blastocyste passe par deux phases de contrôle : la phase de contrôle maternelle où les divisions n'impliquent pas l'activation du génome et mobilisent les réserves protéiques initialement contenues dans les ovocytes puis la phase de contrôle embryonnaire. La transition de la phase maternelle à la phase embryonnaire (8-16 cellules) est une étape critique chez ce dernier car à ce stade il y a blocage du développement des embryons correspondant à la période d'activation du génome ovocytaire (annexe 8) et requière ainsi un milieu de culture approprié permettant de le rapprocher de l'environnement qui existe in vivo dans l'utérus de la femelle.

Les embryons sont placés dans des milieux de culture de compositions chimiques proches des sécrétions tubaires tel le SOF (Synthetic oviductal fluid) ou en cocultures avec un

substrat nourriciers (cellules feeder) qui peuvent être des cellules trophoblastiques, tubaires, les cellules de la granuleuse ou somatiques (VERO et autres...).

Selon les auteurs, la nature des milieux ou les types cellulaires utilisés, le pourcentage de blastocyste/morulas obtenu par rapport au nombre d'ovocytes inséminés serait compris entre 25 et 30 %. Cette évaluation se fait au jour 7 (cours Pr C. HANSEN 2009). Les blastocystes obtenus sont conditionnés (mise en paillette à raison de 1 embryon par paillette) pour le transfert ou la congélation.

Chapitre III : LA CONSERVATION DES EMBRYONS

La transplantation des embryons doit être réalisée très rapidement, dans les quelques heures qui suivent la collecte. Cette contrainte limite les possibilités de transport. Elle exige également que des receveuses soient prêtes, souvent en excès, étant donnée l'impossibilité de prévoir le nombre d'embryons produits par une donneuse. Il était donc nécessaire, pour développer les transferts d'embryons de pouvoir les conserver, c'est-à-dire de mettre au point leur congélation.

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

I) NATURE DES AGENTS CRYOPROTECTEURS :

Les cryoprotecteurs actuels sont des molécules chimiques naturelles ou de synthèse. Ils doivent permettre une bonne protection de la cellule, sans être toxiques de par leur nature chimique. Ils sont caractérisés par une viscosité élevée, et une forte hydrophilie. Différents paramètres définissent les cryoprotecteurs couramment utilisés. En fonction de leur capacité de pénétration, on distingue :

a) Les cryoprotecteurs pénétrants :

Ce sont principalement des solvants organiques de faible poids moléculaire. Ils sont pour la plupart des dérivés d'alcools. Leur mode d'action est la pénétration dans la cellule grâce à leur capacité de pénétration membranaire, et la formation de glace extracellulaire en maintenant un équilibre osmotique (annexe9).

b) Les cryoprotecteurs non pénétrants :

Leur fort pouvoir osmotique entraîne une déshydratation intracellulaire, donc une moindre formation de cristaux. Les sucres protègent la membrane cellulaire par interaction avec elle.

II) LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION (annexe 9) :

*** Congélation lente :**

La congélation lente, est une technique « lente » de cryoconservation dont le principe est l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon. Les cryoprotecteurs utilisés sont le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO ou encore le propane-diol, à la concentration de 10 % environ. L'incorporation des cryoprotecteurs a tendance à se faire en une seule étape actuellement, mais elle peut se faire en plusieurs étapes: les embryons sont alors déposés dans différents bains de concentrations croissantes en cryoprotecteurs avec environ 5 minutes dans chaque bain).

Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes de 0,25 ml (annexe9, figure1a), qui vont être réfrigérées suivant un protocole précis, nécessitant un appareil de congélation programmable pour régler les différents paliers de refroidissement successifs. La température descend tout d'abord jusqu'à - 7° C à la vitesse de 1 à 3°C/min pour les appareils programmables, pour les autres appareils la descente jusqu'à - 7° C n'est pas programmable, les paillettes sont déposées dans l'appareil de congélation préalablement refroidi à - 7° C. Dans tous les cas, les paillettes sont maintenues à - 7° C pendant 5 minutes environ, avant

l'induction de la cristallisation (« seeding ») par refroidissement localisé de celles-ci grâce à un système incorporé à l'appareil de congélation.

La cristallisation doit être induite par l'opérateur avant qu'elle ne se fasse de manière spontanée afin d'éviter une congélation des cellules à une température trop basse qui entraînerait une baisse brutale de la température dans la paillette et provoquerait par conséquent des dégâts cellulaires. La température de « seeding » dépend du point de congélation de la solution, donc elle peut varier en fonction des cryoprotecteurs utilisés (- 6° C à - 7° C). De - 7° C à -30° C, la température descend très lentement (0,1 à 0,3° C/min) pour permettre la déshydratation des embryons.

En fonction des protocoles, l'arrêt de la descente progressive de température se fait entre - 25° C et - 35° C. Les paillettes sont ensuite rapidement plongées dans l'azote liquide à - 196° C, pour éviter une déshydratation trop poussée qui serait létale pour l'embryon. Dans ces conditions de cryoconservation, la déshydratation des cellules embryonnaires n'est donc que partielle : il reste une certaine quantité d'eau intracellulaire qui se transforme en glace. Pour empêcher le phénomène de recristallisation de cette eau au dégel, il faut décongeler rapidement les paillettes. Elles sont donc plongées rapidement dans un bain-marie à une température comprise entre 22 et 37°C. Selon les protocoles : la vitesse de réchauffement est de l'ordre de 2500°C/min.

*** Vitrification :**

Encore appelée « état vitreux ». Ceci est possible en utilisant des concentrations très élevées en cryoprotecteurs (6 à 7,5 M). Les embryons sont déposés dans différents bains à concentration croissante en cryoprotecteurs, ils sont ensuite conditionnés dans des paillettes, avec de part et d'autre de l'embryon, des colonnes de solution de dilution contenant des sucres (galactose, saccharose, tréhalose...), puis immédiatement et rapidement plongés dans l'azote liquide (refroidissement de l'ordre de -2500°C/min, en paillette de 0,25 ml. Au dégel, les paillettes sont rapidement plongées dans un bain-marie à 25 - 30°C. Les embryons sont ensuite rincés et transférés dans une femelle receveuse. (Baril *et al* 2001a, 2001b).

*** Vitrification rapide (OPS) et ultra rapide**

Ces techniques de vitrification reposent sur des vitesses de refroidissement et de réchauffement encore plus rapides, de l'ordre de 20 000°C/min. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié (seulement 2 µl pour l'OPS) et à la faible épaisseur des parois des paillettes classiques de 0,25 ml qui ont été étirées (Vajta *et al* 1997a, figure 1.c).(annexe)

III) FACTEURS AFFECTANT L'EFFICACITE DE LA CRYOCONSERVATION :

- **Origine des embryons (production *in vivo* ou *in vitro*) :**

Dans l'espèce bovine, le taux de mise bas à partir d'embryons produits *in vivo*, et congelés, n'est que légèrement inférieur à celui obtenu après transfert des embryons à l'état frais (Niemann 1991, Hasler 2001, Martinez *et al* 2002b). Il semble bien démontré que les embryons produits *in vitro* témoignent d'une plus grande sensibilité au processus de la congélation-décongélation (Cours Ch. Hanzen 2009/2010).

- **Stade de développement :**

Les stades avancés de développement embryonnaire tolèrent généralement mieux la cryoconservation. Dans l'espèce bovine, 40 % de mise bas sont obtenus à partir de blastocystes produits *in vivo* et congelés contre seulement 18 % à partir de morula (Martinez *et al* 2002a). Les essais de congélation d'embryons âgés de moins de 5 jours ne se sont pas accompagnés d'un franc succès (Cours ch. Hanzen 2009/2010).

Chapitre IV: TRANSFERT EMBRYONNAIRE

Les embryons obtenus *in vivo* ou *in vitro* selon le protocole utilisé sont soit transféré chez les femelles dites receveuses à l'état frais ou seront congelés, ces derniers ne seront transférés qu'ultérieurement après décongélation. Dans les deux cas, les femelles choisies sont préparées à l'avance.

I) PREPARATION DES RECEVEUSES.

I.1) choix des receveuses.

Le problème majeur lors de transfert embryonnaire est la non disponibilité des receveuses, en générale les embryons obtenus sont congelés par manque de receveuses. Afin d'optimiser leur nombre, le vétérinaire de terrain peut intervenir en tant que conseiller auprès de l'éleveur en agissant sur la sélection, la mise en condition et la préparation des receveuses (Broadbent P.J *et al* ; 1991).

Les receveuses sont choisies suivant leurs aptitudes à la reproduction (bonne), un état sanitaire bon et sans antécédent pathologique majeur associé à un examen gynécologique

parfait ; l'état d'embonpoint doit être compris entre 3 et 3.5 pour les génisses et 2.5 à 3 pour les pluriparts. En générale les résultats sont meilleurs en comparant : les génisses aux pluriparts (leur taux de réussite est de 10% supérieur) (Nirbart M., 1991 ; Ponsart C. et al, 2000) ; Les races laitières aux races allaitantes car elles sont habituées à être manipulées et, les femelles croisées aux femelles de race pure.

Les femelles doivent être déparasitées au préalable au moins 15 jours avant et également alimentées au flushing dans la période autour de la mise en place de l'embryon. Elles doivent être souscrit de tous facteur de stress (changement de troupeau, sevrage, écornage...) et de préférence mise en stabulation libre bien éclairée ou au pré.

I.2) synchronisation des receveuses.

Elle constitue l'étape la plus importante ; pour une réussite du transfert d'embryon, une synchronisation parfaite entre l'âge de l'embryon et l'état physiologique de la receveuse doit être de règle. De ce fait, les chaleurs de transfert de référence de la receveuse doivent coïncider avec celles de superovulation de la donneuse.

Des études faites en 1994 ont montré que, pour les receveuses venues en chaleurs respectivement 48 h, 24 h avant la donneuse, en même temps que la donneuse, 24h et 48 h après la donneuse ; les pourcentages de gestation étaient respectivement de 24 ; 52 ; 58 ; 50 et 44 %. Un écart de 24 heures maximum entre le jour des chaleurs de la donneuse et de la receveuse sera donc accepté. In vitro, le développement des blastocystes peut être retardé c'est pourquoi il est recommandé d'adopter une stratégie de synchronisation différente.

Les traitements hormonaux de superovulation peuvent être fait seuls ou en association ; cela dépend du degré de synchronisation des hormones utilisées, de la possibilité de non détection des chaleurs qu'ils offrent et également du degré d'exactitude du corps jaune présent détecté par palpation ou par échographie avant la synchronisation.

Etant donné que la récolte se fait entre j7 et j8 post insémination de la donneuse (embryons âgé de 6 à 8jour); correspondant à j7 à 8 post œstral, la synchronisation doit être faite de sorte que, pour un transfert à l'état frais d'embryon, la receveuse soit prête avec un corps jaune bien développé au moment de la récolte des embryons de la donneuse.

Selon leur protocole, la synchronisation des chaleurs est réalisée à base de prostaglandine F2 alpha (PGF2 α); de norgestomet seul ou en association avec la PGF2 α ou selon le protocole d'ovosynch. Il a été démontré que le protocole d'ovosynch associé au CIDR avait un effet favorable sur la gestation d'une part et permettrait d'autre part un transfert sans détection préalable de chaleur (KAWATE et al 2007). De plus, ce protocole est également celui

indiqué pour la synchronisation des receveuses au transfert d'embryons produit in vitro (Ambrose et al ; 1999).

Pour les embryons congelés les receveuses sont préparées et transférées au moment opportun de leurs cycles après une synchronisation ou sur observation de chaleurs naturelles.

II) PROTOCOLE DE TRANSFERT PROPREMENT DITE

Au début, les transferts d'embryons furent réalisés par voie chirurgicale (sous anesthésie épidurale) au niveau du flanc ipsilatéral à l'ovaire porteur du corps jaune. La peau et la tunique abdominale sont incisées au moyen d'un bistouri et les couches musculaires dilacérées sur une longueur de 10 cm environ au moyen des doigts. Le péritoine ponctionné avec l'index. L'extrémité de la corne est amenée au niveau du site opératoire et l'embryon mis en place dans son tiers supérieur après ponction de la corne au moyen d'une aiguille mousse.

Plus classiquement, le transfert d'embryon est réalisé à l'heure actuelle par voie transcervicale au moyen de pistolet de transfert (« inovulateur de Cassou ») de diamètre de 3 mm pour les génisses ou de 4 mm plus rigide pour les vaches (annexe 11).

FACTEURS INFLUENÇANT LES RESULTATS

❖ L'état hormonal de la receveuse.

Une concentration minimale de progestérone est indispensable le jour du transfert. La vérification du statut physiologique de la receveuse doit donc être effectuée soit par évaluation de la taille du corps jaune ou par dosage du taux de progestérone.

❖ La saison.

Le taux de réussite enregistré pendant l'été (52%) est nettement supérieur à celui enregistré pendant l'hiver (21%) selon les études réalisées par Lonergan et al. en 1995

❖ L'âge et la race de la receveuse.

L'un des critères de sélection des receveuses est basé sur l'aptitude des femelles à la reproduction (certaines races répondent mieux au transfert que d'autres) et leurs âges. Malgré les difficultés de manipulation du tractus génital des génisses, leur taux de réussite reste cependant plus important que celui des pluripares. Notons également que, la réussite du transfert embryonnaire diminue avec l'âge au moment du transfert.

❖ **L'effet de la qualité des embryons.**

Le paramètre le plus important lors du transfert embryonnaire est la qualité (classe) des embryons mais aussi leur nature et leur âge. Les embryons transférés à l'état frais ont un pourcentage de réussite plus élevé que les embryons congelés ; ceux produits in vivo également par rapport à ceux produits in vitro.

III) INTERET ET LIMITE DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE.

Le TE est une biotechnologie qui présente de nombreuses avantages dont le premier est la possibilité de manipulation génétique ; trois facteurs y sont favorisés :

- la réduction de l'intervalle entre générations (les génisses peuvent être collectées à 15 mois) et la multiplication par n de la descendance de femelles de haute valeur génétique inséminées avec les meilleurs taureaux.
- l'augmentation de l'intensité de sélection des mères à taureaux : en moyenne, un mâle par vache est garanti, ce qui permet d'approvisionner les schémas à partir des toutes meilleures d'entre elles.
- l'augmentation de la pression de sélection ; il devient possible d'évaluer les animaux en tenant compte des collatéraux issus de la même mère.

D'autres avantages résident dans le fait que :

- Il est possible d'introduire dans un élevage à population SPF des gènes extérieurs.
- C'est un moyen de commercialisation, ou/et de transport du matériel génétique dans des conditions économiques et sanitaires plus faciles, et moins onéreuses que pour les animaux vivants.
- La conservation des embryons de races en péril dans des banques d'embryons est également possible.

Aussi intéressante qu'elle puisse se présenter, cette biotechnologie n'est pas exempte de limites. Ces dernières, principalement liées au protocole de superovulation se résument en :

- Son hétérogénéité qui résulte du fait que le moment précis de l'ovulation et de la fécondation ne peuvent être maîtrisés in vivo.
- L'allongement de l'intervalle nécessaire à l'obtention d'une gestation puisque le délai entre deux super ovulations est de deux mois.
- Le faible nombre d'embryons obtenus (7 à 8) et 5 à 6 transférables.

- La variabilité de production entre femelles traitées (20% à 30% de femelles traitées ne donnent pas d'embryons transférables et 25% produisent plus de 6 embryons)
- Des risques iatrogènes de kystes ovariens, d'infection utérine et également de réfraction de certaines femelles à la réponse de superovulation après plusieurs traitements.

La fécondation in vitro quand à elle présente de nombreux intérêts tel que :

- Elle peut se pratiquer sur femelles infertiles ou n'ayant pas répondues à des traitements de superovulation: ainsi, toutes les femelles génétiquement intéressantes peuvent être utilisées.
- L'OPU peut être pratiquée aussi bien sur les génisses, les femelles au premier tiers de gestation que les femelles en lactation, au postpartum, au tarissement et aussi sur les veaux et les femelles prépubertes (mais intérêt mineur).
- Augmenter la pression de sélection sur des mères à taureaux (en temps égal le nombre de veaux potentiellement obtenu est multiplié par 4)
- Obtenir des descendants de femelles ne répondant pas à la superovulation.
- Gérer les accouplements ovocyte par ovocyte en variant considérablement le nombre de mâles accouplés à une même femelle. D'où une meilleure précision des index, et une diminution de la parenté moyenne.

Tout comme le TE, la fécondation in vitro se voit limitée par :

- La fragilisation des embryons à la congélation ce qui entraîne une diminution de leur taux de gestation.
- Un nombre important de veaux de poids élevé à la naissance et une plus grande proportion de perte de veaux durant la gestation. Ces problèmes peuvent être rattachés à l'environnement de culture de l'embryons (Van Wagtendonk leeuw et al ; 2000)
- Le coût élevé de la production d'embryon in vitro peut être également mentionné comme une limite de cette biotechnologie

Chapitre V : LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE DANS LE MONDE ET EN ALGERIE.

INTRODUCTION :

Historiquement, les premières applications des données de la recherche ont été développées en collectant des embryons développés *in vivo*, au stade blastocyste. Dans un deuxième temps, mais à partir des années 80 seulement, les interventions ont concerné les ovocytes matures fécondés *in vitro* (Brackett *et al* 1982) puis les ovocytes immatures (Leibfried-Rutledge *et al* 1987). Cette évolution a été rendue possible par les progrès réalisés dans la définition de conditions de culture appropriées (Heyman et Menezo 1987). Elle a permis de multiplier les interventions sur les embryons, créant une combinatoire de techniques intégrant toujours plus en avant les données de base de la biologie du développement.

Ces techniques se sont organisées autour de trois technologies principales: la transplantation embryonnaire, associant la production et la collecte d'embryons *in vivo* et intégrant maintenant le plus souvent les possibilités offertes par leur congélation ou l'examen de leurs cellules (sexage) ; le prélèvement *in vivo* d'ovocytes par ponction folliculaire (OPU) suivi de leur maturation, leur fécondation *in vitro* (FIV) puis de la culture des embryons ; enfin le clonage qui ouvre la voie à la multiplication de génotypes embryonnaires identiques et pourrait demain être étroitement associé à la modification contrôlée du génome par transgénèse.

IV) HISTORIQUE

Le premier transfert embryonnaire a été obtenu par le biologiste « HEAPE » il s'agit d'un lapereau Angora obtenu après transfert sur une lapine de race belge en 1891 (Betteridge KJ An historical look at embryo transfer. J.Reprod. Fert.1981).

Puis en 1928 et 1930 la découverte de l'hormone chorionique gonadotrope équine ouvra la voie à la superovulation qui sera réalisée pour la première fois chez les lapins par Pincus. Ce n'est qu'en 1951 que naquit le premier veau issu du transfert d'embryon (Willett et al. 1951). Le premier veau né après transfert d'un embryon congelé puis décongelé naquit en 1973 (Wilmot et Rowson 1973). Il portait le nom de Frosty II.

L'un des premiers essais de la fécondation *in vitro* de maturation d'ovocytes bovin avait été rapporté par Screenan ; ce dernier avait utilisé le sperme pré incubé dans un milieu contenant l'enzyme alpha-amylase (utilisé pour capaciter les spermatozoïdes destinés à l'insémination artificielle). La fécondation *in vitro* et maturation des ovocytes ne fut réussie qu'en 1977 au Japon (Iritani et Niwa ; 1977).

Quelques années plus tard (1982), Brackett et son association à l'université de Pennsylvanie obtiennent le premier veau issu de la fécondation *in vitro* (FIV) et maturation des ovocytes. Au nord du Canada ; Lambert et al (1983) utilisent la laparoscopie pour récolter les ovocytes après ovulation et après fécondation immédiate et culture de l'embryon dans l'oviducte de rat; ils obtinrent 6 veaux. Les méthodes de récolte d'ovocyte sur ovaire à l'abattoir avaient également été développées permettant ainsi la récolte des ovocytes soit par aspiration soit par ponction du liquide folliculaire.

V) ACTUALITE DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE DANS LE MONDE ENTRE 2000 ET 2005

II.1) Résultat de transfert après superovulation

Après la mise en place de la technique de transplantation non chirurgicale des embryons, cette biotechnologie a commencé à être appliquée en ferme et a subi dès lors jusqu'en 1990 son plus fort développement dans le monde principalement en Amérique du Nord et en Europe. En 1992 et 1993, une forte baisse de l'activité du TE a été observée dans tous les pays Européen, en relation avec le renforcement du dispositif de maîtrise de la production laitière adopté en 1992. A partir de 1994, une reprise de l'activité a été observée.

Entre 2000 et 2005 l'activité de transfert embryonnaire a subi une nette diminution principalement en 2001 à cause de la crise de l'ESB et de la fièvre aphteuse survenues dans le monde et la crise économique en Amérique du sud (Mexique.) (Figure 1). Il faut noter que cette baisse de l'activité n'est pas due à la diminution de la réponse au traitement de superovulation mais plutôt à la diminution du nombre de femelles disponibles ; la réponse à la superovulation au cours de cette période ayant subi une nette amélioration (nombre d'embryons transférables de 6,2 en 2002 contre 5,9 en 2001 et en 2000) (données IETS 2000 ; 2001 et 2002).

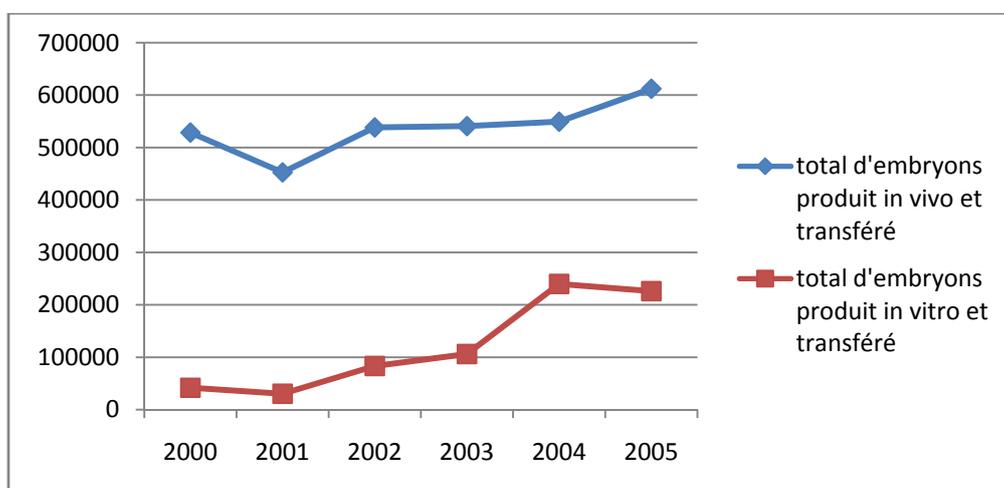


figure1 : activité de transfert embryonnaire dans le monde (IETS)

L'activité de transfert embryonnaire recensée dans les 6 continents entre 2000 et 2005 montre que les résultats les plus importants sont observés en Amérique du nord avec 42% puis l'Europe (20%), l'Amérique du sud (19%) et l'Asie (14%). L'Afrique (1%) et l'Océanie (4%) restent les continents les plus en retard pour ce qui concerne cette biotechnologie (figure2).

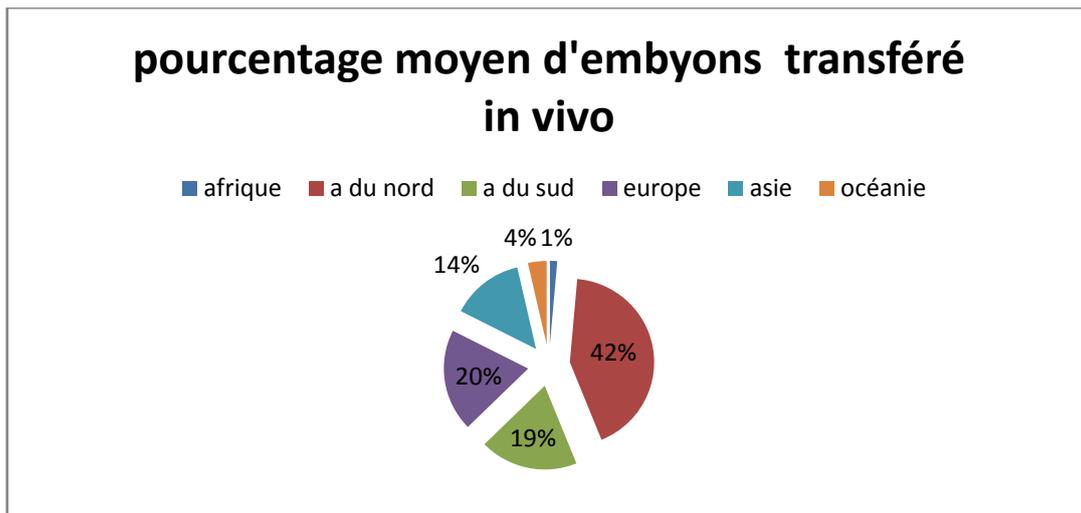


Figure 2 : pourcentage moyen de TE dans les différents continents entre 2000 et 2005 (IETS)

L'évolution du TE dans le monde entre 2000 et 2005 nous montre que, malgré la chute observée en 2001, l'activité est en constante croissance en Amérique du nord, l'Asie et l'Amérique du sud (malgré les petites oscillations) ces deux derniers ont vu leurs activités doubler en 2 ans (entre 2001 et 2003), l'Europe quand à elle a une activité constante et plutôt en légère baisse depuis la crise de l'ESB et de la fièvre aphteuse. L'Océanie par contre après un bon taux de réussite observé en 2000 a une activité qui a considérablement diminué jusqu'en 2005 ; l'Afrique quand à elle au cours de ces 5ans a une activité presque nulle et sans évolution (figure 4) ceci montre que malgré le grand retard qu'accuse l'Afrique en terme d'amélioration génétique des cheptels donc d'amélioration des productions, aucun effort n'est perceptible dans ce continent pour rattraper ce retard.

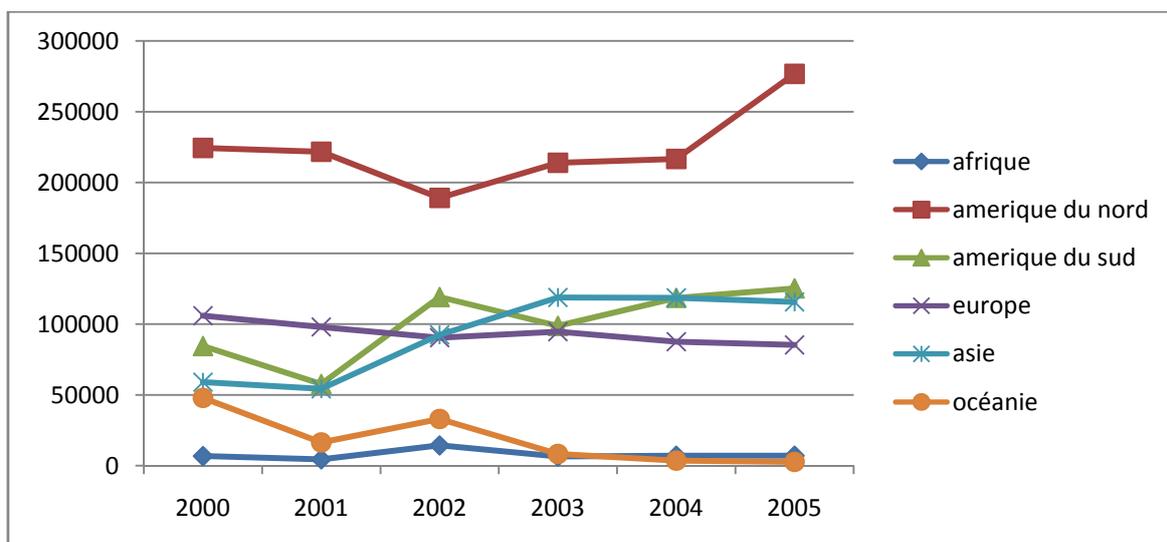


Figure 4 : évolution du TE dans le monde entre 2000 et 2005 (IETS)

II.2) Résultat de transfert après fécondation in vitro.

La popularité de la fécondation in vitro a également augmenté au cours de ces 30 dernières années principalement dans les pays qui utilisent la production d'embryons à partir de vaches réformées tels le Canada, le Japon, la Chine (où le clonage est important) et l'Amérique du Sud. Ce n'est pas le cas pour l'Amérique du Nord qui n'a recours à la FIV que pour la production d'embryons de vaches d'élites ; entre 2000 et 2005 cette biotechnologie a été en perpétuel développement (figure1). On note une plus importante utilisation de cette biotechnologie en Asie et en Amérique du Sud surtout entre 2001 et 2005 (figure5). L'Afrique également en matière de fécondation in vitro accuse un retard très important et son activité est presque inexistante (figure 6).

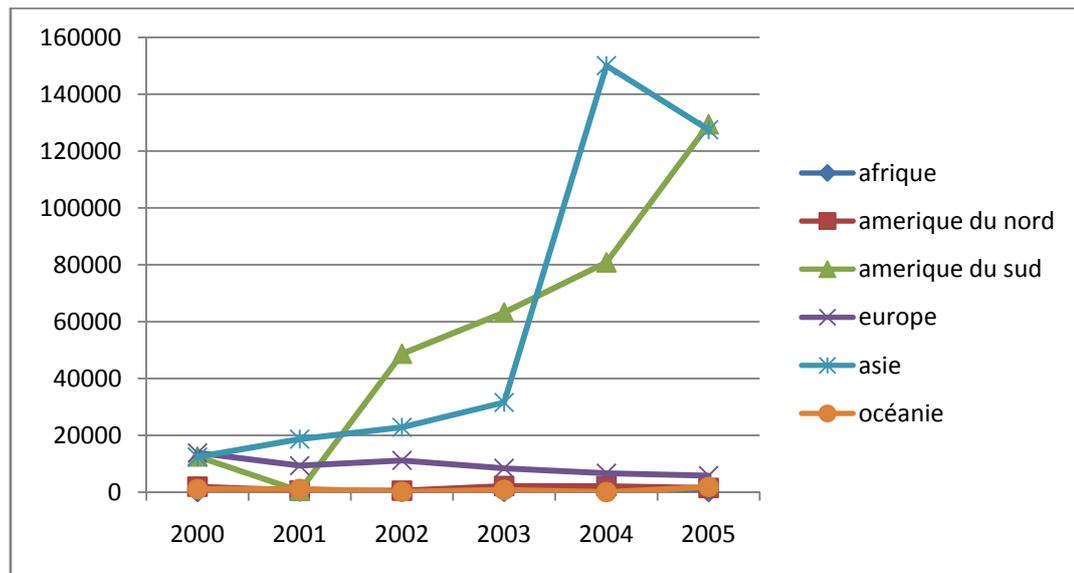


Figure 5 : activité de FIV dans le monde entre 2000 et 2005 (IETS)

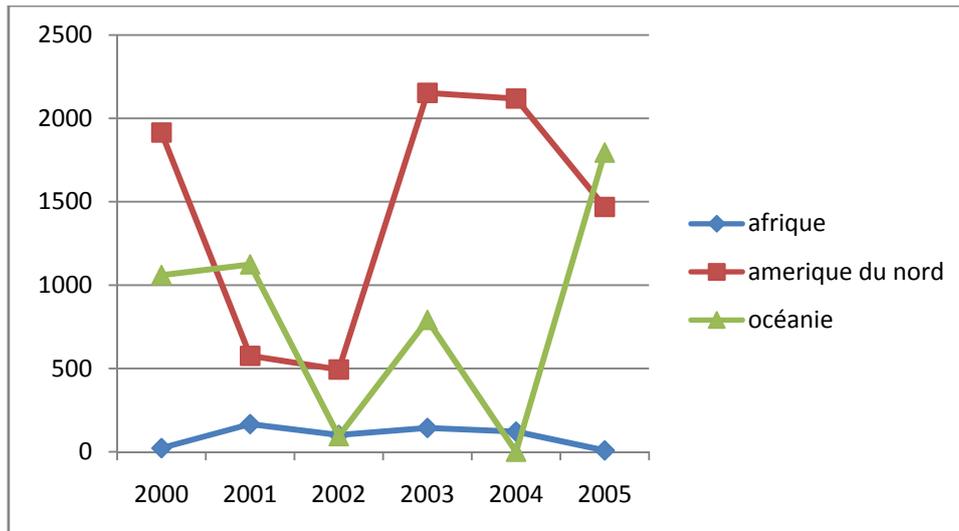


Figure 6 : activité de FIV en Afrique, en Europe et en Océanie entre 2000 et 2005 (IETS)

VI) ACTIVITE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE EN ALGERIE.

III.1) Superovulation et transfert

Comme montré précédemment, l'Afrique accuse un très grand retard en matière de production d'embryons, cette biotechnologie encore à l'état embryonnaire dans cette partie du monde est cependant déjà pratiquée en élevage dans plusieurs pays d'Afrique en l'occurrence l'Afrique du sud, le Sénégal, la Zimbabwe, la Tunisie...(selon L'IETS). En Algérie, elle n'est qu'à l'état expérimental et ne constitue jusqu'à présent que des sujets de thèse. Ainsi plusieurs travaux ont été effectués ; la première expérimentation date de 1996 où après un essai de superovulation à l'aide de PMSG (au CNIAAG), des embryons dégénérés avaient été récoltés.

Puis en 2002, AMARA M. réalisa une étude sur la superovulation avec le PLUSET (produit contenant de la FSHp et la LHp à des proportions égales) sur 12 femelles dans une ferme privée (sur chaleurs maîtrisées). Après traitement, 72 corps jaunes (cj) ont été obtenus avec une moyenne de 6 cj/ vache. Le nombre d'embryons récoltés était très faible (11 embryons dont 03 dégénérés et 08 ovocytes non fécondés). Sur 12 animaux ayant répondu au traitement de superovulation, seulement 6 animaux ont donné des produits (03embryons dégénérés et 08 ovocytes non fécondé). Amara M. explique la médiocrité de la récolte malgré la bonne réponse au traitement par plusieurs facteurs :

- Le taux élevé d'ovocytes non fécondés peut être expliqué par un certain nombre de facteur tels une immaturité des ovocytes avant l'ovulation, une utilisation de semence

de faible qualité biologique, une insémination incorrecte, le caractère individuel des donneuses (stress) ou une utilisation d'hormones gonadotropes mal dosées.

- L'obtention des embryons dégénérés pouvant s'expliquer par les mortalités embryonnaires.

Adel D. en 2005 effectua une étude comparative de production d'embryons à partir de PLUSET (molécule Espagnol de rapport LHp/FSHp = 1) et de STIMUFOL (molécule Belge contenant 40% de LHP et 1UA de FSHp). Pour ce travail, 18 vaches ont été utilisées : 12 pour la superovulation au PLUSET (lot1) dans une ferme privée à Blida et 06 pour celles au STIMUFOL (lot2) dans la ferme expérimentale de l'université agro-vétérinaire de Blida. Il constata que, les réponses au traitement étaient bonnes dans les 2 cas avec une moyenne de 6,16 cj pour le 1^{er} lot et 7 pour le second, la production d'embryons par contre était très faible voir nulle pour le 1^{er} lot avec un total de 10 embryons (02 embryons dégénérés obtenus et 08 ovocytes non fécondés) et plutôt bonne pour le second lot avec 27 embryons récoltés au total (17 embryons transférables, 01 embryon dégénéré et 09 ovocytes non fécondés). Les embryons transférables avaient été congelés.

Kaidi N. en 2006 travailla sur le transfert embryonnaire à la ferme expérimentale de la faculté agro-vétérinaire et biologie de l'université de Blida et pour cela, 4 animaux ont été superovulés (02 de races locale et 02 de race améliorée) avec du STIMUFOL. Elle obtint 55 cj dont 36 chez la race améliorée (18cj/vache en moyenne) et 19 chez la race locale (9,5cj/vache en moyenne) et récolta 05 embryons transférables (3 de classe 1 et 2 de classe 2). Les 03 embryons de classe 1 ont été transférés (mais il n'y a pas eu de gestation) et les 2 autres congelés. La race locale quoi qu'ayant répondu à la superovulation, ne donna pas d'embryons. Dans ce travail, la réponse ovarienne de la race améliorée a été bonne et comparable voir supérieure (18%) à celle obtenue par CHUPIN en 1988 (14,7%) mais celle des races locales l'était moins s'expliquant par plusieurs facteurs tel le stress, leur fort état d'embonpoint (BCS étant de 3,5 et 4) et probablement aussi l'effet de la race.

Le faible taux d'embryons obtenu (par rapport aux travaux d'Adel en 2005) pourrait ici s'expliquer par la grande variabilité des résultats observés lors de traitement de superovulation utilisant les extraits hypophysaires à des proportions différentes (Chupin D. et Procureur 1983 ; Donalson L.E 1984) et aussi par la défektivité du matériel utilisé (matériel de récolte).

Les recherches effectuées par Ferrouk M et al en 2008 sur la race locale ont aboutit à l'obtention de veaux (premiers veaux de race locale issus de transfert embryonnaires en

Algérie) dont deux mâles et une femelle. Dans ce travail, 04 donneuses de race locale avaient été traitées au STIMUFOL sur chaleurs maîtrisées au CRESTAR. A l'issue, une moyenne de : 7,5-+3,5 cj/vache fut obtenue ; 05 embryons/vache récoltée avec 2,33embryons transférables en moyenne par vache soit un taux de viabilité de 46,66%. 05 embryons avaient été transférés chez 05 receveuses de la race locale soigneusement sélectionnées ; le taux de gestation s'éleva à 60%. Les résultats obtenus sur cette étant plutôt concluant ce qui rejoint des réponses ovulatoires comparables obtenues par plusieurs travaux sur des races locales en Afrique notamment celui de Chicoteau (1989) et Bianchi et al. (1986) avec respectivement 6,5 et 6,9 cj/ vache sur les vaches « Baoulé » ; de Diop et al en 1994 avec 4,5 cj/ vache sur des vaches « N'Dama » et Elaidi et al en 1996 (a et b) avec 7,2 vs 10,5 cj/vache en fonction des doses de produit (32 mg et 40 mg). La viabilité des embryons récoltés s'élevant à 46,66% se rapproche considérablement de la moyenne attendue (50à 60%) ; le nombre d'embryons transférables (2,33) bien qu'inférieur à celui des races améliorées laitières et viandeuses (Donalson, 1984 ; Breuel et al. 1991 ; UNCEIA, 2001 ; Lafri 2002 ; Hasler, 2003), reste cependant similaire à celui obtenu sur la race N'Dama en 1990 par Jordt et Lorenzini (2,2) et inférieur à celui d'Elaidi et al en 1996a avec 3,2 embryons/vache (sur la race Oulmes-Zear).

Conclusion :

A la lumière de ces travaux nous constatons que malgré une réponse ovarienne satisfaisante le taux d'embryons récoltés reste faible lié dans certains cas aux produits utilisés (très faible pour PLUSET par rapport STIMUFOL), et dans d'autre cas à la race des animaux (faible réponse des populations locales par rapport aux races améliorées), mais aussi à la défectuosité du matériel de récolte. Cependant le nombre d'embryons transférables par vache n'a cessé d'augmenter (0 en 2003 à 2,33 en 2008) synonyme d'une amélioration de la maîtrise de la technique.

III.2) Activité de fécondation in vitro en Algérie

En Algérie la fécondation in vitro est encore à l'état embryonnaire ; seulement deux projets de fin d'études ont été réalisés et ce à l'université de Blida.

Le premier en 2006 portait sur la collecte des ovocytes (par ponctions des follicules de grands diamètres puis de petits diamètres) à partir des ovaires prélevés à l'abattoir de Blida (soutenu par KHALLAF M. et BOUKHALA M.) en vue de la fécondation in vitro ; des résultats très satisfaisants avaient été obtenus : sur 56 ovaires prélevés, 726 follicules avaient été ponctionnés et 487 ovocytes récupérés. Le taux de récupération des ovocytes s'élevant à 67,07% avec une moyenne de 8,54 ovocytes par ovaire, résultat comparable à ceux de Shioya et ses collaborateurs en 1988 estimant le taux de récupération des ovocytes à 74,30% ; les travaux de C. Hansen (2004) et ceux de Rivera et al en 2000 avec un taux de récupération des ovocytes compris entre 30 et 60% et une moyenne de 9 à 16 ovocytes par ovaire. La classification des ovocytes récupérés montrait que ; 63,64% étaient des ovocytes de bonne qualité avec une plus grande proportion en ovocytes de classe 2 (243 ovocytes) (figure 7) pouvant donc être mis à la maturation et un pourcentage plus faible (46,46%) d'ovocytes de mauvaise qualité (soit 99 ovocytes de classe 3 et 78 ovocytes de classe 4) (figure7).

Le deuxième travail en 2007 portait sur la maturation des ovocytes récoltés à partir d'ovaires prélevés à l'abattoir (par BOURADA A. et BOUCHAMA N.) ici également, des résultats très concluants avaient été observés : les ovocytes collectés avaient été mis en maturation dans 3 milieux différents (le milieu TCM 1999 ; le milieu MEM et le milieu TCM199 enrichis de d'hCG) les résultats obtenus sur les 23 ovaires collectés montraient 116 ovocytes et 114 mis à maturation ; à l'issue de ce travail, 65 avaient subis la maturation et 49 étaient restés immatures le taux de réussite de 57,02%, se rapproche de celui observé par Bryuère en 2002 (67,81%) mais reste néanmoins inférieur, probablement à cause du manque de facteur d'enrichissement, cette hypothèse se confirme d'ailleurs avec l'addition de l'hCG dans le 3ème milieu de maturation (dans le même travail) avec l'obtention de 21 ovocytes matures sur 33 mis en maturation (taux de réussite de 63,64% plus proche de celui de Bryuère qui est de 67,81%).

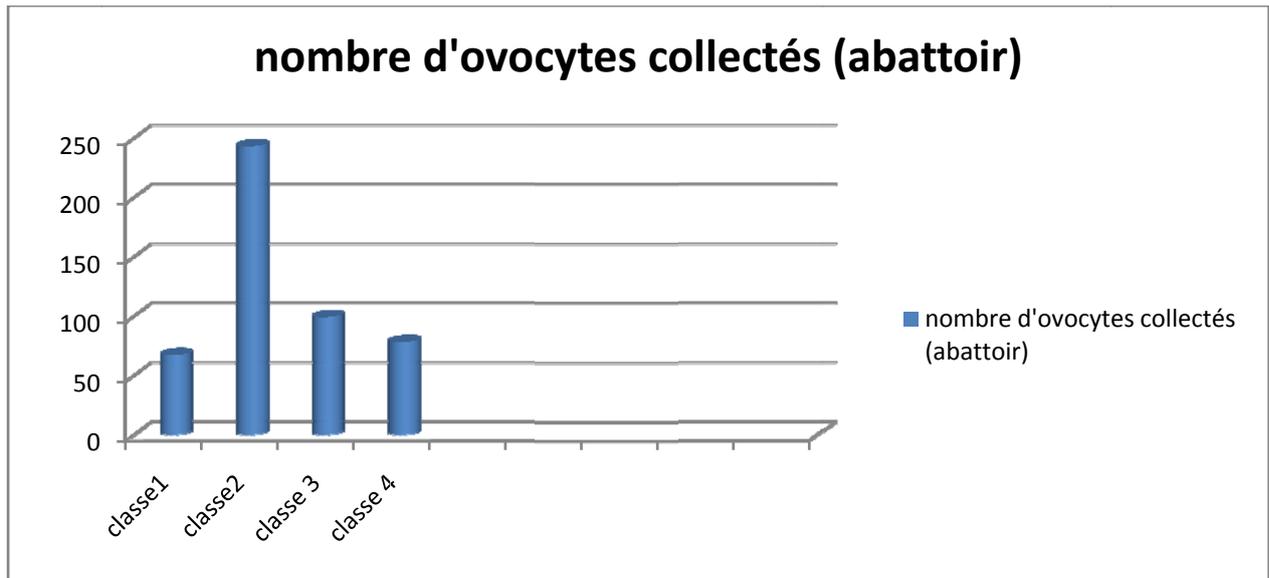


Figure 7 : récolte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoir

PERSPECTIVES :

Les résultats des expérimentations de production d'embryons en Algérie sont encourageants ; cependant il reste un long chemin à parcourir aussi bien pour l'évolution en Afrique que pour l'application de ces biotechnologies dans le territoire algérien.

Dans cette optique, au niveau national, le Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (CNIAAG) prévoit le lancement d'un programme de transfert embryonnaire en Algérie par :

- La création de 03 centres de transfert embryonnaire dans des régions différentes et de 02 laboratoires mobiles de production d'embryons.
- La formation des vétérinaires dans le domaine de transplantation d'embryons.
- La transplantation des embryons congelés importés à haut potentiel génétique sexés femelle qui seront utilisés plutard comme donneuses d'élite.

PARTIE PRATIQUE

INTRODUCTION

La réussite du transfert embryonnaire dépend de plusieurs facteurs tels la race de l'animal, son âge, l'état de ses ovaires, la saison, les extraits hypophysaires utilisés mais aussi des capacités du manipulateur (maîtrise de la technique). Dans le cadre de notre travail nous avons assisté à plusieurs protocoles de transfert embryonnaires effectués par le Dr Adel D. à

la ferme EZZEGHAIMI à Chiffa dans le cadre de sa thèse de doctorat ensuite, nous avons fait des simulations de récolte et de transfert sur une vache dans la station expérimentale de l'université de Blida (faculté des sciences vétérinaire) afin de pouvoir nous initier à la technique.

I) PROTOCOLE DE RECOLTE D'EMBRYONS :

I.1) Matériel (figure

- Animal : vache de 3 ans pie rouge de race Holstein. son état d'embonpoint étant de 3, la vache était vide, son alimentation faite à base de fourrage et de concentré.
- STIMUFOL : Produit fabriqué par l'Université de Liège utilisé pour le traitement de superovulation chez les bovins, présenté sous forme LYOPHILISAT injectable contenant 40% de LHp et 60% de FSHp purifiées.
- Matériel de récolte et transfert:
 - Sonde avec mandrin métallique (*sonde de folley*) à deux voies ; une pour gonfler le ballonnet situé à 5cm de l'extrémité et une voie d'injection et de récupération du liquide de lavage des cornes utérines.
 - Une seringue de 50ml qui sert à administrer et récupérer le liquide de lavage de la corne utérine.
 - milieu physiologique tamponné au phosphate (PBS) avec un PH de 7.5 et une osmolarité de 290
 - prostaglandine (2ml) et xylocaïne à 2%
 - Une bouteille stérile d'un litre permettant de contenir le liquide de lavage.
 - Un microscope optique pour la mise en évidence des embryons.
 - une boîte de pétrie quadrillée
 - une micropipette montée sur une seringue à insuline qui permet la manipulation des embryons.
 - un pistolet de transfert de type cassou.



(Figure 8 : matériels de récolte)

I.2) Technique

Nous avons effectué la récolte comme suit :

- Exploration rectale de l'ovaire droit et gauche et estimation du nombre d'embryons à récolter



- Injection de 5ml de xylocaïne à 2% en épidural



- Introduction de la sonde protégée par une chemise sanitaire à 45° vers le haut pour éviter le méat urinaire puis on enlève la chemise sanitaire, on pénètre le col puis, on se dirige avec la sonde d'abord vers la corne droite car c'est la plus facile.



- A l'entrée de la corne, le mandrin est légèrement retiré et la sonde poussée progressivement jusqu'à quelques cm de la bifurcation. Le ballonnet est ensuite gonflé (10-15 ml d'air) puis, le mandrin totalement retiré.



- Le rinçage de la corne droite se fait avec des volumes croissants de PBS [2x20ml ; 2x40ml ; 1x50ml et 1x (20ml de PBS + 30ml d'air)]. Le liquide est aspiré après chaque injection puis versé dans un flacon en verre (séparément pour chaque corne) et plongé dans un bain marie à 37°C.



- Une fois l'opération terminée au niveau de la corne droite, le mandrin est remis, le ballonnet dégonflé, la sonde légèrement retirée et placée à l'entrée de la corne gauche. L'opération est répétée de la même manière qu'avec la corne droite.
- une fois le rinçage des deux cornes terminé, on dégonfle le ballonnet, on retire la sonde, on injecte un antibiotique en intra utérine et 2ml de prostaglandine en intramusculaire.
- les flacons sont ensuite ramenés au laboratoire, on les laisse décanter ensuite, on élimine le surnageant (100ml de liquide est gardé). Le liquide restant est transvasé dans des boîtes de pétrie quadrillées et on commence la recherche des embryons au microscope. Ces derniers seront classés en fonction de leur morphologie puis mis

dans des milieux nutritifs avant de décider de leur devenir (transfert ou congélation).

II) MISE EN PLACE DES EMBRYONS.

Le transfert a été réalisé par la méthode cervicale selon le protocole suivant :

- La receveuse est placée dans un endroit propre pas trop éloigné du lieu de préparation de l'embryon
- On vidange le rectum, puis on nettoie bien la région vulvaire avec une serviette humide et propre.
- Telle l'insémination artificielle, on fait passer l'inovulateur (contenant à son extrémité cervicale la paillette portant le blastocyste) muni d'une gaine à travers les voies génitales externes de la femelle jusqu'à la portion antérieure de la corne ipsilatérale à l'ovaire portant le corps jaune.



- L'embryon est alors posé et l'applicateur retiré avec délicatesse (ces manipulations doivent être douces et aussi réduites que possible pour éviter tous risques traumatiques) ;
- Enfin on place la femelle dans un endroit calme ; on doit veiller à ce qu'elle soit bien alimentée et régulièrement surveillée afin de détecter un éventuel retour en chaleur.

CONCLUSION :

Des progrès énormes ont été réalisés en matière de production de viande et de lait grâce à l'introduction et à la généralisation de l'insémination artificielle qui a permis l'amélioration des productions par la génétique. Mais cette technique n'apporte génétiquement que l'effet mâle ; cet handicap peut être contourné par l'utilisation du transfert embryonnaire qui lui, permet d'apporter la génétique à la fois mâle et femelle.

Cependant, cette technique reste relativement plus difficile à mettre en œuvre ceci par rapport aux méthodes et aux conditions à mettre en œuvre pour sa réussite (Choix des donneuses, superovulation, insémination artificielle récolte et classification des embryons, choix des receveuses et mise en place de l'embryon).

PERSPECTIVES:

- La formation des gens qui auront à la pratiquer.
- La création des centres de transfert et des laboratoires de production d'embryons.
- La disponibilité du matériel et le bon choix des produits utilisés (produits de superovulation et d'insémination artificielle).
- La sensibilisation des éleveurs sur l'importance de ces biotechnologies en vue de leur mise en place puis leur vulgarisation sur le territoire.
- La multiplication des travaux à l'échelle universitaire en matière de production d'embryons.

Référence

1. Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H., 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 57-66. Arav A. 1998. Method for cryopreservation of biological samples, US Patent, 5, 715, 686.
2. Adel D. 2006; etude comparative des traitements de superovulation entre le PLUSET et le STIMUFOL. thèse de magistère Université de saad DAHAB Blida
3. AMARA M. 2003 ; Etude des réponses du traitement de superovulation chez la vache en vue du transfert embryonnaire. Thèse de magistère Université Saad DAHAB Blida 163 pages
4. Baril G., Cognie Y., Pougard J.L., Leboeuf B., Traldi A.L., Guignot F., Beckers J.F., Mermillod P., 2001a. Amélioration des méthodes de cryoconservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Renc. Rech. Rum.*, 8, 365-368.
5. Baril G., Traldi A.L., Cognie Y., Leboeuf B., Beckers J.F., Mermillod P., 2001b. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56, 299-305.
6. Berthelot F., Martinat-Botté F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M., 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology*, 41, 116-124.
7. Berthelot F., Martinat-Botté F., Perreau C., Terqui M., 2001. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod. Dev.*, 41, 267-272.
8. Berthelot F., Martinat-Botté F., Perreau C., Locatelli A., Manceau P., Venturi E., Terqui M., 2002. The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30 % of cryopreserved blastocysts and their birth as live piglets. *Pig News Inf.*, 23, 103-108.
9. Branca A., Gallus M., Dattena M., Cappai P., 2000. Preliminary study of vitrification of goats embryos at different stage of development. 7th International Conference on Goats, Tours- Poitiers, France, 1032. Chemineau P., Procureur R., Cognie Y., Lefèvre P.C., Locatelli A., Chupin D., 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology*, 26, 279-290.
10. Bols PEJ, de Kruif A 1998, 67,45-52: Bovine oocyte retrieval : which follicles to puncture. *VI.Diergeneesk.Tijdsch.*,
11. BOURADA A. et BOUCHAMA N. 2008 : Maturation ovocytaire en vue de la fécondation in vitro chez la vache. *Projet de fin d'étude* 52 pages.
12. Charles Thibault Marie-claire Levasseur 2001: La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA édition 1000 pages.
13. Chicoteau P (1989). Adaptation physiologique de la fonction sexuelle des bovins Baoulé en milieu tropical soudanien. Thèse de doctorat, université de paris créteil.
14. Chicoteau P (1987). Perspectives et réalité du transfert embryonnaire.
15. Chicoteau P (1991). La reproduction des bovins tropicaux. *Rec Med vét.* 167: 241-247.
16. Chupin D, Procureur R (1983). La stimulation de l'ovaire pour produire des embryons chez les bovins. In Saumande. J Superovulation chez les bovins. *Actualités et perspectives.* AETE (1997).

17. Chupin D (1988). Superovulation PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Colloque socio fr. Etude de la fertilité. In : Combarous.Y et Volland-Nail (1997) les gonadotrophines INRA., Paris. pp. 213-232.
18. Critofori F, Quaranta G, Sidibé M, Mattoni M, Trucchi G, Belemsaga D (2001). Essais de production et de collecte d'embryons chez la vache Somba. Revue Elev. Med. Vét. Pays. Trop. 54: 263-268.
19. Cognie Y., Poulin N., Baril G., Guignot F., Beckers J.F., Mermillod P., 2001. Embryo survival after transfer of *in vitro* and *in vivo* produced goat embryos. 17e Colloque Scientifique de l'AETE, Lyon, 110. Crosier A.E., Farin P.W., Dykstra M.J., Alexander J.E., Farin C.E., 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. Biol. Reprod., 62, 1677-1684.
- 21 cours Prof. Ch. Hanzen Année 2008-2009 et 2009-2010 : La production d'embryons *in vitro* chez la vache.
- 22 Crosier A.E., Farin P.W., Dykstra M.J., Alexander J.E., Farin C.E., 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. Biol. Reprod., 64, 1375-1385.
- 23 Czlonkowska M., Boyle M.S., Allen WR., 1985. Deep freezing of horse embryos. J. Reprod. Fertil., 75, 485-490.
- 24 Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG (2000). The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in super ovulated cows. J. Anim. Sci. 78: 2081-2085.
- 25 Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., Cappai P., 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. Theriogenology, 53, 1511-1519.
- 26 Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., Cappai P., 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts *in vitro* produced and *in vivo* derived. Theriogenology, 62, 481-493
- 27 Devos N., 2004. Des porcelets issus d'embryons congelés sont nés pour la première fois en France. La Semaine Vétérinaire, 1152, 54.
- 28 Dinnyes A., Carolan C., Lonergan P., Massip A., Mermillod P., 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. Theriogenology, 46, 1425-1439.
- 29 Diop PEH, Fall R, Mbaye M, Faye L (1994). Le transfert embryons en milieu villageois sénégalais. Dakar Médical. 39:135-375.
- 30 Dobrinsky J.R., Pursel V.G., Long C.R., Johnson L.A., 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol. Reprod., 62, 564- 570.
- 31 Donaldson LE, Ward DN (1985). Super ovulation in cattle: Dose-Response to FSH-W with and without LH contamination. Theriogenology. p. 189.
- 32 Donaldson LE (1984). Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. Theriogenology. 21 :1013-1018.
- 33 DORIS PELLERIN; OCTOBER 2003; évaluation technico-économique de la Fécondation *in vitro* ; conférence symposium sur les bovins laitiers ; CRAAQ.
- 34 El-Gayar M., Holm P., Holtz W., 2001. Successful transfer of vitrified goat blastocysts with the open pulled straw (OPS). Theriogenology, 55, 305. Enright B.P., Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Ward F.A., Yang X., Boland M.P., 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo* : implication for early embryo development and quality. Theriogenology, 54, 259-673.
- 35 Elaidi L, Ectors F, Lakhdissi H (1996a). Effet de différents traitements sur la réponse à la superovulation chez la race bovine « Oulmez Zaer ». «Reproduction et production

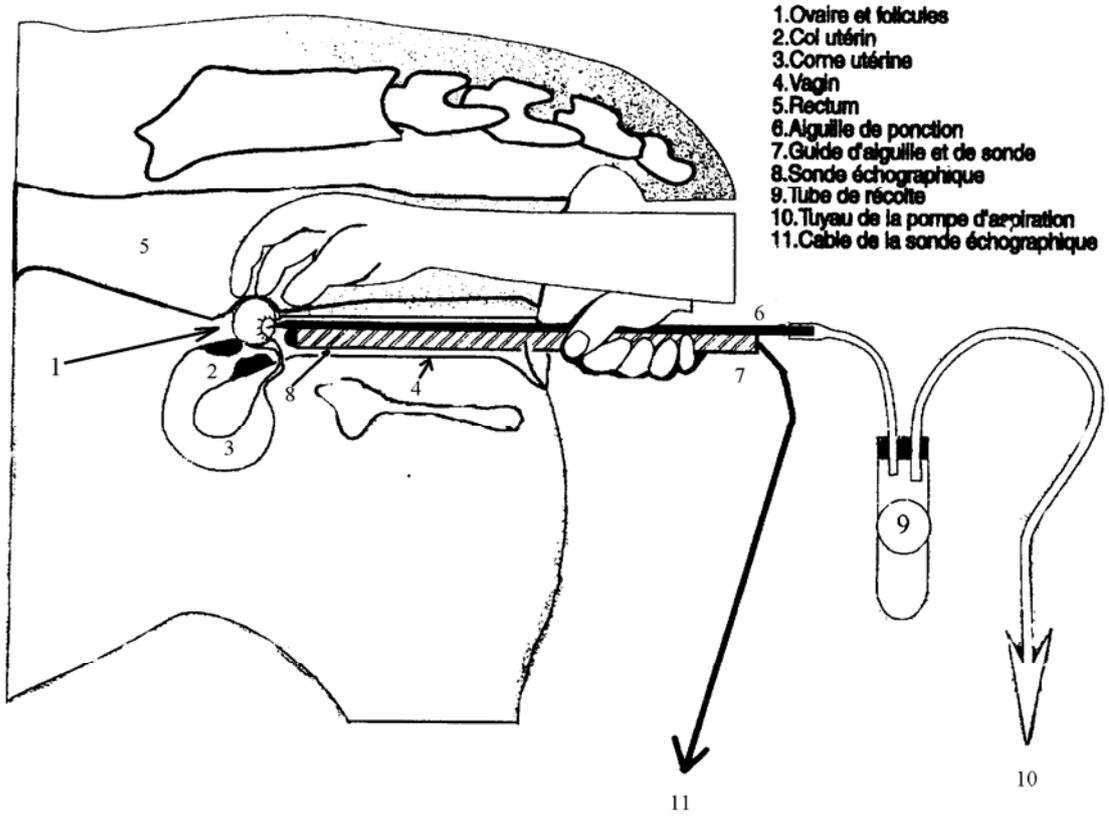
- laitière». III^{ème} Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Animales de l'AUPELF –UREF. pp.295-299.
- 36 Elaidi L, Ectors F, Lakhdi H (1996b). Premiers résultats de transplantation embryonnaire chez la race bovine « Oulmez-Zaer ». «Reproduction et production laitière». III^{ème} Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Animales de l'AUPELF-UREF. pp. 301-304.
- 37 Elsdon RP, Nelson LD, Seidel GRJr (1978). Super ovulation of cow with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 9:17-26.
- 38 Evans G., Faul A., Bielanski A., Renwick S., Van Derlinden I., 1997. Risk analysis and international trade principles applied to the importation into Canada of caprine embryos from South Africa. *Rev. Sci. Tech.*, 16, 265-270.
- 39 Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P., 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation : effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.*, 58, 186-195.
- 40 Ferguson E.M., Leese H.J., 1999. Triglycerides content of bovine oocytes and oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 116, 373-378.
- 41 Ferrouk Mustapha, Gharbi Ismail, Adel Djallal, Lafri Mohamed, Touati Kamel, Kaidi Rachid and Djamel Guetarni; 2008: Production and transfer of embryos in Algerian "Cheurfa" bovine breed; *African Journal of Agricultural Research* Vol. 3 (4), pp. 320-323, April, 2008 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJAR> ISSN 1991-637X © 2008 Academic Journals
- 42 Feugang J.M., de Roover R., Moens A., Leonard S., Dessy F., Donnay I., 2004. Addition of β -mercapoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, 61, 71-90.
- 43 Géraldine BRUYERE ; 2002 : Maturation ovocytaire in vitro chez la vache ; thèse pour l'obtention du grade de Docteur vétérinaire ; Ecole National vétérinaire de Lyon.
- 44 Han M.S., Niwa K., Kasai M., 2003. Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, 59, 1851-1863.
- 45 Hanzen Ch., Goffin L. 1998, 142,81-91 : Application de l'échographie à la ponction des follicules ovariens. *Ann.Méd.Vét.*
- 46 Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.O., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43, 141-152.
- 47 Hasler J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415.
- 48 Hochi S., Fujimoto T., Oguri N., 1995. Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 113-117.
- 49 Holm P., Petersen B.A., Hepburn J., Krogh K., Dagnaes-Hansen F., Callensen H., 1999. Transfer of Angora goat embryos imported into Denmark from New Zealand under quarantine conditions. *Theriogenology*, 33, 251.
- 50 Hoshi H., 2003. *In vitro* bovine embryos and their application in embryo transfer. *Theriogenology*, 59, 675-685. Huhtinen M., Lagneaux D., Koskinen E., Palmer E., 1997. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. *Equine Vet. J. suppl.*, 25, 94-97.
- 51 I. Gordon 2003: Laboratory production of cattle embryos. 2nd édition. Professor Emeritus department of animal Science and production, University Collège DUBLING Ireland. CABI Publishing 500 pages.

- 52 Isachenko V., Folch J., Isachenko E., Nawroth F., Krivokharchenko A., Vajta G., Dattena M., Alabart J.L., 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using identical protocol. *Theriogenology*, 60, 445-452.
- 53 Iwasaki S., Yoshida N., Ushijima H., Watanabe S., Nakahara T., 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 279-284.
- 54 J.J COLLEAU, Y. HEYMAN, J.P RENARD, 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. INRA , *Prod. Anim.*, 1998, 11 (1), 41-56.
- 55 Khurana N.K., Niemann H., 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 62, 847-856.
- 56 KAIDI N. ; 2006 ; contribution à l'étude du transfert embryonnaire chez la vache laitière. Projet de fin d'étude école Nationale vétérinaire 91 pages
- 57 KHELLAF M. et BOUKHALFA M. ; 2006 : Récolte des ovocytes de bovins après abattage. Projet de fin d'étude 72 pages
- 58 Lascombes F.A., Pashen R.L., 2000. Results from embryo freezing and post ovulation breeding in a commercial embryo transfer programme. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*. Havemeyer Foundation Monogr ser., 3, 95-96.
- 59 M. Plachot ; La maturation *in vitro* www.lesjta.com.
- 60 Peters 1992 28 415-421: RM in *Animal Reproduction Science*.
- 61 Michel THIBIER– Chairperson; 2001: The animal embryo transfer industry in figures; a report from the IETS Data Retrieval Committee.
- 62 Michel THIBIER – Chairperson; 2002: a contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry -A report from the IETS Data Retrieval Committee
- 63 Michel THIBIER – Chairperson; 2003: Data Retrieval Committee Annual Report – more than half a million bovine embryos transferred in 2002 -A report from the IETS Data Retrieval Committee
- 64 Michel THIBIER – Chairperson; 2004 : Data Retrieval Committee Annual Report Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos cattle but significant increase of *in vitro* Bovine produced embryos in some part of the world.
- 65 Michel THIBIER – Chairperson; 2005: Data Retrieval Committee Annual Report - Year 2004 significant increase in transfert of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle and contrasted trends in other.
- 66 Michel THIBIER – Chairperson IETS Newsletter, 2006, 24, (4). : Data Retrieval Committee Annual Report : Transfers of Both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005.
- 67 R De Roover, JMN Feugang, PEJ Bols, G Genicot and Ch Hanzen; 2008 : Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *In Vitro* Embryo Production
- 68 S. PETYIM, R. BAËGE, M. FORSBERG, H. RODRIÁGUEZ-MARTIÁNEZ and B. LARSSON; 2000: The Effect of Repeated Follicular Puncture on Ovarian Function in Dairy Heifers. *J. Vet. Med.*
- 69 V. S. Suthar and R. G. Shah; 2009 : Bovin *in vitro* embryos production : An overview. *Veterinary word* vol 2

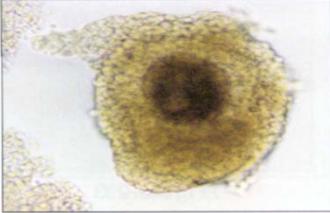
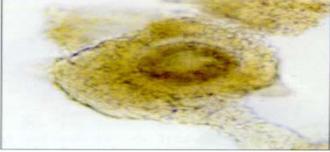
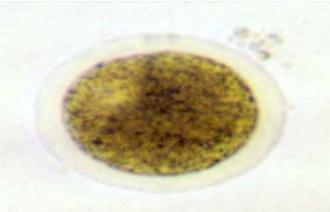
Annexe 4 : ovaires prélevés à l'abattoir



Annexe 5 : Ovum pick up



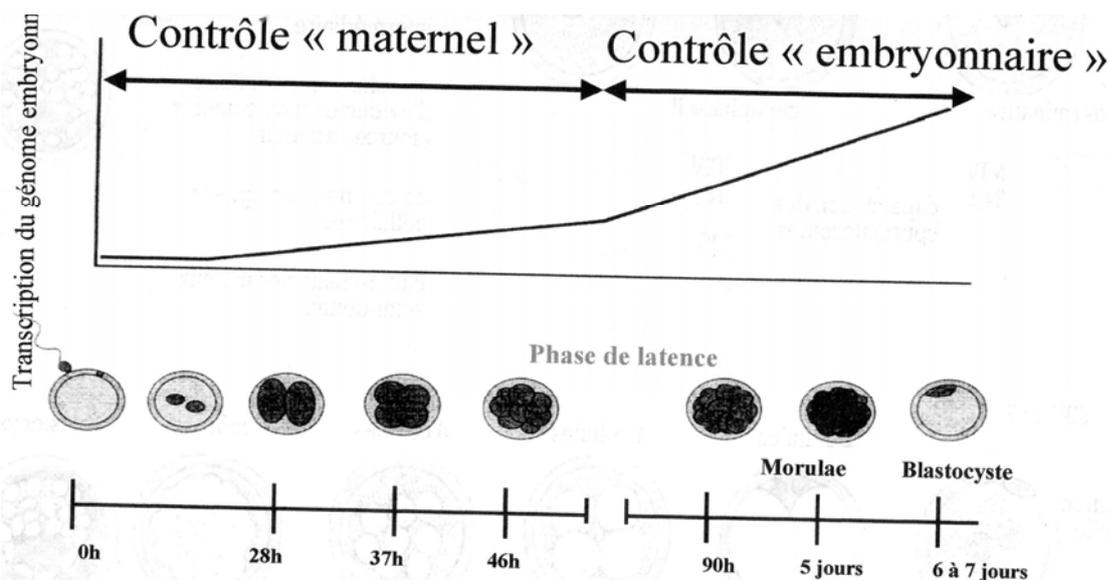
Annexe 6 : Classification des ovocytes

embryons	classe
	Classe 1 <ul style="list-style-type: none">• Aspect transparent du COC• Cumulus compact• Ooplasme homogène
	Classe 2 <ul style="list-style-type: none">• COC et cumulus idem• Ooplasme plus irrégulier
	Classe 3 <ul style="list-style-type: none">• cumulus moins compact• ooplasme sombre et plus irrégulier
	Classe 4 <ul style="list-style-type: none">• Cumulus expansé voire absent (naked oocytes)

Annexe 7 : fécondation in vitro



Annexe 8 : Multiplication de l'embryons



Annexe 9 : Les différents cryoprotecteurs pénétrants et leurs propriétés physico-chimiques

Cryoprotecteur	Nature moléculaire	Mécanisme d'action	Vitesse de pénétration	toxicité
Ethylène glycol	Dialcool organique	Très miscible avec l'eau. grande stabilité à l'état amorphe, vitesse critique élevée	Très rapide chez l'embryon	+ à +++ en fonction du tissu
1,2 Propanediol (PROH)		Très stable à l'état amorphe	rapide	
Dimethyl sulfoxyde (DMSO)	Solvant des corps gras	Interaction avec l'eau d'hydratation de macromolécules cellulaires : déshydratation partielle, formation de microcristaux	Rapide (passif)	++
Glycérol	Trialcool	Fixation de l'eau et augmentation de la résistance membranaire	Rapide(moins que les 03 précédents)	

Annexe 10: Montage des embryons en paill

ette avant refroidissement

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

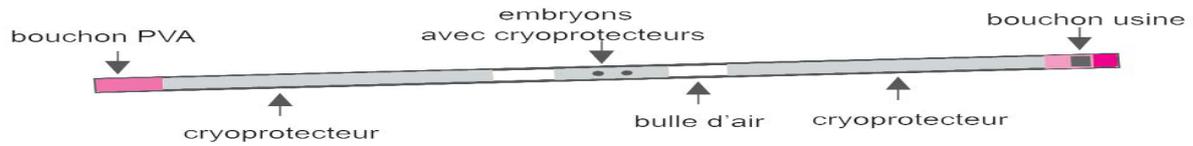


Fig 1.b **Vitrification** (paillette de 0,25 mL) ou **Congélation lente** avec transfert direct

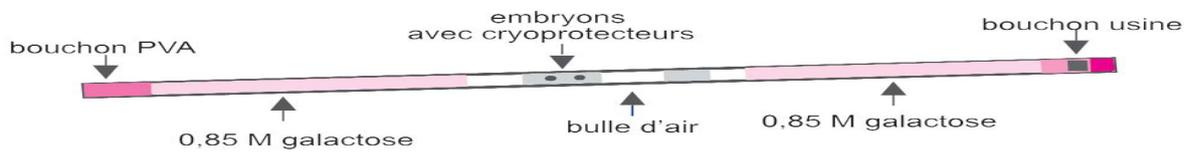
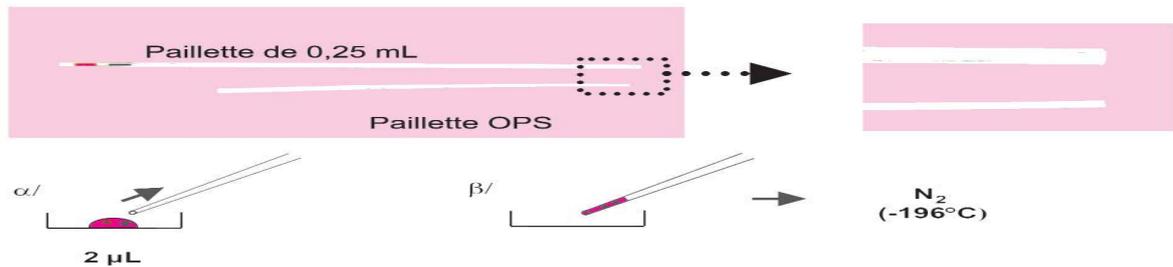


Fig 1.c **OPS** (paillette de 0,25 mL)

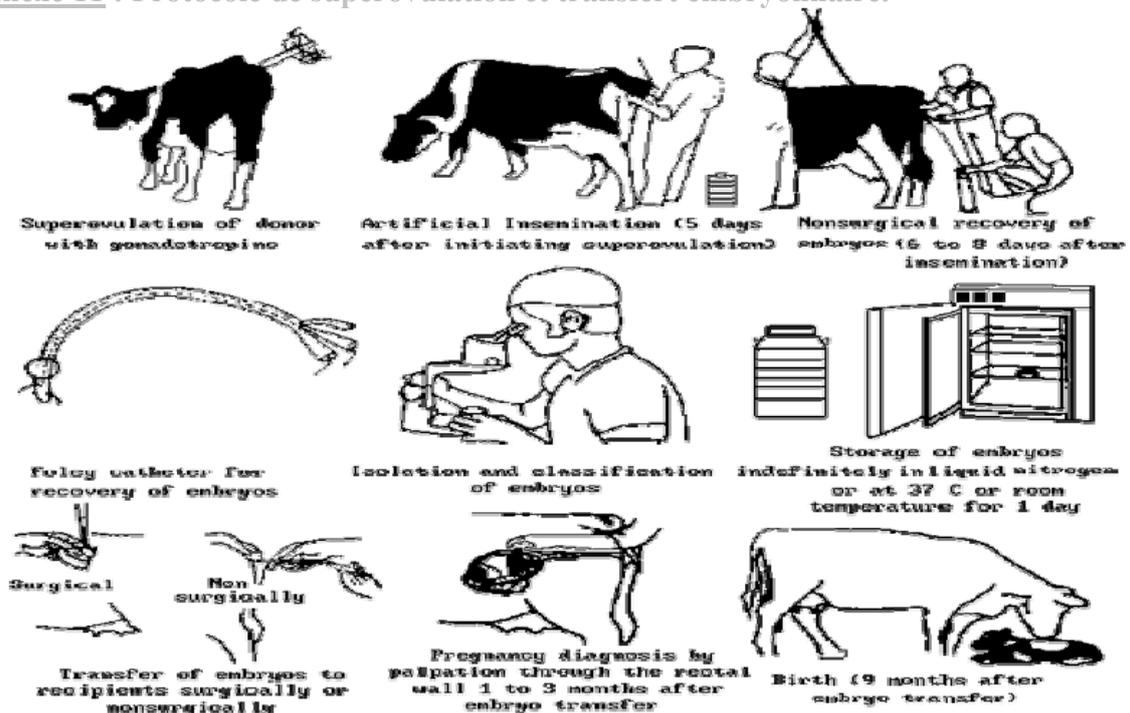


PVA : Polyvinylalcohol ; OPS : open pulled straw ; N₂ : azote liquide.

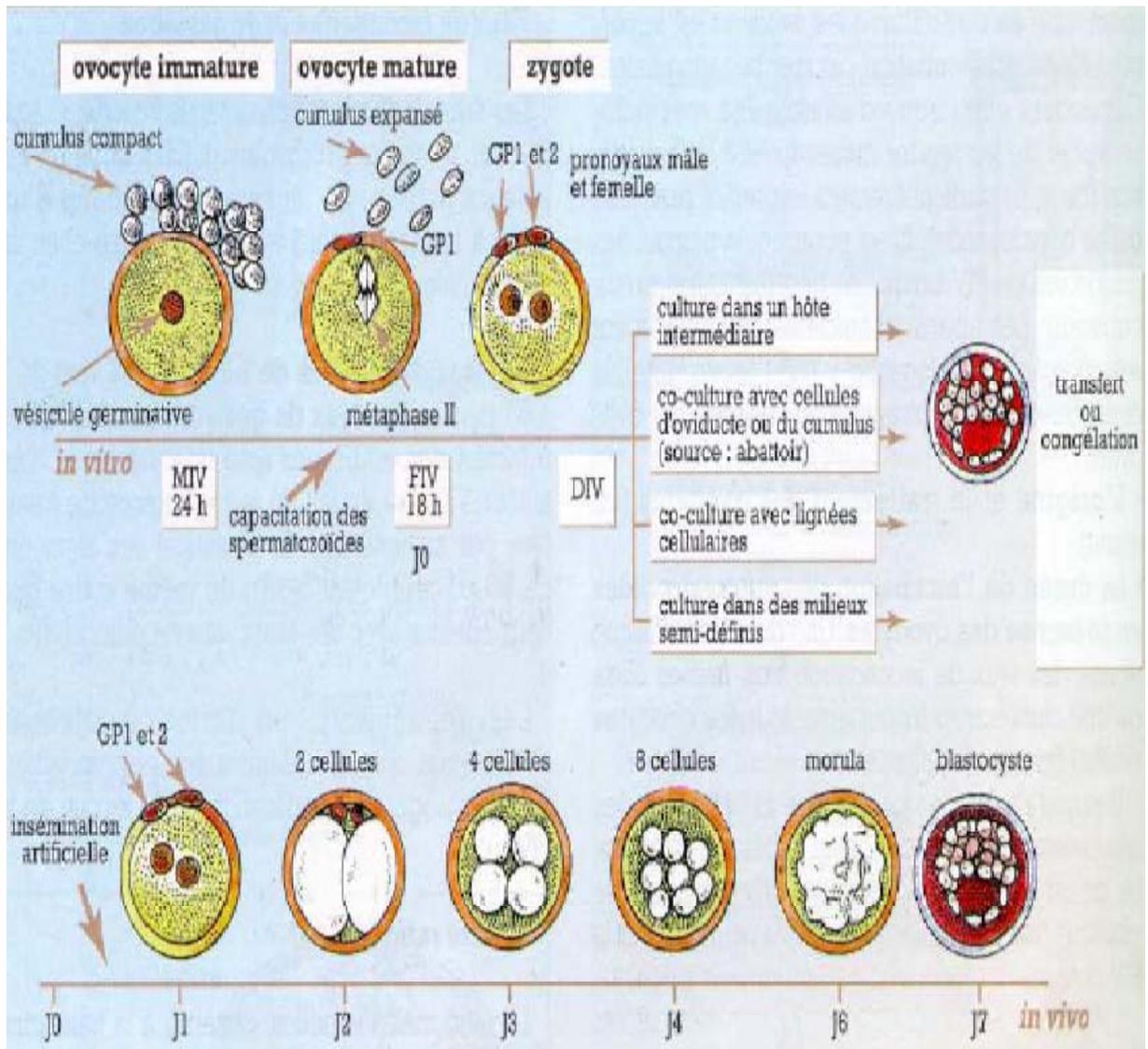
α/ : Une goutte de 2µl de cryoprotecteurs avec les embryons est déposée au fond d'une boîte.

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

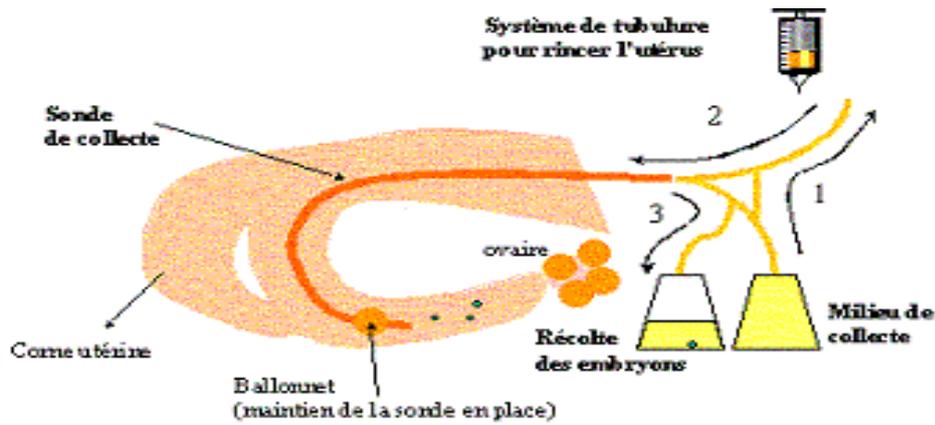
Annexe 11 : Protocole de superovulation et transfert embryonnaire.



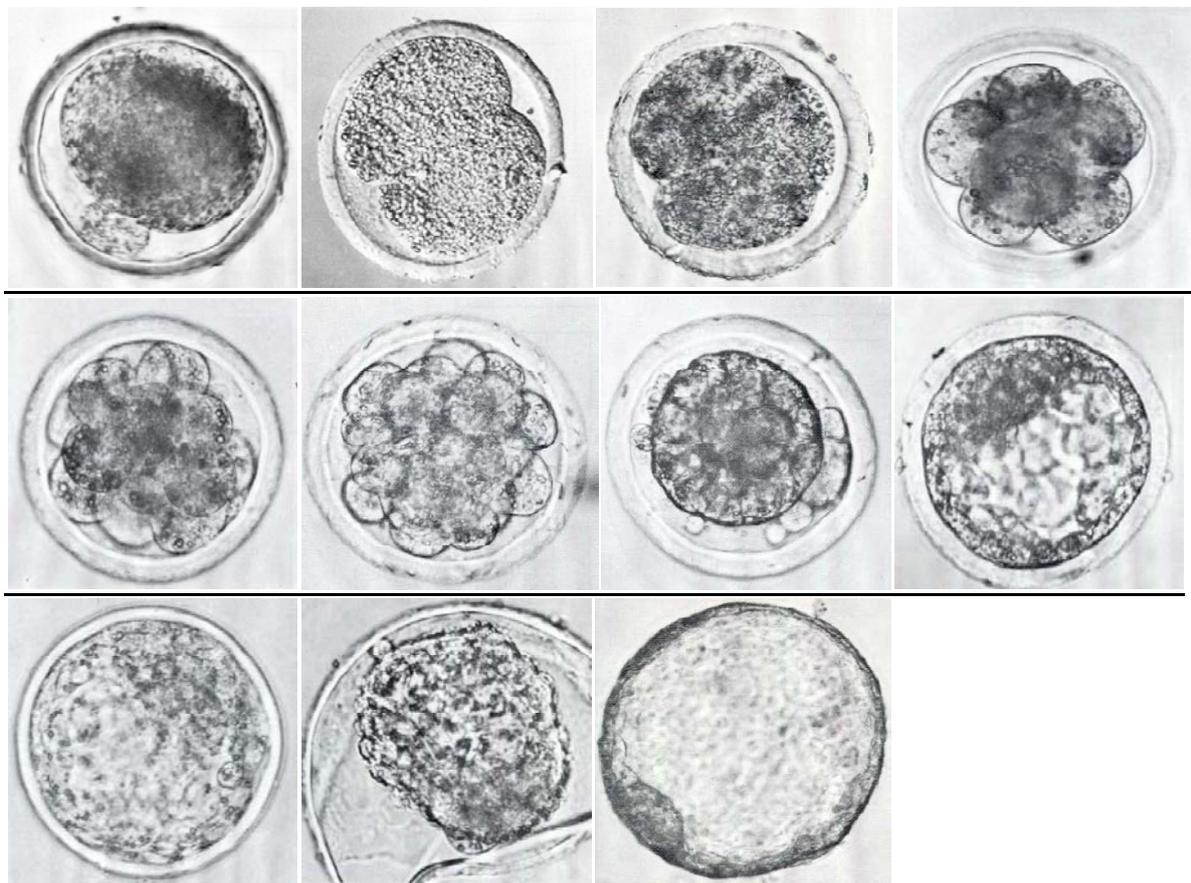
Annexe 12 : Production in vivo et in vitro d'embryons



Annexe 2: récolte des embryons



Annexe 3: Chronologie du développement embryonnaire (J0 à J9) In Winterberger - Torres et Sevellec 1987



Résumé

L'amélioration de la qualité d'un cheptel pour un bon rendement passe impérativement par la sélection génétique des meilleurs reproducteurs (reproductrices) et ceci grâce aux biotechnologies telle que le Transfert embryonnaire.

Afin d'évaluer la situation actuelle de l'Algérie en matière de production d'embryons bovin et nous initier à ces biotechnologies, nous avons fait la synthèse de tous les travaux relatifs à la production d'embryon bovin en Algérie et nous avons assisté à des protocoles de transfert embryonnaire chez la vache laitière.

Il en découle qu'en Algérie, le transfert embryonnaire n'est qu'à l'état expérimental et les travaux effectués ont donné des résultats encourageants mais d'autres travaux dans ce domaine sont encore nécessaires pour mieux maîtriser la technique et la mettre en place dans les élevages.

Abstract

Amelioration of a livestock's quality for a good productivity essentially needs the genetics selection of the finest breeder. And this has to be done from biotechnology like embryos transfer.

The aim of our study was to evaluate the current situation of the cattle (bovin) embryos production activity in Algeria and initiate us on these biotechnologies. Therefore, we have assisted on more embryos transfer protocol in dairy cow and resumed their activity in Algeria.

It follows that, in this part of the word, embryos transfer activity is on an experimental state and the work about has given a promising result. But more work will be necessary to have better manipulation before initiate it in farm animal.

المخلص

إن تحسين نوعية قطيع لتحقيق مردود جيد يجب أن يمر بصفة حتمية بالانتقاء الوراثي للجينات, و هذا بفضل البيوتكنولوجيا كنقل الأجنة .
و لتقييم حالة الجزائر من حيث إنتاج الأجنة, حضرنا مجموعة بروتوكولات للنقل الجنيني و قمنا بجمع و تركيب كل الأعمال المنجزة لحد الآن.
المستخلص أن النقل الجنيني في الجزائر يعد في مرحلة تجريبية و كل الأعمال المقدمة في هذا المجال أعطت نتائج مشجعة. لكن أعمال أخرى تبقى ضرورية في هذا المجال للتحكم في التقنية و لاستخدامها في منهج تربية الأبقار.