

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE-ALGER

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة-الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

Technique du transfert embryonnaire
in vivo chez la vache

Présenté par : RAMDANI Nacira

ZEDEK Rafika

Soutenu le : 07 /07/2011

Devant le jury composé de :

Président : Mr LAMARA A, maitre de conférences classe B à l'ENSV

Promoteur : Mr. Khelef D, maitre de conférences classe A à l'ENSV

Examineur: Mr. SOUAMES S, maitre assistant classe A à l'ENSV

Examineur : Mr BOUDJELLABA S , maitre assistant classe B à l'ENSV

Remerciements

Nous remercions en premier lieu Allah tout puissant de nous avoir accordé la puissance et la volonté pour terminer ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs

Personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nous adressons nos respectueux remerciements à :

- ◆ *Au docteur **KHELEF Djamal**, maitre de conférence à l'ENSV, pour la direction de ce mémoire et pour son aide précieux, ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité, nous lui disons **merci** beaucoup.*
- ◆ *Au docteur **LAMARA Ali**, maitre de Conférence à l'ENSV , d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*
- ◆ *Au docteur **SOUAMES Samir**, maitre assistant à l'ENSV, d'avoir accepté de juger ce travail.*
- ◆ *Au docteur **BOUDJELLABA Sofiane**, maitre assistant à l'ENSV, d'avoir accepté de juger ce travail.*
- ◆ *Nos remerciements les plus empressés s'adressent aux cadres qui nous ont aidés, nous citons :*

*Monsieur **KAIDI**, professeur en reproduction,*

*Monsieur **ADEL**, docteur en science vétérinaire,*

*et Monsieur **BOUDJAKJI**, directeur adjoint du CNIAAG .*

DÉDICACE :

Je dédie ce travail :

A mes parents :

Pour leur grand amour inconditionnel, leur soutien et leur encouragement incessants

Pour leur confiance, leur présence .je vous dis merci, merci et merci.

yumi : aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de fournir depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

MES PARENTS, PUISSE ALLAH, LE TOUT PUISSANT, VOUS PRÉSERVER ET VOUS ACCORDER SANTÉ, LONGUE VIE ET BONHEUR.

A mon grand frère CHOUAIB : tu étais un père, tu nous avais toujours inclus.

Que les miséricordes de Allah tout puissant soient sur toi.

A mon frère DJAFER : tu es le frère que toutes les sœurs souhaitent.

A ma grande sœur AZIZA :Tu es la seule qui sait toujours me remonter le moral .

A mes adorables et aimables petites sœurs :SOUMAIA ,HANAA ET DADA , avec vous je trouve le vrai bonheur.

A mon petit frère HICHEM :Tu as toujours attendu mon bus, tu étais toujours là.

A mon oncle ALI : pour le soutien, le respect et l'amour que tu as porté pour moi.

A mes grands parents : Baba et Dada pour leur soutien et leurs encouragements, vous m'avez toujours apprécié.

A mon binôme RAFIKA : avec ta volonté et ta vivacité qu'on a pu réaliser ce travail.

A mes amies Fatma , Hanane et Asma ;Abir ,Khaira et Awatef de Oued souf.

Au groupe 9,et surtout Manel et Amel.

A mes collègues de promotion 2011

"NACIRA"

DÉDICACE :

Je dédie ce modeste travail :

*A mes très chers parents **mama et papa** :*

*QUI PAR LEUR PRIÈRE, LEUR ENCOURAGEMENT ET LEUR CONFIANCE
M'ONT POUSSÉ À PERSÉVÉRER ET À DONNER LE MIEUX DE MOI-
MÊME .QU'ILS TROUVENT ICI LE TÉMOIGNAGE DE MA PROFONDE
GRATITUDE .*

A ma grand-mère Yaya : pour tes sages conseils

A mes très chères sœurs : Akila, Karima, Cherifa , Lila, Salima et Nano

A mes très chers frères : Rabah et Mouh cherif.

A Nacira, mon binôme , qui par son sérieux et son encouragement, j'ai pu surmonter les moments difficiles

Aux quatre nouveaux nés de la famille : Imene , Mahedi, Anis et Safaa.

A toutes mes amies surtout Imene , Asma, Houria et Yasmina .

A tous ceux qui m'ont connue et qui m'ont appréciée.

"RAFIKA"

Abréviations:

BVD : Bovine Diarrhoea Virus

BSA: Bovine Serum Albumin

CJ :Corps jaune

DMSO: DiMethylSulfOxyde

FIV : fécondation in vitro

FSH : Folliculo Stimulating Hormone

GnRH:Gonadotropin Releasing Hormone

IA : Insémination artificielle

IBR : Infectious Bovine Rhinotracheitis

IETS :International embryo transfer society

hMG :human menopausal gonadotrophin

LH: luteinizing hormone

M: mole

OPS :Open pulled straw

OPU : ovum pick up

PBS :Phosphate buffered saline

PGF2 α :Prostaglandine F2 α

pH : potentiel Hydrogène

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotrophin

PVP: Polyvinylpyrrolidone

TE :Transfert embryonnaire

FIGURES ET ANNEXES :

Figure 01 : de traitements hormonaux des donneuses et des receveuses cyclées (DOMINIQUE, 2003)	10
Figure 02 : Schéma de traitements hormonaux des donneuses et des receveuses non cyclées (DOMINIQUE, 2003)	11
Figure 03 : d'une paillette pour un transfert direct (frais)(LEGRAND ,2003)	19
Figure 04: Montage des embryons en paillette de 0,25 ml avant et après refroidissement(transfert direct).(GUIGNOT,2005)	22
Figure 05: Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant de l'éthylène glycol d'après Voelkel et al.(1992a)in (LEGRAND,2003	22
Figure 06 : Montage des embryons en paillette de 0,25 ml avant refroidissement (GUIGNOT, 2005)	23
Figure 07: Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant la solution VSED(d'après Ishimori et al ,1993)in (LEGRAND,2003)	24
Figure 08 : Vitesse de refroidissement des embryons en fonction de la technique de cryoconservation.(GUIGNOT,2005)	25
ANNEXE 01 : Classes des embryons selon l'IETS	
ANNEXE 02 : Les animaux objets du transfert	
ANNEXE 03 : Effectif bovin par catégorie(2007) , ferme LAHIANI	

SOMMAIRE :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale	01
Intérêts du transfert embryonnaire	02
Technique du transfert embryonnaire :	
Chapitre I : <u>Préparation des animaux</u>	04
I. Choix de donneuses.....	04
II. Choix de receveuses.	04
III. Regroupement des receveuses et leur préparation :	05
III.1.Nutrition.....	05
III.1.1.Apport énergétique.....	05
III.1.2.Apport azoté.....	05
III.1.3.Apports minéraux.....	06
III.1.4.Régularité des apports	06
III.2.Environment.....	06
III.3.Critères de santé.....	07
Chapitre II :<u>Synchronisation des chaleurs</u>	08
I. Procédés appliqués	08
II. Détection des chaleurs.....	08
Chapitre III : <u>Superovulation</u>	12
I. Définitions et modes d'action des hormones.	12
II. Protocoles de traitements.....	13
III. Variabilité de la réponse au traitement de superovulation.....	13

Chapitre IV : <u>Insémination</u>	15
I. Introduction.....	15
II. Technique de l'insémination artificielle.....	15
III. Moment de l'insémination.....	15
Chapitre V : <u>Collecte des embryons</u>	17
I. Appréciation de la réponse ovarienne.....	17
II Méthodes de récolte	17
II.1. Récolte par voie chirurgicale.....	17
II.2.Récolte par voie cervicale.....	17
III. Manipulation et classification des embryons.....	18
Chapitre VI : <u>Cryoconservation des embryons</u>	20
I. Principe de la cryoconservation	20
II. Les cryoprotecteurs	20
II.1.Introduction.....	20
II.2.Définition et catégories	20
II.3.Cryoprotecteurs utilisés.....	21
III. Techniques de cryoconservation :	21
III.1.Congélation lente :	21
III.1.1.Incorporation des cryoprotecteurs.....	21
III.1.2.Chargement des embryons dans une paillette de 0,25 ml.....	22
III.1.3.Etapes de refroidissement.....	23
III.2.Vitrification.....	24

III.3. Vitrification rapide (OPS) et ultra rapide.....	25
Chapitre VII : <u>Transplantation des embryons</u>	26
I. Conduite à tenir pré-transfert	26
II. Décongélation des paillettes	26
II.1. Cas du transfert traditionnel.....	26
II.2. Cas du transfert direct (one step)	27
III. Mise en place	27
III.1. Par méthode chirurgicale.....	27
III.2. Par méthode cervicale.....	27
 PARTIE EXPERIMENTALE	
<u>Chapitre I : Matériels et méthodes</u>	28
I. Préparation des receveuses	28
I.1. Sélection des animaux.....	28
I.2. Préparation alimentaire.....	29
I.3. Protocole de synchronisation.....	29
II. Conduite à tenir le jour du transfert.....	29
II.1. Palpation transrectale.....	29
II.2. Anesthésie	30
II.3. Décongélation des paillettes	30
II.4. Transfert proprement dit.....	31
III. Diagnostic et suivi de gestation.....	31
<u>Chapitre II : Résultats et discussion</u>	32
<u>Chapitre III : Conclusion et perspective</u>	33

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

La reproduction est, selon sa définition, la fonction assurant la pérennité des espèces animales par le renouvellement des générations.

Le principal objectif de la reproduction des animaux domestiques est d'assurer le renouvellement des générations dans un but économique déterminé : la production de viande, de lait ou de laine selon les espèces ou les races, cherchant donc à maîtriser au mieux la reproduction, à la fois chez le mâle et la femelle, pour fournir le plus grand nombre de jeunes de la qualité potentielle voulue, au meilleur moment et à moindre coût.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses techniques ont été mises au point et développées dans ce but, débutant par la technique d'induction et de synchronisation de l'œstrus, puis l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire, la gémellité artificielle, le sexage des embryons, la fécondation in vitro, le clonage et la transgénèse.

La 1^{ère} biotechnologie mise au point à partir de matériel embryonnaire a été le transfert embryonnaire. En effet, la première transplantation remonte à 1890. Cette année-là, Le biologiste anglais Heap a obtenu des lapereaux Angora après transplantation sur une lapine de race belge. Ensuite, des études ont été poursuivies par différents chercheurs sur différentes espèces.

Chez les bovins, cette technique a connu un développement rapide et qui consiste à placer un tout jeune embryon d'une origine génétique donnée dans l'utérus d'une autre femelle appelée porteuse et receveuse. Celle ci assurera la gestation jusqu'à son terme. Les embryons pouvant être obtenus soit in vivo après superovulation de la femelle donneuse, soit in vitro après FIV.(BOONES et al,2009)

Vu les intérêts prometteurs de cette technique, essentiellement son impact sur l'amélioration du potentiel génétique du troupeau, donc la production de celui-ci, elle semble être le meilleur outil qui puisse aider à résoudre les problèmes d'infécondité des animaux dans les filières lait et viande en Algérie ; cette technique est encore à l'état expérimental et méconnue par les éleveurs.

L'objectif de notre présent travail s'inscrit dans ce cadre, et il est mené en deux étapes :

- Une partie bibliographique où sera exposée une synthèse sur les avancées en matière de biotechnologies appliquées à la reproduction, particulièrement le transfert d'embryons.
- Une deuxième partie, expérimentale, lors de laquelle, après le choix des receveuses, un protocole de transfert est mis en pratique. Les résultats sont analysés et discutés.

INTERETS DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE

- Le TE chez les bovins constitue un des moyens les plus rapides pour améliorer le potentiel génétique du troupeau car il permet la multiplication de la descendance des meilleures vaches inséminées par les meilleurs taureaux.
- La réduction de l'intervalle entre génération par la récolte des embryons sur des génisses donneuses, âgées de 16 à 18 mois seulement, d'où une accélération de la sélection. (DOMINIQUE ,2001).
- La production de veaux mâles de haute valeur génétique qui seront destinés à l'évaluation sur descendance. (MAZOUZ et al., 1992).
- La conservation d'embryons de races en péril, dans des banques d'embryons (races Bazadaise, Pie-Noire Bretonne, Parthenaise).
- La conservation de descendance de femelles à haut potentiel génétique, mais que l'on ne peut conserver pour des raisons sanitaires (brucellose).(DOMINIQUE ,2001)
- Le TE a permis une véritable révolution dans les échanges internationaux de génétique par une adaptation harmonieuse du veau à l'environnement du pays importateur grâce à la protection apportée par les anticorps de la porteuse pendant la période périnatale .(BONNES et al.,2009) .Ainsi le bénéfice d'une absence de risques sanitaires, car un embryon âgé de six à sept jours, est protégé par son enveloppe pellucide, véritable barrière infranchissable pour les agents infectieux. De ce fait, les contraintes de la quarantaine, de ses difficultés administratives sont maintenant abolies grâce à cette technologie de transfert génétique. Aussi par la baisse de prix du transport et l'absence des difficultés logistiques du déplacement des milliers d'embryons au lieu de dizaines de bovins vivants.(AVFRATE).
- La maîtrise de la transplantation, de la conservation, puis la culture in vitro des embryons a ouvert la voie à toute une série de manipulations, telles que la fécondation in vitro, le clonage et le sexage des embryons, ou le transfert des gènes.(INRA).

CHAPITRE I : PREPARATION DES ANIMAUX

I. CHOIX DES DONNEUSES :

-Le choix est basé sur des critères d'ascendance, du potentiel génétique et de conformation, en plus des exigences de l'intégrité du tractus génital et de la régularité de la reproduction.(LAKHDISSI et al,1993).

-L'âge : LAMOTHE signale que plus la donneuse avance en âge, plus la réponse à la superovulation est erratique et il conseille une tranche d'âge entre 5 et 10 ans. Le même auteur remarque que du fait de l'apport d'hormones exogènes, la donneuse de plus de 10 ans présente des manifestations secondaires à la superovulation, notamment des infections : mammites, arthrites pour l'essentiel.

-L'état sanitaire : l'état sanitaire de la donneuse conditionne certainement en grande partie non seulement le nombre d'embryons récupérés, mais aussi la qualité des embryons. Sur le plan général, la donneuse devra être indemne de toute maladie susceptible d'être transmise à l'embryon (tuberculose et surtout brucellose). (OUATTARA ,1990)

II .CHOIX DE RECEVEUSES

Les critères de sélections des élevages d'où proviennent les receveuses sont les suivants : les élevages indemnes de maladies contagieuses, une bonne gestion de la reproduction et de l'alimentation, l'effectif de femelles à intégrer au programme doit être supérieur à cinq ainsi la motivation et la réceptivité de l'éleveur.(MAZOUZ et al,1992).

La receveuse choisie doit être en bonne santé générale et présente un système reproducteur qui réponde à deux principes fondamentaux de la physiologie de la gestation : le corps jaune ovarien et l'utérus exempt de pathologie (VAILLANCOURT & BOUSQUET, 1989).

Conformément à ces critères, le choix peut se porter sur une vache cyclée de bonne fertilité dont la date de vêlage remonte au moins à 55 jours (NIBART & BOUYSSOU, 1991).

La taure nullipare, cyclée est aussi une bonne candidate à la sélection des receveuses à moins d'anomalie ou particularité anatomique du tractus génital.

Enfin, la femelle receveuse doit avoir atteint un minimum de développement physique afin de mener à terme la gestation, de vêler normalement et éventuellement, d'allaiter le veau.(KALSOU, 1992).

III .REGROUPEMENT DES RECEVEUSES ET LEUR PREPARATION

III .1.La nutrition

L'alimentation est un facteur clé de la préparation des receveuses (Broadbent et al, 1991). En effet, une alimentation défectueuse peut être la cause de nombreux troubles de la reproduction en élevage bovin.

III.1.1. L'apport énergétique

La principale composante de la ration qui joue un rôle dans ce domaine est son niveau énergétique : il peut occasionner des chaleurs silencieuses, un retard d'ovulation, et donc une chute du taux de réussite en transfert d'embryons.

-Avant transfert : Une restriction énergétique plus modérée entraînera plutôt une diminution de la taille du corps jaune et une diminution de la taille des follicules dominants (Corlay, 1998).

-Au moment du transfert : Un flushing (une augmentation temporaire de l'apport alimentaire) peut permettre d'améliorer les performances de reproduction des animaux. Les augmentations du niveau alimentaire ont des effets très rapides sur le métabolisme des animaux, notamment grâce aux effets immédiats de l'insuline sur le fonctionnement ovarien.

-En fin de gestation : Dunn (1980) a observé que si la vache et surtout la génisse, qui a encore des besoins de croissance à satisfaire, ne reçoivent pas pendant cette période une alimentation adaptée, le poids du veau à la naissance sera diminué. Il explique également que les femelles ne doivent pas être trop nourries au cours de cette période pour éviter les problèmes de dystocie. Il recommande un gain de poids de 60 à 70 kg de poids vif au cours du dernier trimestre de gestation.

III.1.2. L'apport azoté

Dans le cas des receveuses, une telle carence n'est pas observée sur le terrain car les animaux sont sélectionnés, notamment sur leur état corporel.

Les excès azotés peuvent avoir des effets néfastes sur les performances de reproduction des femelles. Un excès d'azote dégradable à la mise à l'herbe ou lors d'un excès d'azote soluble dans la ration peut avoir plusieurs conséquences :

- Un déficit énergétique dû à la consommation d'énergie par le foie pour transformer l'ammoniaque en urée,

- Une augmentation des taux circulants d'urée et d'ammoniac qui peuvent avoir un effet cytotoxique sur l'embryon et provoquer une chute de la progestéronémie. La modification de ces taux conduit à une baisse du pH utérin qui peut expliquer la diminution de fertilité observée (Elrod et Butler, 1995).

III.1.3.L'apport de minéraux

Un manque de phosphore au cours de l'hivernage peut provoquer un anœstrus prolongé si l'apport au cours de l'hiver est inférieur à 15 mg par animal et par jour. Des déficits en vitamine A peuvent faire diminuer l'efficacité de la reproduction mais ils sont toujours accompagnés de signes cliniques s'ils sont trop importants (Spitzer, 1986, Clark, 1995).

III.1.4.La régularité des apports

La mise à l'herbe et la rentrée à l'étable sont deux moments où des changements alimentaires importants ont lieu. Broadbent et al. (1991) recommandent de ne pas transférer d'animaux au cours de ces périodes où la qualité et la quantité des apports varient énormément. Ils préconisent un régime constant pendant les 6 semaines qui précèdent le transfert et les 8 qui le suivent, et des changements alimentaires progressifs s'ils doivent avoir lieu.

III.2. L'environnement

Une certaine constance dans l'environnement est nécessaire pour assurer une bonne réussite du transfert car un stress par le froid génère une rapide augmentation des besoins alimentaires qui peut se traduire par une mobilisation des réserves et une chute de l'état corporel et à l'autre extrême, une chaleur excessive peut conduire à un anœstrus, un faible taux d'ovulation et un stress de chaleur sur l'embryon lui-même. Ces effets peuvent en plus être exacerbés par une humidité importante.

Le stress issu également des interventions thérapeutiques et prophylactiques comme les vaccinations, traitements antiparasitaires. De ce fait, ces interventions doivent être terminées au moins un mois avant le début de la procédure de synchronisation des receveuses.

III.3. Les critères de santé

Avant de commencer tout traitement de synchronisation, Broadbent et al. (1991) préconisent un traitement contre les parasites internes et externes, des tests d'évaluation du statut BVD et IBR et une vaccination le cas échéant.

La recherche des maladies légalement réputées contagieuses est quand à elle obligatoire.(LEGRAND,2003).

Chapitre II : Synchronisation des chaleurs

La mise en place des embryons dans l'utérus de receveuses peut se faire soit avec des embryons congelés auquel cas la synchronisation donneuse-receveuse est inutile, soit sans congélation, les receveuses étant alors amenées au même stade du cycle que la donneuse (DOMINIQUE, 2003) dans le but d'avoir reçu les embryons dans un milieu correspondant à son âge et semblable à son milieu d'origine. Dans ce cas, le traitement de synchronisation des receveuses commencent après le début de chaleurs naturelles (cyclées) ou induites (non cyclées) de donneuses. (Figures 01 et 02).

I. LES PROCÉDES APPLIQUES

Chez les bovins, la synchronisation des chaleurs s'effectue par quatre procédés hormonaux :

I.1 .Les procédés à base de PROGESTAGÈNES+PMSG

Ces procédés consistent à bloquer pendant un temps donné (environ 10 jours) l'évolution de tout follicule donc de toute ovulation, puis, par arrêt du traitement, à provoquer un basculement hormonal provoquant l'ovulation. Par imprégnation de progestagènes en 1^{er} temps qui se fait soit par implant sous la peau de l'oreille (procédé Synchronate B), soit par spirale vaginale imprégnée de progestagènes (procédé PRID) et le basculement hormonal favorisé par la PMSG en deuxième temps.

I.2 .Les procédés à la base de PROSTAGLANDINE PGF2 α

L'effet de PGF2 α est de dissoudre le corps jaune qui peut être utilisé seul (utilisation simple), ce procédé n'est efficace que pour les animaux cyclés.

Pour les vaches et les génisses en anœstrus, le recours à l'association de PGF2 α aux (progestagènes +PMSG) est recommandé.

II .LA DETECTION DES CHALEURS

Les cycles de la génisse et de la vache sont en moyenne de 21 jours, avec des chaleurs de 18 heures en moyenne, dont le déroulement peut être divisé en 3 phases.

La phase où les manifestations de chaleurs sont plus prononcées est la phase de chaleurs vraies (de 16 à 18 heures) qui se manifeste par la baisse de l'appétit ainsi les signes d'approche, le chevauchement et l'acceptation de la monte, la baisse de la lactation et l'écoulement de la glaire

cervicale .Mettant en considération les chaleurs silencieuses qui sont plus fréquentes en hiver, et d'autant plus que les vaches sont entravées plutôt qu'en stabulation libre ou au pré.
(DOMINIQUE,2003).

Pour une bonne détection des chaleurs et pour la réussite de l'opération du TE, trois observations quotidiennes doivent être requises.

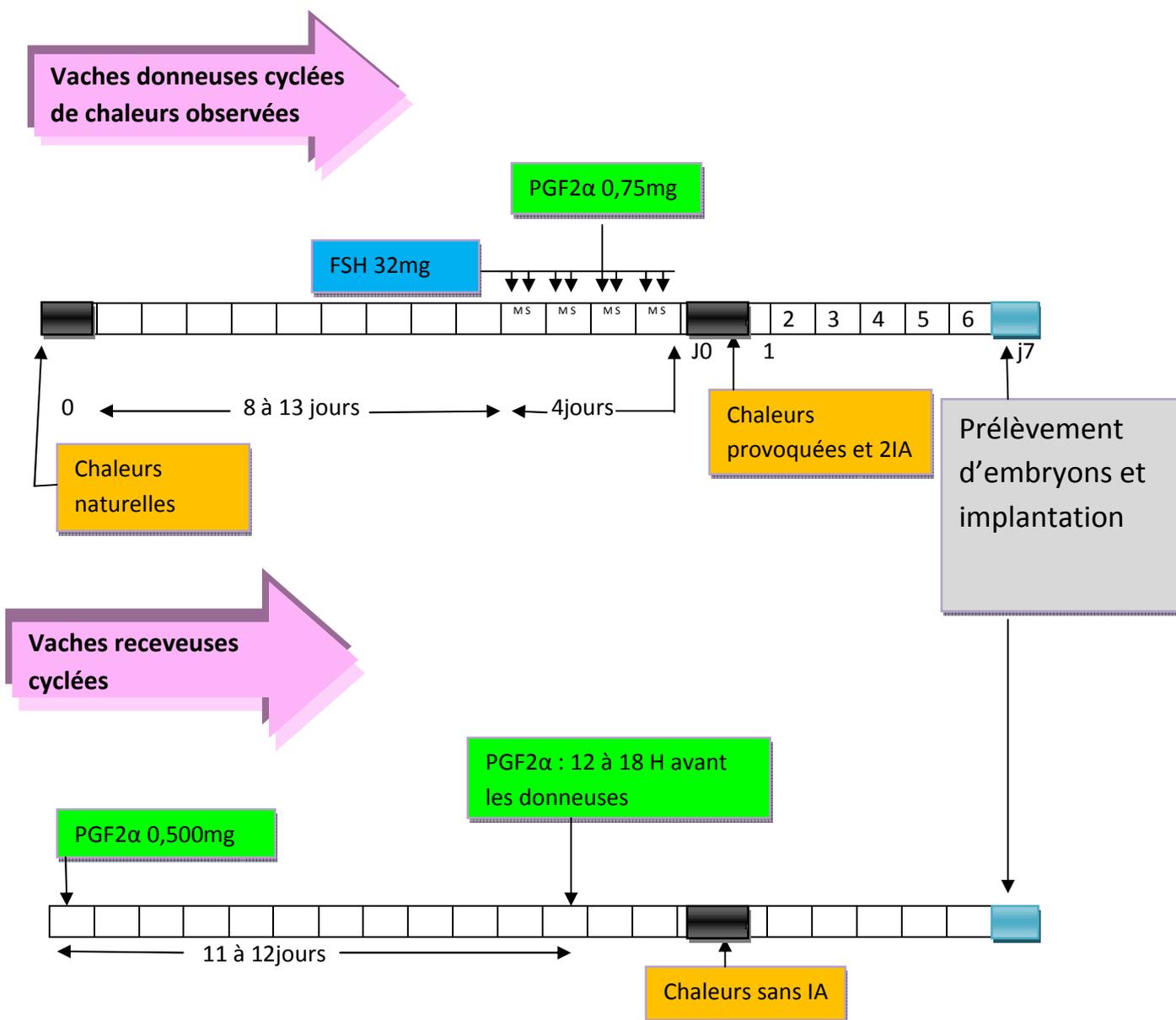


Figure O1 : Schéma de traitements hormonaux des donneuses et des receveuses cyclées (DOMINIQUE, 2003)

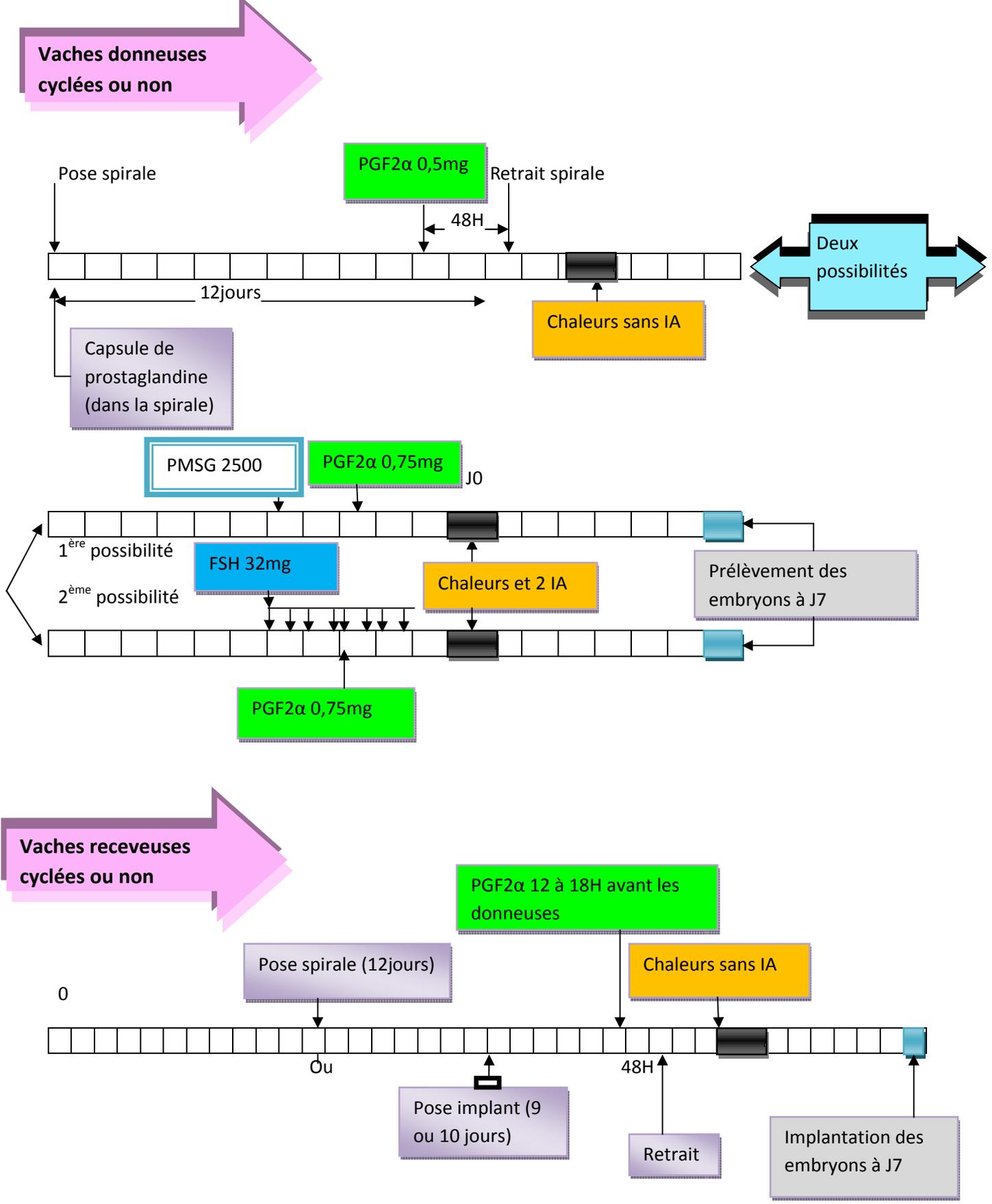


Figure 02 : Schéma de traitements hormonaux des donneuses et des receveuses non cyclées (DOMINIQUE, 2003)

Chapitre III : Superovulation

La superovulation est un traitement hormonal à base d'hormones gonadotropes exogènes capables de stimuler la croissance, la maturation de nombreux follicules et l'ovulation de ceux-ci.

Donc l'objectif de ce traitement est d'augmenter dans des conditions contrôlées le taux naturel d'ovulation, afin de produire au cours d'un même cycle après fécondation in vivo, plusieurs embryons qui seront ensuite collectés à 7 jours. (BRIANT et al ,2007).

Deux préparations hormonales à activité gonadotrope ont été utilisées, la PMSG ou eCG et la FSH. (ADEL,2004).

I .DEFINITIONS ET MODES D'ACTION DES HORMONES :

-Pregnant Mare Serum Gonadotrophin :

PMSG extraite du sérum de jument gravide entre le 42ème et le 100^{ème} jour de gestation possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange de 2/3 de FSH et de 1/3 de LH. (HENZEN, 2010).

-*La Human Menopausal Gonadotrophin* :

L'hMG (Human Menopausal Gonadotrophin) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé.(HENZEN,2010).

-Follicle Stimulating Hormone :

FSH est également de nature glycoprotéique, mais sécrétée par le lobe antérieur de l'hypophyse des mammifères et dont l'hypophyse de mouton et de porc constitue une source importante d'après les travaux de COURRIER et Coll. cités par DERIVAUX. Actuellement, la FSH provenant d'extraits purifiés d'hypophyse de porcs (FSH-P) est la plus utilisée. (OUATTARA , 1990)

MOOR et Coll ont montré que les gonadotropines stimulent l'activité mitotique des follicules pré-antraux en même temps qu'elles réduisent l'atrésie dans les follicules antraux. (KALSOUM , 1992) Et la majorité des follicules antraux de taille moyenne se retrouverait entre le 8^e et le 10^e jour du cycle sexuel.

II. PROTOCOLES DES TRAITEMENTS :

-PMSG : Selon SAUMANDE, l'importance de l'acide sialique (13%) dans la fraction glucidique de la PMSG expliquerait sa demi-vie très longue (120 heures) d'où sa facilité d'emploi : une seule injection suffit. La dose moyenne de 2500 à 3000 UI est injectée par voie intramusculaire (OUATTARA , 1990) soit entre J8 et J13 (donc en phase lutéale), soit après 9 jours d'implant de synchronisation.(DOMINIQUE , 2003).

Afin de prévenir l'effet néfaste de PMSG, on procède à l'administration d'un sérum anti-PMSG.(ADEL, 2004).

-FSH : 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.(HENEZEN,2010) . Ceci oblige à faire une injection toutes les 12 heures. Généralement, la première injection est administrée entre le 9^{ème} et le 13^{ème} jour du cycle. Le nombre de jours du traitement peut varier de un à quatre ou cinq. De même, la dose totale à injecter varie entre 24 mg à 60 mg. Elle est administrée alors en doses décroissantes. (OUATTARA , 1990)

Dans tous les cas, ces traitements sont renforcés par une injection de prostaglandines 48 heures après le début du traitement destinée à dissoudre le corps jaune éventuel, qui s'opposerait à l'ovulation.(DOMINIQUE,2003)(figures 01 et 02)

La Gn-RH (Gonadotropine Releasing Hormone) qui a une activité stimulante sur la synthèse et/ou la libération de FSH et LH peut être utilisée comme complément aux traitements de superovulation. (OUATTARA , 1990).

III. VARIABILITÉ DE LA REPONSE AU TRAITEMENT DE SUPEROVULATION :

La variabilité est expliquée pour partie par des différences entre animaux et pour partie par des différences d'activité des préparations hormonales (THIBAUT et LEVASSEUR ,1991) :

- La réponse au traitement de superovulation dépend de l'état de la population folliculaire (présence d'un follicule dominant, nombre de follicules plus de 2 millimètres de diamètre). (SAUMANDE,1995) .
- les connaissances concernant la croissance folliculaire ont permis de montrer dès 1991 que la présence d'un follicule dominant au début du traitement de superovulation diminuait significativement le nombre des ovulations (Guilbault et al. 1991).

- Il a été montré que le nombre de follicules ovariens de 3 à 6 mm présents sur l'ovaire avant la stimulation hormonale était corrélé à la réponse au traitement (Monniaux et al. 1983 ; Purwantara et al., 1993 ; Kawamata, 1994). Plus récemment, une corrélation a été mise en évidence entre le nombre de follicules tertiaires \geq 1 mm et le nombre de corps jaunes après superovulation (Cushman et al., 1999).
- Le nombre d'ovulations observé après superovulation dépend à la fois du nombre de follicules stimulés susceptibles d'ovuler et du taux d'ovulation. Il a été montré que ces deux composantes sont influencées à la fois par des facteurs génétiques (Manciaux et al., 1999 ; Ponsart et al., 2001, Tamassia et al., 2001), des facteurs d'élevage comme l'alimentation (Freret et al., 2000), des facteurs physiologiques liés à la donneuse, comme l'âge (Hasler et al., 1983 ; Donaldson, 1984b ; Lerner et al., 1986 ; Manciaux et al., 2000 ; Lauriere et al., 2001), la production laitière. (Manciaux et al., 2000 ; Laizeau et al., 2001), les pathologies de la reproduction (Bowen et al., 1978 ; Hasler et al., 1983 ; Kawamata et al., 1999 ; Ménard et al., 2000) et par les modalités de superovulation.
- la forte activité LH de eCG peut induire une activation prématurée de la méiose ovocytaire, et d'autre part, l'action prolongée de eCG due à sa longue demi-vie (plusieurs jours) provoque des modifications des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales (COGNIE et BARIL, 2002) d'où la mauvaise qualité des embryons récoltés à la suite du traitement par la PMSG.
- La raison de cette variabilité des résultats a été identifiée comme étant la conséquence d'une mauvaise standardisation du seul produit commercialisé à cette époque (FSH-P (1), Burns Biotech) puisque la quantité de FSH comme le rapport des quantités FSH/LH étaient très variables d'un lot de fabrication à un autre. (SAUMANDE, 1995).

Chapitre IV : Insémination

I. INTRODUCTION :

En utilisation naturelle la diffusion génétique des reproducteurs de haute valeur est faible ; l'IA augmente cette diffusion dans l'espace par la dilution de l'éjaculat ainsi par la facilité du transport de la semence au lieu de reproducteurs et dans le temps par la congélation de la semence qui peut être utilisé même après la mort du reproducteur.(DOMINIQUE,2003).

Ainsi l'utilisation d'une semence de haute valeur génétique et de bonne qualité dans le transfert embryonnaire permet de développer plus qu'une seule voie.

Aujourd'hui , l'IA réalisée avec des matériels jetables ,limite considérablement les risques de diffusion des maladies transmises par les reproducteurs pratiquant la monte publique ou même par l'utilisation dans un même élevage de reproducteurs qui nécessairement peuvent diffuser les microbes d'une femelle à l'autre.

Indépendamment des aspects génétiques et sanitaires, l'IA apporte des solutions évidentes à de nombreux problèmes d'organisation du travail et de prix de revient, autrement dit de la gestion. (DOMINIQUE, 2003).

II. TECHNIQUE D'INSÉMINATION ARTIFICIELLE :

L'inséminateur sort de la bombonne d'azote liquide à -196°C une paillette de semence choisie par l'éleveur et décongelée par immersion pendant 30 secondes dans de l'eau à 34°C .On coupe l'extrémité bouchée à l'alcool polyvinylique solidifié , on l'introduit dans le pistolet inséminateur que l'on recouvre d'une gaine plastique jetée après chaque usage.

Pour la vache l'insémination est intra-utérine, au delà du col de l'utérus afin d'augmenter le taux de gestation, avec guidage par saisie manuelle du col à travers la paroi du rectum.

Après la superovulation, il est recommandé d'inséminer une demi-dose par corne utérine. (DOMINIQUE, 2003).

III .MOMENT D'INSEMINATION :

Les spermatozoïdes doivent se trouver les premiers, avant l'ovocyte, dans l'oviducte, lieu de la fécondation. Ils peuvent y survivre environ 24 heures, alors que l'ovocyte ne reste vivant que 6 heures après l'ovulation, qui intervient dans les 12 à 24 heures suivant la fin des chaleurs.

Admettant donc que le meilleur moment pour faire inséminer une vache se situe 15 à 25 heures après le début des chaleurs.

Dans le cadre du TE, les donneuses doivent être inséminées deux fois, une 1^{ère} 8 à 10 heures après le début de chaleurs de la superovulation, la seconde 12 heures plus tard. (DOMINIQUE, 2003).

Le succès de la fécondation des ovocytes est en partie limité par la variabilité du moment de l'ovulation par rapport à l'IA.

Chapitre V : Collecte des embryons

La collecte s'effectue 6 à 8 jours après insémination de la donneuse. Les embryons sont alors au stade morula ou blastocyste.

Chez les bovins, l'embryon atteint l'utérus le 5^e jour après les chaleurs mais ne commence son implantation sur la paroi que vers le 15^e jour. Entre ces deux dates, il se trouve dans un état "libre", propice au prélèvement.

Il ne doit non plus pas être trop gros pour ne pas être lésé au cours des diverses manipulations ; or à partir de J13, on note une croissance importante du trophoblaste et l'embryon devient fragile.(OUATTARA ,1990).

La connaissance de ces déroulements physiologiques explique les dates précises du cycle entre lesquelles il est possible de récupérer les embryons.

I. APPRECIATION DE LA REPOSE OVARIENNE :

La réponse ovarienne au traitement de superovulation est estimée par le nombre de corps jaunes comptés par échographie, perçus par palpation transrectale des ovaires le jour de la récolte ou on peut procéder également à un dosage de la progestérone dans le plasma. (OUATTARA ,1990).

II .METHODES DE RECOLTE :

II .1.Récolte par voie chirurgicale :

Pendant longtemps, elle était la seule méthode utilisée .Mais elle n'est pratiquement plus employée, sauf en stations de recherche dans des buts d'expérimentation ou dans certains centres de transfert qui utilisent comme donneuses , des génisses culardes dont le col de l'utérus est pratiquement infranchissable .L'utérus est alors abordé par le flanc de l'animal. La récolte par voie chirurgicale a été vite supplantée par la méthode dite cervicale. (OUATTARA ,1990).

II.2.Récolte par voie cervicale :

La donneuse est placée dans une cage de contention surélevée sur l'avant. Une anesthésie épidurale et un lavage et désinfection doivent être localement effectués.

En passant par le col utérin, on procède au rinçage des cornes à l'aide d'un milieu spécial injecté et récupéré (par gravité) par l'intermédiaire d'une sonde mise en place dans l'utérus et reliée au bloc

de perfusion thermostaté à 35-37°. Un ballonnet gonflable, soit par de l'air soit par de l'eau, permet de fixer cette sonde dans la corne utérine et d'éviter le reflux du liquide vers le vagin. Le ballonnet est placé au niveau du corps utérin ("grand volume » de PBS : une solution tampon phosphatée saline) ou successivement au niveau de chaque corne ("petit volume » de PBS). Plusieurs types de sondes ont été inventés, les unes à deux voies et les autres à trois voies. (OUATTARA ,1990).

III. MANIPULATION ET CLASSIFICATION DES EMBRYONS :

Après lavage des deux cornes (30 à 60 minutes ,250 à 400 cc de solution) et repos du flacon de récupération dans la camionnette-laboratoire à température stable de 20-22°, les embryons qui se sont déposés au fond du flacon ,sont transvasés (DOMINIQUE ,2003) soit après décantation soit par filtration en utilisant un millipore de 0,74 µm de diamètre, soit encore par centrifugation . Le décantât contenant en principe les embryons est examiné à la loupe binoculaire à lumière froide à un grossissement 10 à 12 (OUATTARA ,1990). , les embryons sont alors aspirés sous la binoculaire à l'aide d'une micro-pipette et déposés dans des coupelles pour lavages successifs dans la solution stérile. (DOMINIQUE, 2003)

De là, les embryons sont classés par l'intermédiaire de la taille, de la couleur, du nombre et de la compacité des cellules, de la taille de l'espace périvitellin, du nombre des cellules dégénérées, et du nombre et de la taille des vésicules.

L'IETS donne une définition précise de quatre qualités différentes (Robertson et Nelson, 1994). Les embryons sont observés au grossissement 200 pour évaluer leur qualité. On distingue quatre classes de qualité embryonnaire :

- Excellent ou bon (qualité 1) : embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique avec des cellules uniformes en taille, couleur et texture ou embryon un peu en retard pour son jour de collecte.
- Moyen (qualité 2) : Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours ou présentant des défauts précis tels que des cellules échappées dans l'espace périvitellin, des blastomères de taille variable, quelques cellules dégénérées, et quelques vésicules.
- Médiocre (qualité 3) : anomalies visibles, nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de taille différente et des vésicules grosses et nombreuses.

- Mort ou dégénéré (qualité 4) : anomalies graves, arrêt de développement à un stade précoce avec des cellules dégénérées.(annexe 01)

Le devenir de l'embryon peut dépendre de ces qualités, car L'IETS précise que si les embryons de qualité 1 à 3 sont transférables en frais, seuls les embryons de qualité 1 sont congelables. (LEGRAND, 2003).

Chaque embryon est alors logé dans une paillette, entre deux bulles d'air, paillette obturée par des poudres de différentes couleurs pour identification.

Après quoi les embryons sélectionnés pour la congélation passent dans un congélateur progressif, jusqu'à -196°. Les autres maintenus à 15°, sont utilisables sur les receveuses dans un délai de 24 à 36 heures (figure 03). (DOMINIQUE, 2003).

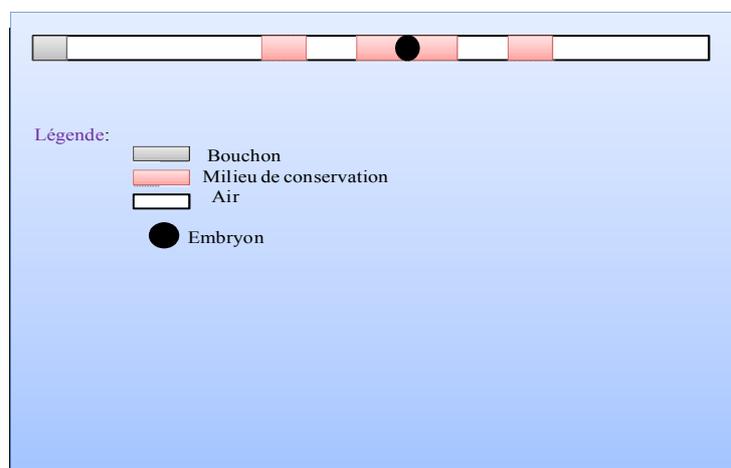


Figure 03 : Configuration d'une paillette pour un transfert direct (frais)(LEGRAND ,2003)

Chapitre VI : Cryoconservation

I. PRINCIPE DE LA CRYOCONSERVATION :

La cryoconservation doit permettre le ralentissement, voire l'arrêt de tous les phénomènes biologiques ; à des températures inférieures à - 150° C, les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées : le temps cellulaire est suspendu. (GUIGNOT, 2005).

II .CRYOPROTECTEURS :

II.1.Introduction :

La nécessité de l'emploi d'un cryoprotecteur est vite apparue : l'eau en gelant se dilate et cristallise, ce qui provoque l'éclatement des cellules. Il faut donc déshydrater la cellule avant de la congeler pour que l'augmentation de volume lié à la congélation se fasse dans des proportions supportables par les membranes cellulaires, et éviter la formation de cristaux. C'est le rôle du cryoprotecteur.

II.2.Définition et catégories :

Le cryoprotecteur est une molécule qui entre dans les cellules pour remplacer l'eau mais qui ne cristallise pas en refroidissant, à condition que cette molécule ne soit pas toxique pour les embryons.

Il y a deux principales catégories de cryoprotecteurs utilisables :

- ceux qui pénètrent dans les cellules de l'embryon (glycérol, DiMethylSulfOxyde (DMSO), éthanol, éthylène glycol)
- ceux qui restent à l'extérieur des cellules (Polyvinylpyrrolidone (PVP), saccharose, glucose).

Ces substances sont en général ajoutées en différentes étapes pour éviter les chocs osmotiques qui pourraient endommager les cellules embryonnaires.

Les molécules les plus communément utilisées sont le glycérol, le DMSO et plus récemment l'éthylène glycol. On utilise en général le glycérol à 1,0M, le DMSO à 1,5M et l'éthylène glycol à 1,2M (Ali et Shelton, 1993) in (LEGRAND, 2003).

II.3. Cryoprotecteurs utilisés :

-Le glycérol :

La molécule de glycérol est une grosse molécule qui traverse lentement les membranes cellulaires, beaucoup plus lentement que l'eau. Lorsque ce produit est utilisé comme cryoprotecteur, on évite en général de placer l'embryon directement dans une solution concentrée en glycérol car l'eau sort de la cellule beaucoup plus vite que le glycérol n'y entre, et la cellule perd beaucoup de son volume. On procède alors de la façon suivante : on place l'embryon dans des solutions de concentration croissante en glycérol afin de réguler les échanges au travers de la membrane plasmique.

-Le DMSO :

Elle n'est plus que très peu utilisée aujourd'hui, car elle présente peu d'intérêt comparée au glycérol, alors qu'elle a les mêmes désavantages.

-L'éthylène glycol :

Les glycols sont des molécules auxquelles les embryons sont plus perméables. Leur intérêt est de permettre des transferts directs, c'est-à-dire en plaçant directement la paillette décongelée dans le pistolet de transfert, sans passer par une étape d'observation de l'embryon au microscope avant de le transférer.

Le choix entre les deux types de congélation se fait souvent en fonction du stade de l'embryon: un embryon jeune (morula ou jeune blastocyste) sera plutôt congelé dans du glycérol, tandis qu'un embryon plus âgé (blastocyste épanoui) sera congelé dans de l'éthylène glycol. (LEGRAND,2003).

III. TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION :

III.1. Congélation lente :

La congélation lente, comme son nom l'indique, est une technique « lente » de cryoconservation dont le principe est l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon. Elle est d'ailleurs aussi appelée congélation « à l'équilibre ».

III.1.1. Incorporation des cryoprotecteurs :

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 (ex. : 0,5, 1 puis 1,5 M, avec environ 5 minutes dans chaque bain), afin d'éviter les chocs osmotiques importants.

III.1.2.Chargement des embryons dans les paillettes :

Si les embryons sont destinés au transfert direct, cette technique peut soit faire appel à un cryoprotecteur à diffusion très rapide comme l'éthylène glycol, soit utiliser un dilueur inclus dans la paillette (0,25ml). L'embryon est alors emprisonné dans un segment de solution cryoprotectrice au centre de la paillette, séparé par des bulles d'air, des extrémités contenant soit le dilueur

(Saccharose ou galactose) (figure 04) soit uniquement la solution de dilution PBS concernant l'éthylène glycol (figure05).Et si les embryons sont destinés au transfert traditionnel, l'embryon plongeant dans la solution cryoprotectrice entouré de deux bulles d'air elles-mêmes entourées d'une autre solution cryoprotectrice.(figure06)

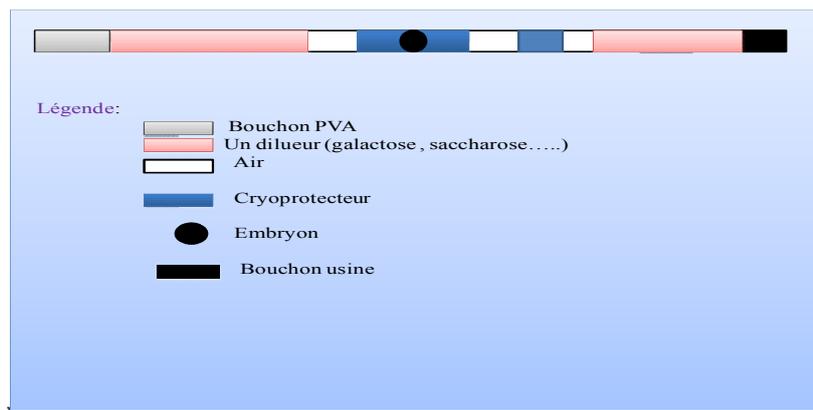


Figure 04: Montage des embryons en paillette de 0,25 ml avant et après refroidissement(transfert direct).(GUIGNOT,2005)

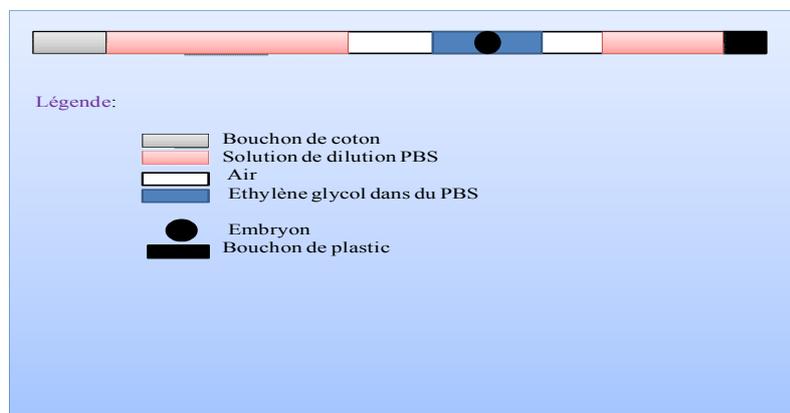


Figure 05: Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant de l'éthylène glycol d'après Voelkel et al.(1992a)in (LEGRAND,2003)

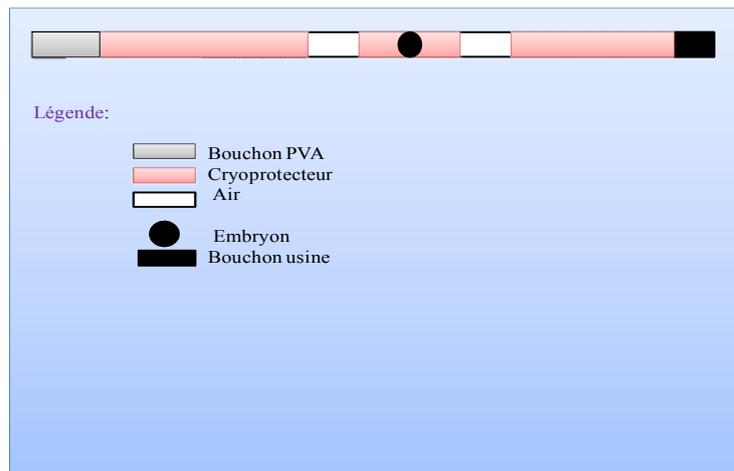


Figure 06 : Montage des embryons en paillette de 0,25 ml avant refroidissement (GUIGNOT, 2005)

III.1.3. Etapes de refroidissement :

❖ Le 1^{er} refroidissement : La température descend jusqu'à -7°C à la vitesse de 1 à $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ pour les appareils programmables ; pour les autres appareils non programmables (congélateur à bain d'alcool et à azote liquide), 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 min c'est la période d'équilibration.

❖ Induction de la cristallisation « Seeding » : Par refroidissement localisé de celles-ci à l'aide d'une pince refroidie dans l'azote ou grâce à un système incorporé à l'appareil de congélation. 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).

❖ Le 2^{ème} refroidissement : De -7°C à -30°C , la température descend très lentement ($0,1$ à $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) pour permettre la déshydratation des embryons. L'arrêt de la descente progressive de température se fait entre -25°C et -35°C .

❖ Le plongeon de paillettes dans l'azote liquide : A -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. (GUIGNOT, 2005).

III.2. Vitrification :

-Principe : La vitrification est une technique de « non équilibre » à la différence de la congélation lente ; elle permet d'éviter au maximum la formation des cristaux de glace au cours du refroidissement en transformant la phase liquide du cytoplasme cellulaire en phase solide amorphe, encore appelée « état vitreux ».

Ceci est possible en utilisant des concentrations très élevées en cryoprotecteurs (6 à 7,5 M), induisant une très forte viscosité du milieu, et en appliquant une vitesse de refroidissement et réchauffement très rapide. Les embryons sont déposés dans différents bains à concentration croissante en cryoprotecteurs (ex. : 1,5, 4 puis 7,5 M avec 5 minutes dans les deux premiers bains et seulement 30 secondes dans le dernier), afin de limiter les chocs osmotiques liés aux très fortes concentrations en cryoprotecteurs utilisées dans cette technique. (GUIGNOT,2005).

Plus la solution est visqueuse et de faible volume, moins les cristaux sont susceptibles de se former (Bautista, 1998), on utilise ainsi des solutions contenant un mélange de Cryoprotecteurs différents pour diminuer la toxicité de chacun, ainsi que des polymères de haut poids moléculaire qui permettent de réduire les concentrations de cryoprotecteurs. Les solutions de saccharose sont également utilisées, toujours parce qu'elles évitent la sortie d'eau trop rapide des cellules.

La solution d'équilibration est composée de la solution de vitrification diluée à 50% dans une solution de PBS. Les embryons sont placés une, deux ou cinq minutes dans cette solution, puis ils sont placés dans le milieu VSED (milieu de vitrification) et transférés dans une paille (d'après Ishimori et al, 1993)(figure07).

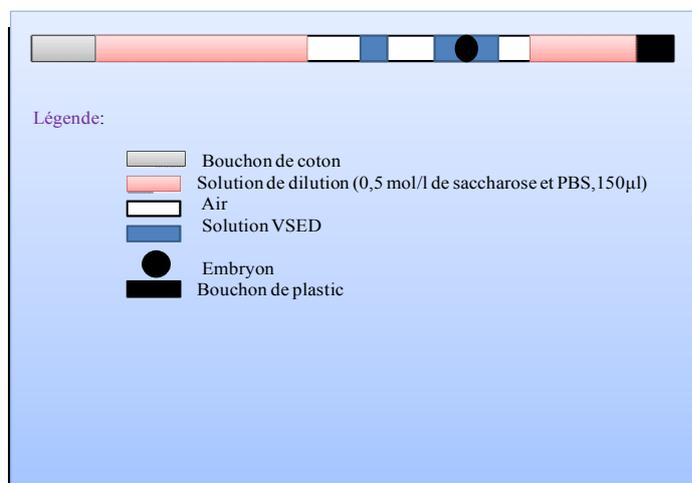


Figure 07: Configuration d'une paille de 0,25 ml avant congélation, contenant la solution VSED(d'après Ishimori et al ,1993)in (LEGRAND,2003)

La paille est ensuite placée 2 minutes dans des vapeurs d'azote liquide avant d'être plongée dans l'azote liquide lui-même. Ceci correspond à une vitesse de congélation de 200°C/minute. Quand on les place directement dans de l'azote liquide, les pailles ont tendance à se briser à cause du changement trop brusque de température (2500°C/minute).(LEGRAND,2003).

III.3. Vitrifaction rapide (OPS) et ultra rapide :

-Ces techniques de vitrifaction 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 pailles dans lesquelles les embryons montent par capillarité : ce sont des pailles classiques de 0,25 ml qui ont été étirées : Open Pulled Straw, d'où le nom de la technique d'OPS (Vajta *et al* 1997).in(GUIGNOT,2005)

-La vitesse de refroidissement peut encore être augmentée en utilisant des pailles encore plus fines (technique de Super OPS décrite par Isachenko et al 2003) ou en plongeant les pailles dans de l'azote refroidi à une température inférieure à sa température d'évaporation, ce qui évite la formation de vapeurs d'azote ayant un effet d'isolant thermique autour de la paille. Pour ce faire, l'azote est mis sous vide et descend ainsi à - 210° C (Arav 1998) ; la vitesse de refroidissement est alors de l'ordre de 25 000 à 130 000° C/min pour une paille de type OPS. Ces pailles étirées peuvent être fermées afin d'éviter toute contamination lors du stockage dans les containers d'azote.(GUIGNOT,2005)(figure 08)

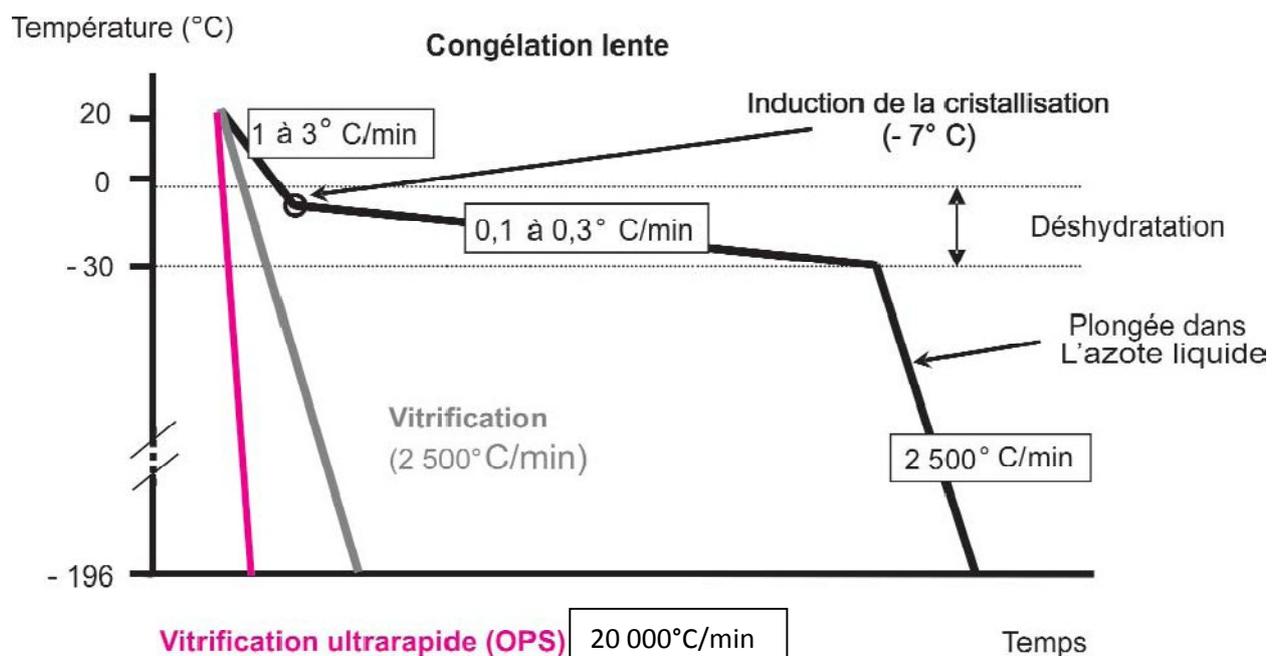


Figure 08 : Vitesse de refroidissement des embryons en fonction de la technique de cryoconservation.(GUIGNOT,2005)

Chapitre VII : Transplantation des embryons

La mise en place s'effectue à J7 après l'apparition de chaleurs, en effet l'embryon doit être remis en place dans le même segment du tractus génital que celui dans lequel on l'a prélevé, c'est-à-dire les cornes utérines et où il retrouvera des conditions semblables à son milieu d'origine.

Par ailleurs, NIBART et BOUYSSOU citant les travaux de BRAND et ceux de NORTHEY et FRENCH (1980) rappellent d'une part qu'on observe des contractions du myomètre jusqu'à J5 et d'autre part, qu'à partir de J6, une substance sécrétée par l'embryon, la trophoblastine, est nécessaire pour éviter la disparition du corps jaune, lui-même nécessaire au maintien de la gestation. In (OUATTARA, 1990).

I. CONDUITE A TENIR PRE-TRANSFERT :

L'état général de chaque femelle est évalué et une palpation transrectale est systématiquement réalisée afin de vérifier la présence d'un corps jaune, d'évaluer sa qualité et de le latéraliser

La receveuse doit être attachée dans un local propre, pas trop éloignée du lieu de la préparation des embryons ('Laboratoire mobil'). La région vulvaire devrait être nettoyée avec du papier serviette. Pour faciliter le transfert et éviter les efforts expulsifs, une anesthésie épidurale préconisée. (MAZOUZ et al, 1992).

II. DECONGELATION DES PAILLETTES :

Pour empêcher le phénomène de recristallisation, il faut décongeler rapidement les paillettes dès leur sortie de la bombonne d'azote liquide. Elles sont donc plongées rapidement (dizaine de secondes) dans un bain-marie à une température comprise entre 22 et 37° C. (GUIGNOT, 2005) Lors de la décongélation, il faut faire rentrer l'eau dans les cellules et en faire sortir le cryoprotecteur progressivement.

II .1. Cas du transfert traditionnel :

En vue de la dilution du cryoprotecteur, Les embryons sont placés dans trois bains successifs à concentrations décroissantes en cryoprotecteur comme l'expose Nivot (1998), 5 minutes dans chaque bain avant d'être déposés dans un milieu de transfert. Ces bains ont tous pour point commun une solution de PBS additionnée de sérum albumine bovine (BSA) à 4 g/l, et de saccharose

(augmenter la pression osmotique à l'extérieur de la cellule, ce qui limite le différentiel de pression sans gêner la sortie du cryoprotecteur) à la concentration de 0,3M.

En 15 minutes, on obtient donc des embryons correctement décongelés et placés dans un milieu de transfert.

La paillette de transfert est ensuite montée : l'embryon est contenu dans du milieu de conservation, entouré de deux bulles d'air et de deux autres gouttes de milieu de conservation (figure 03).

II.2.Cas du transfert direct (one step) :

Comme son nom l'indique, il n'y a pas de paillette à vider et à reconstituer car la dilution du cryoprotecteur a lieu à l'intérieur de celle-ci. Après le réchauffement dans un bain marie, le contenu entier de la paillette congelée est alors introduit dans la corne utérine de la femelle receveuse après le sectionnement de l'une des extrémités de celle-ci. (LEGRAND, 2003)(Figures 04 et 05)

III. MISE EN PLACE :

III.1.Par méthode chirurgicale :

Par ouverture du flanc, l'utérus est ponctionné et l'embryon (frais ou décongelé) est expulsé dans la lumière utérine à travers un cathéter endoveineux. Seule méthode pratiquée dans les débuts du transfert embryonnaire, elle s'est effacée aujourd'hui au profit de l'approche transcervicale qui nécessite moins d'opérateurs et évite les traumatismes. Cependant, elle pourrait encore se justifier dans le cas où le nombre de receveuses serait limité et où des difficultés majeures s'opposeraient à la traversée du col de l'utérus (LAMOTHE, 1989). (KALSOUM, 1992)

III.2.Par méthode cervicale :

Cette méthode consiste à placer l'embryon dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune. Divers instruments sont utilisés parmi lesquels le pistolet à insémination de type CASSOU détient une place prépondérante. La canule de HANOURE est également utilisée par certains. La principale précaution à prendre lors de la mise en place de l'embryon consiste à éviter les contaminations vaginales et cervicales. Pour cela, il est recommandé de faire usage d'un vaginoscope ou de recouvrir l'instrument d'un manchon protecteur. (OUATTARA,1990).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériels et méthodes

Objectif

En vue de l'introduction dans les élevages algériens de la technique du transfert embryonnaire, et après des essais fructueux en stations expérimentales, il était impératif de faire bénéficier nos élevages de cette biotechnologie. A cet effet, des essais en ferme sont effectués.

MATERIELS ET METHODES

L'essai a été réalisé dans la ferme de Lahiani où on a assisté à la première transplantation qui s'est déroulée le dix-neuf octobre deux mille dix. Cette exploitation est située à 16 km au sud-est de Tipaza, délimitée au nord par Fouka, au sud par Blida, à l'est par Koléa et à l'Ouest par Bousmail et Khemisti. Son activité est orientée vers la production laitière et l'engraissement des bovins.

I. Préparation des animaux

I.1. Sélection des receveuses

La motivation de l'éleveur et la bonne conduite d'élevage (ferme de Lahiani) et son statut sanitaire (indemne de brucellose et de tuberculose) sont autant de critères motivants quant à la prise de décision du choix de l'exploitation pour l'essai.

L'examen clinique, qui consiste en l'examen des grandes fonctions (cardiovasculaire, respiratoire, digestive et génitale), n'a révélé aucune anomalie ni pathologie. En effet, le fait que les animaux aient été reconnus indemnes de tuberculose et de brucellose et de toute maladie chronique qui auraient rendu impossible toute possibilité de mise en œuvre du programme, est un fait à souligner. L'examen sémiologique de l'appareil génital a permis de confirmer l'intégrité de cet appareil et de vérifier la bonne cyclicité des vaches par la reconnaissance de structures palpables sur l'ovaire. En effet, cet examen nécessite deux explorations rectales à 11 jours d'intervalle.

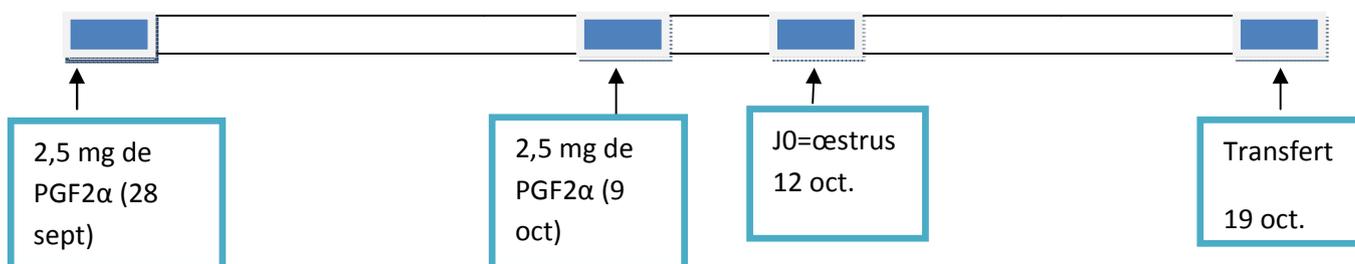
A l'issue de ces examens, le choix a porté sur sept génisses dont l'âge est compris entre 21 et 24 mois, de race Holstein (cette race étant connue pour ses performances laitières).

I.2. Préparation alimentaire

L'alimentation est un facteur clé dans la réussite du traitement de synchronisation des chaleurs, du maintien de la gestation, d'assurer un vêlage normal et éventuellement la lactation. En effet, un régime alimentaire relativement approprié avec l'utilisation de concentré pour augmenter la densité énergétique et donc assurer un flushing a été préconisé au moment de la mise à la reproduction et pendant le cycle de reproduction.

I.3. Protocole de synchronisation

Etant donné la cyclicité des vaches sélectionnées, deux injections de 2,5 mg de PGF2 α en IM ont été effectuées à onze jours d'intervalle en vue de ramener l'état physiologique des receveuses au stade du développement des embryons importés.



II. CONDUITE A TENIR LE JOUR DU TRANSFERT

II.1. Palpation transrectale :

Par palpation transrectale, on a décelé sur quatre vaches un corps jaune de bonne qualité. Les autres trois vaches ont été écartées du fait de la qualité du CJ (petit CJ).



II.2. Anesthésie :

Une anesthésie épidurale a été effectuée sur les quatre vaches par 2 cc de Lidocaïne à 0,2% pour chaque vache. L'efficacité de l'injection de Lidocaïne est évaluée par la relaxation de la queue de l'animal. Quand celle-ci est relâchée et ne réagit plus aux stimulations, le transfert peut avoir lieu.



II.3. Décongélation des embryons

- Chaque paille chargée d'un embryon congelé de sexe femelle de haut potentiel génétique (production laitière) de race Holstein a été décongelée rapidement dès sa sortie de la bombonne d'azote dans une thermos d'eau à une température de 34°C.

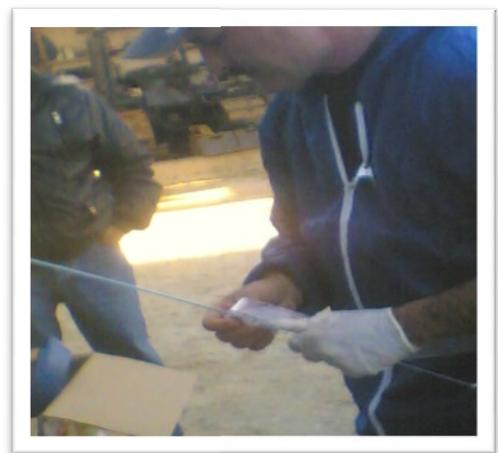


- Ensuite elle a été séchée par du papier serviette.
- Puis l'une des extrémités de la paille a été sectionnée.



Un outil de sectionnement

- Le montage de la paillette a été effectué directement sur le pistolet sans dilution car les embryons sont congelés dans de l'éthylène glycol et la dilution a lieu à l'intérieur de celle-ci (transfert one step).
- Une chemise sanitaire a été mise sur le pistolet pour préserver de toute contamination.



II.4. Transfert proprement dit

- La région vulvaire a été nettoyée avec du papier serviette.
- Le pistolet a été introduit dans le vestibule en écartant les lèvres de la vulve, puis dans le vagin. Avec l'autre main, par palpation transrectale, le pistolet est guidé jusqu'au col(méthode cervicale).
- Après la perforation de la chemise sanitaire, et le franchissement du col, l'embryon a été déposé dans la corne ipsilatérale au corps jaune.
- Le pistolet est ensuite retiré.

III. DIAGNOSTIC DE GESTATION

La gestation a été confirmée un mois après, à l'aide d'une échographie.
Le suivi de gestation a permis de détecter un seul avortement accidentel.

Chapitre II : Résultats et discussion

Trois vaches ont été écartées du programme du fait de la qualité du corps jaune qui était petit au moment du transfert. En effet, très souvent l'alimentation agit directement et sur la croissance folliculaire et sur le développement du CJ, les CJ petits sont souvent dus à des bilans énergétiques prononcés, ces derniers durent longtemps, s'accompagnant donc d'un mauvais développement de CJ.

Ces CJ petits ont un déficit énergétique et produisent relativement moins de progestérone et donc par voie de conséquence ne permettent pas le maintien de la gestation.

Une autre vache a avorté à cause d'un accident après la réussite de l'opération.

Pendant la gestation, des suivis réguliers de l'état sanitaire des vaches objet de l'étude et de la conduite de leur alimentation ont permis le maintien de la gestation et dans les meilleures conditions jusqu'à son terme (les vaches devaient normalement vêler début juillet).

Dans notre travail, les résultats de cette opération 75% de gestation, sont supérieurs à ceux obtenus par Mazouz *et al.* (1992) (50,4%) avec des écarts de 22,2% au Gharb et 69,6% à Fès, écart qu'il explique par des différences de conduite de troupeau matérialisé par la préparation adéquate de receveuses et l'habilité et l'entraînement de l'opérateur et par le choix de la méthode de décongélation (one step) qui a donné des résultats de 54,1% supérieurs à ceux obtenus par la méthode classique de décongélation (45,5%). Cependant, nos résultats sont liés d'une part à la mise en bonnes conditions des receveuses : sélection, examen sanitaire et de cyclicité, détection des chaleurs, conduite de synchronisation, et le régime alimentaire et d'autre part à la technicité de la mise en place des embryons après la décongélation de ceux-ci. Donc, la réussite du TE est liée à la maîtrise et la mise en main de chaque étape de celui-ci.

Chapitre III : Conclusion et perspective

De par ses implications à la fois nutritionnelle, culturelle et économique, le lait apparait comme une denrée hautement stratégique .Pour la majorité des pays en voie de développement, principalement les pays africains, la sécurité alimentaire est assurée grâce à une importation de 50% des besoins en produits laitiers, ce qui représente 700 000 000 \$ U.S. par an.

Les difficultés politique et économique font obligation aux différents pays de réduire le volume de leurs importations et ceci dans des délais assez brefs. La seule alternative est la mise en place assez rapidement d'une filière laitière locale mais surtout bien adaptée.

Les biotechnologies animales, dans leur ensemble, ont été ciblées comme élément d'avant-garde pour la réalisation de tels objectifs de développement ; entre autres le TE par son impact sur l'amélioration génétique (production laitière) par la multiplication du nombre de descendants des femelles d'élite.

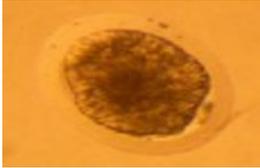
En Algérie, cette biotechnologie avait été uniquement réalisée pour but expérimental ; sachant que la première expérimentation date 1996.

En 2011, ce travail apporte la première transplantation réalisée sur le terrain en élevage bovin par des embryons congelés importés de haut potentiel génétique (la production laitière) avec ses résultats satisfaisants (75% de gestation : les quatre vaches devraient normalement vêler début de juillet) et encourageants offrant une grande perspective pour l'utilisation de cette technique à grande échelle.



Annexes

Annexe 01 : Classes des embryons selon l'IIETS

Classe 1 : Excellent ou bon	Classe 2 : Moyen
	
Classe 3 : Médiocre	Classe 4 : Mort ou dégénéré
	

Annexe 02 : Les animaux objets du transfert

Génisse 01	N° :754	Age :22 mois	Poids :435 Kg	Le jour de TE : 19/10/2010
Génisse 02	N° :762	Age :24 mois	Poids :480 Kg	Le jour de TE : 19/10/2010
Génisse 03	N° :758	Age :21 mois	Poids :410 Kg	Le jour de TE : 19/10/2010
Génisse 04	N° :763	Age :24 mois	Poids :477 Kg	Le jour de TE : 19/10/2010

Annexe 03 : Effectif bovin par catégorie(2007) ,ferme LAHIANI

Catégorie	Effectif	%
Taureaux	1	0,39
Vaches laitières	105	40,86
Génisses	104	40,47
Taurillons	22	8,56
Veaux	19	7,39
Vêlles	6	2,33
Total	257	100%

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- 1) ADEL D .,2004 :Etude comparative de deux extraits hypophysaires dans la production d'embryons chez les bovins .Thèse de magistère ,Université Sâad Dahlab .Blida (Algérie).104 pages.
- 2) Association Vétérinaire Française de Reproduction Assistée et de Transfert Embryonnaire .AVFRATE .
- 3) BOONES G , DESCLAUDE J,DROGOUL C ,GADOUD R, JUSSIAU R, LE LOC'H A ,MONTMEAS L ,ROBIN G . ,2009 :Reproduction des animaux d'élevage. Educagri Edition , page 143.
- 4) BRIANT C .,GUIKKAUME D ., TOUTAIN P- L ., BLANC MR.,2007 :Superovulation chez la jument avec les hormones gonadotropes :le point sur la situation et nouvelles données.INRA Prod .Anim ,20 (4),275-294 .
- 5) COGNIE Y ., BARIL G ., 2002 :Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo et in vitro chez la brebis et la chèvre. INRA Prod Anim, 15 (3), 199-207.
- 6) DOMINIQUE S .,1993 : La reproduction des animaux d'élevage .Tome I. Collection Sciences Et Techniques Agricoles 49130 Sainte Gemmes Sur Loire, page 91 et 93 .
- 7) GUIGNOT F.,2005 :La cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Prod Anim,18 (1),27-35.
- 8) HENZEN C.,2010 :La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine.
- 9) KALSOUM O .,1992 :Transfert d'embryons en milieu périurbain au Sénégal. Thèse de docteur vétérinaire, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar, 112 pages.
- 10) LAKHDISSI H, OUANANE B.,1993 : Résultats préliminaires d'un programme de transfert d'embryons conduit en ferme. Reproduction et production laitière.
- 11) LEGRAND SFR.,2003 : Transfert embryonnaire en race Charolaise en Clientèle : Etude des facteurs de réussite liés à la receveuse et à l'embryon.Thèse de Doctorat vétérinaire , Faculté de médecine de Créteil,120 pages .
- 12) MAZOUZ A , LOTFI N, ELAICH R , LAKHDISSI H , HACHI A , ELAIDI L .,1992 : La technique de transfert d'embryons bovins chez les éleveurs : moyen d'accroître le progrès génétique. Reproduction et production laitière.
- 13) SAUMAND J :La production d'embryons chez les bovins :Quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ?.INRA Prod.Anim,8 (4) ,275-283.
- 14) THIBAUT C , LEVASSEUR M .C . ,1991 :La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Marketing Editeur des préparations grandes écoles médecine, page 668
- 15) Transfert et manipulation d'embryons chez les bovins .INRA.

Résumé :

Afin d'améliorer la productivité de son cheptel laitier, l'Algérie se devait en plus de l'amélioration des conditions d'élevage et d'alimentation, d'améliorer de façon conséquente la génétique de ses bovins laitiers.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette première opération de transfert d'embryons dans une ferme de la wilaya de Tipaza.

En effet après une première sélection de sept génisses sur la base d'un examen clinique complet (aspect sanitaire), et d'un examen de l'appareil génital (contrôle de la cyclicité), un protocole de synchronisation a été effectué.

Au moment du transfert, une dernière palpation rectale a permis d'écarter 3 des 7 génisses ,pour mauvaise qualité du corps jaune ,les 4 génisses restantes ont fait l'objet de l'opération de transfert d'embryon .Parmi ces 4 génisses ,une a avorté des suites d'un accident, les 3 autres ont pu continuer la gestation jusqu'à l'heure et devrait vêler dans les jours qui viennent.

Mots clés : transfert embryonnaire, amélioration génétique, élevage.

Abstract:

To improve the productivity of its dairy herd, Algeria was in addition to improving conditions for rearing and feeding, to improve consistently the genetics of his dairy cattle. It is in this context that the first operation of embryo transfers on a farm in the province of Tipaza.

Indeed, after a first selection of seven heifers on the basis of a full clinical examination (health aspect), and an examination of the reproductive system (control of cyclicity), a synchronization protocol was performed.

On transfer, a final rectal palpation allowed to remove three of seven heifers, for poor quality of the corpus luteum, the remaining 4 heifers were the subject of the operation of embryo transfer. These four heifers an aborted as a result of an accident, the other 3 were able to continue the pregnancy until the time and should calve in the coming days.

Key words: embryo transfer, improvement genetic, breeding.

ملخص :

لتحسين إنتاجية قطع الألبان ، وكانت الجزائر، بالإضافة إلى تحسين ظروف التربية والتغذية، تحسينا كنتيجة، وراثتها أبقارها الحلوب و في هذا السياق تتم أول عملية لنقل الأجنة في مزرعة في مقاطعة تيبازة. في الواقع، وبعد التحديد الأول من سبع بقرة على أساس الفحص السريري الكامل (الجانب الصحي) ، ودراسة الجهاز التناسلي (مراقبة الدورية) ، وتم أداء بروتوكول التزامن. بشأن نقل، والجس المستقبلي النهائي يسمح لإزالة ثلاثة من سبع بقرة، لنوعية رديئة من الجسم الأصفر، وكان ما تبقى من 4 عجالات موضوع عملية نقل الأجنة، ومن هذه الأبقار الأربعة واحدة أجهضت نتيجة لحادث، والثلاثة الأخرى قدرت على الاستمرار في الحمل حتى ذلك الوقت، وينبغي أن تنجب في الأيام المقبلة.

الكلمات الرئيسية : نقل الأجنة، تحسين الوراثة، التربية.