

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة – الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE - ALGER

MÉMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

MAGISTÈRE EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

OPTION : NUTRITION ET REPRODUCTION DES BOVINS

Thème

**Application de la technique de congélation  
lente sur les embryons bovins**

Réalisé par : Dr. BENHENIA Karim

**Le jury:**

Président : Pr. TEMIM S. (ENSV d'Alger)

Promoteur : Dr. GHOZLANE F. (ENSA d'Alger)

Examineurs : Pr. KAIDI R. (Université de Blida)

Pr. IGUER-OUADA M. (Université de Bejaïa)

Dr. LAMARA A. (ENSV d'Alger)

*Année universitaire : 2010/2011*

## **Remerciements**

### **A Madame le Professeur TEMIM S,**

*De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,*

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

*Nous lui adressons, ici, l'expression de notre profond remerciement.*

### **A Monsieur le Docteur LAMARA A,**

*De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH,*

*Qui, avec une extrême gentillesse, a partagé notre intérêt pour le sujet, nous a encouragé dans la réalisation de ce mémoire, nous a accompagné et guidé, durant ce travail, nous a fait l'honneur de participer à notre jury et sans qui tout cela n'aurait pas été possible.*

*Nos Sincères remerciements.*

### **A Monsieur le Docteur GHOZELANE F,**

*De l'Institut National Supérieur d'Agronomie d'EL-HARRACH,*

*Que je remerci, vivement, d'avoir accepté la direction de mon projet de recherche.*

*Hommage respectueux.*

### **Aux Messieurs, le Professeur KAIDI R et le Professeur IGUER-Ouada M**

*Du département vétérinaire –université de Bilda,*

*Du département de biologie–université Bejaïa,*

*Qui ont accepté de juger notre travail.*

*Sincères remerciements.*

### **A messieurs ADEL D.et AMMI M. du département des sciences vétérinaires de l'Université Sâad Dahleb –Blida-, BRAHIMI M et ISSAAD M. de l'Institut Pasteur d'Alger (Coubra).**

*Qui nous ont aidés durant la réalisation de notre travail.*

*Sincères remerciements.*

### **A Monsieur BOUDJENAH Ahmed,**

*Directeur Général de l'ITElv qui nous a encouragé pour réaliser ce projet de recherche, offert tous les moyens durant ce travail et sans qui cette étude n'aurait pas pu voir le jour.*

*Nos vifs remerciements.*

***Au staff technique de la ferme de BABA ALI***

*Zineb, Soraya, Atif, Boualam, Hamza, Aziza, Boudoumi, à leur tête le directeur REZOUG Abderrahmane pour leur aide jusqu'à l'aboutissement de ce travail.*

*Nos sincères remerciements,*

***A mes parents***

*Pour leur soutien, leur patience et leur présence à mes côtés tout au long de mon parcours ... merci.*

*Avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

***A mes frères et mes sœurs,***

*Surtout ma grande sœur Hayet qui m'a soutenu durant toute ma vie, pour elle, chaque jour, je prie Dieu pour la guérir de sa maladie.*

***A mes amis,***

*Surtout AKKOU M qui a, toujours, été prêt à m'aider. Fraternellement*

***A mes collègues de promotion de Magistère,***

*Option de la Reproduction et Nutrition Bovine (Hamza, Amine, Ibrahim, Mohammed, Nora, Mounir) et à leur tête IDRES Takfarinas avec qui j'ai partagé tous les moments que je vécu soit durant la formation de Magistère soit durant la réalisation de mon projet de recherche.*

***Au responsable du CNIAAG***

*Pour son assistance matérielle.*

## Résumé

Le but de notre travail était de mettre en place une méthode de « congélation lente » des embryons bovins à base d'Ethylène Glycol.

Dans ce but, 16 donneuses d'embryons ont été sélectionnées et superovulées : 13 de race locale superovulées au moyen de FSHp 40% (32 mg et 40 mg) et 3 de race améliorée superovulées avec de la PMSG (2500 UI). Au 7<sup>e</sup> jour post-insémination, les embryons ont été récoltés dont 04 ont été congelés selon une courbe de refroidissement se déroulant en 03 étapes : i) de + 20°C à -7°C avec une vitesse de refroidissement de -3°C/min, ii) -7°C pendant 10 secondes pour le *Seeding*, iii) de -7 à -35°C avec une vitesse de -0,5°C/min. Les paillettes contenant les embryons sont, ensuite, plongées dans l'azote liquide à -196°C pour le stockage. Une fois décongelés, 02 embryons sont transférés directement chez des receveuses préalablement préparées et 02 autres ont subi une évaluation de leur qualité avant transfert.

Nos résultats montrent une précocité d'apparition des chaleurs de superovulation suite à l'injection de PGF2 $\alpha$  chez la race locale (37.27 $\pm$ 2.39) et une bonne réponse au traitement de superovulation au moyen de la FSHp (20CJ/donneuse). L'évaluation, à la loupe binoculaire, de 02 embryons décongelés indique que ceux-ci peuvent être légèrement affectés dans leur qualité (Dégénérescence ou détachement de quelques blastomères de la masse cellulaire interne) durant l'opération de congélation/décongélation tout en restant transférables. Au 21<sup>ème</sup> jour post-œstrus (12 jours après transfert), la progestéronémie a révélé un diagnostic de gestation positif chez 02 receveuses d'embryons (14,87 ng/ml et 8,31 ng/ml). Au 56<sup>ème</sup> et 60<sup>ème</sup> jour post transfert le diagnostic de gestation était négatif suggérant une forte probabilité d'une mortalité embryonnaire tardive.

Les résultats de notre travail suggèrent pour la première fois, à notre connaissance, qu'il est possible de congeler des embryons bovins en Algérie au vue d'une gestation au 21<sup>ème</sup> jour. Tenant compte de l'intérêt qu'offre la congélation des embryons en termes de préservation d'animaux d'élite et de sauvegarde du patrimoine génétique des races locales sous forme de banques d'embryons, d'autres études, plus approfondies, s'avèrent nécessaires.

**Mots clés :** Congélation lente, Ethylène Glycol, superovulation, transfert embryonnaire, embryons bovins.

## Abstract

The aim of our study was to develop a method of "slow freezing" of bovine embryos using ethylene glycol.

For this aim, 16 embryos donors were selected and superovulated: 13 local breed superovulated using FSHp 40% (32 mg and 40 mg) and 3 improved breed superovulated with PMSG (2500 IU). Seven (07) days post-insemination, embryos were recovered which 04 were frozen in a curve of cooling down in 03 steps: i) + 20 ° C to -7 ° C with a cooling rate of -3 ° C / min, ii) -7 ° C for 10 seconds for *Seeding*, iii) from -7 to -35 ° C with a rate of -0.5 ° C / min. The straws containing embryos were, then, plunged into the liquid nitrogen at -196 ° C for storage. Once thawed, 02 embryos were transferred directly to the recipient previously prepared and 02 others were assessed for quality before transfer.

Our results show an early onset of estrus from superovulation following injection of PGF2 $\alpha$  in the local breed (37.27  $\pm$  2.39) and good response to the superovulation treatment using the FSHp (20CJ/donor). Assessment of 02 thawed embryos quality with the binocular microscope

indicates that these may be slightly affected in their quality (degeneration or detachment of few blastomeres of the inner cell mass) during the freezing / thawing operation while remaining transferable. At day 21 post-estrus (12 days after transfer), progesterone levels showed a positive pregnancy diagnosis in 02 recipients of embryos (14.87 ng / ml and 8.31 ng / ml). On the 56<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> day post-transfer the pregnancy diagnosis was negative suggesting a high probability of late embryonic mortality.

Our results suggest, for the first time in our knowledge, it is possible to freeze bovine embryos in Algeria despite the failure of pregnancy that was observed after their transfer. Given the interest offered by the freezing of embryos in terms of preservation of elite animals and safeguard the genetic heritage of local breeds in the form of embryo banks, other studies seems to be necessary

**Key words:** Slow freezing, ethylen glycol, superovulation, embryo transfer, bovine embryos.

### ملخص

الهدف من دراستنا هو تطبيق طريقة "التجميد الهطيء" للأجنة الأبقار باستعمال الإثيلين جلايكول.

لهذا ، تم اختيار 16 مانحة للأجنة : 13 من السلالة المحلية خضعت لعلاج فرط الإباضة ب 40% FSHp (32 ملغ و 40 ملغ) و 3 من السلالة المحسنة خضعت لعلاج فرط الإباضة بال PMSG (2500 وحدة دولية). 7 أيام بعد التلقيح ، تحصد الأجنة التي تم تجميد 4 منها حسب منحى تبريد الذي يمر ب 03 مراحل هي كالتالي : 1) من + 20 م° إلى - م° مع سرعة تبريد -3 م° / دقيقة ، 2) -7 م° لمدة 10 ثانية لتحريرىض التجميد ، 3) من -7 إلى -35 م° مع سرعة تبريد -0.5 م° / دقيقة. ترمى بعد ذلك الأجنة في النيتروجين السائل في - 196 م° للتخزين، بعد الإذابة، يتم نقل 02 من الأجنة مباشرة المستقبلات المعدة مسبقا وقد تم تقييم جودة 02 أخرى قبل نقلها.

نتائجنا تظهر بداية مبكرة لشبق فرط الإباضة بعد حقن  $PGF2\alpha$  السلالة المحلية ( $2.39 \pm 37.27$ ) ، واستجابة جيدة لعلاج فرط الإباضة باستخدام FSHp (20 جسم أصفر لكل مانحة). التقييم ، المهجري ، ل02 من الأجنة المذابة يشير إلى أن هذه الأخيرة قد نُشرت قليلا في نوعيتها (اضمحلال أو خروج بعض الخلايا من كتلة الخلايا الداخلية) خلال عملية تجميد / ذوبان في حين تبقى قابلة للنقل. في يوم 21 بعد شبق (12 يوما بعد نقل) ، وأظهرت مستويات البروجسترون تشخيص الحمل الإيجابي لدى (02) مستقبلتين من الأجنة (14،87 نانوغرام / مل و 8.31 نانوغرام / مل). في 56 و 60 يوم بعد النقل ، تشخيص الحمل كان سلبيا مما يشير إلى فرضية الموت المتأخر للأجنة .

نتائج عملنا توحى ، لأول مرة حسب علمنا ، أنه من الممكن تجميد أجنة الأبقار في الجزائر على الرغم من فشل الحمل بعد نقلهم. وبالنظر إلى الفائدة التي تقدمها تجميد الأجنة من حيث الحفاظ على الحيوانات النخبة وحماية التراث الجيني للسلالات المحلية على شكل بنوك للأجنة، دراسات أخرى معمقة، تبدو ضرورية.

كلمات مفتاح: تجميد بطى، اثيلان جلايكول، جنين البقر، فرط الإباضة، نقل الاجنة.

## Liste des abréviations

<b>AETA:</b> American Embryo Transfer Association	<b>I.E.T.S:</b> International Embryo Transfer Society
<b>AFPs:</b> Anti-Freez Protein	<b>IGF-1 :</b> Insulin-like Growth Factor 1
<b>BSA :</b> Bovine Serum Albumin	<b>LH :</b> Luteinising Hormone
<b>CETA :</b> Canadian Embryo Transfer Association	<b>LN2 :</b> Liquid Nitrogen
<b>CJ :</b> Corps Jaune	<b>M :</b> molaire
<b>CO2 :</b> dioxyde de carbone	<b>N2 :</b> dioxyde d'azote
<b>CPs :</b> Cryoproteurs	<b>OPS :</b> Open Pulled Straw
<b>D :</b> Dalton	<b>OPU :</b> Ovum Pick-Up
<b>DBS :</b> Donor Bovine Serum	<b>P4 :</b> Progestérone
<b>DMSO :</b> diméthyl-sulfoxyde	<b>PBS :</b> Phosphate Buffer Solution
<b>E2 :</b> Oestradiol-17 $\beta$	<b>PGF2 :</b> Prostaglandine F2
<b>eCG :</b> equin Chorionic Gonadotrophin	<b>PM :</b> Poids Moléculaire
<b>EG :</b> Ethylene glycol	<b>PMSG :</b> Pregnant Mare Serum Gonadotropin
<b>FBS :</b> Fetal Bovine Serum	<b>PRID:</b> Progesterone Releasing Intravaginal Device
<b>FSH :</b> Folliculo Stimulating Hormone	<b>PROH :</b> 1,2 propane-diol
<b>GnRH :</b> Gonadotropin Releasing Hormone	<b>TCM-199 :</b> Tissue Culture Media-199
<b>hCG :</b> human Chorionic Gonadotropin	

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Régulation des gonadotrophines .....	01
<b>Figure 2:</b> Cycle œstral chez la vache.....	01
<b>Figure 3:</b> Coupe histologique d'un ovaire .....	04
<b>Figure 4:</b> Schématisation de la croissance des follicules gonado- dépendants et sa régulation hormonale durant le cycle œstrale.....	06
<b>Figure 5:</b> Les trois étapes qui caractérisent la croissance folliculaire durant la phase gonado- dépendante.....	06
<b>Figure 6:</b> Coupe histologique d'un follicule mature préovulatoire avec ses divers éléments.....	06
<b>Figure 7:</b> Ovocyte II.....	06
<b>Figure 8:</b> Description des différents traitements de superovulation couramment utilisés chez les bovins .....	09
<b>Figure 9:</b> Les séquences de fécondation .....	11
<b>Figure 10:</b> Développement et migration de l'embryon bovin .....	11
<b>Figure 11:</b> Les premiers stades du développement embryonnaire .....	12
<b>Figure 12:</b> Position d'un ballonnet dans la corne utérine.....	13
<b>Figure 13:</b> Géométrie et répartition de charges de la molécule d'eau .....	15
<b>Figure 14:</b> Liaisons H entre les molécules d'eau et sa structure tétraédrique.....	15
<b>Figure 15:</b> Courbe de congélation de l'eau.....	16
<b>Figure 16:</b> Courbe de la congélation d'une solution aqueuse.....	16
<b>Figure 17:</b> Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement .....	18
<b>Figure 18:</b> Formation des cristaux extracellulaire .....	18
<b>Figure 19:</b> Embryon humain déshydraté.....	21
<b>Figure 20:</b> La Place d'un embryon dans une paillette .....	31
<b>Figure 21:</b> La courbe de congélation lente pour les embryons.....	32
<b>Figure 22:</b> Comparaison entre la paillette traditionnelle 0,25 ml et l'oppen pulled straw ...	37
<b>Figure 23:</b> Schéma représente la différence entre la congélation lente et la vitrification....	38
<b>Figure 24:</b> Protocole de traitement de superovulation des donneuses de la race locale par la FSHp sur un cycle issu d'une synchronisation des chaleurs par l'implant .....	49
<b>Figure 25:</b> Protocole de superovulation de races améliorées.....	50
<b>Figure 26:</b> Insémination artificielle chez les donneus .....	51
<b>Figure 27:</b> Anesthésie épidurale (photo personnelle).....	52
<b>Figure 28:</b> Collecte des embryons bovins.....	53
<b>Figure 29:</b> Schéma de la technique de recherche d'embryons dans une boîte de pétri .....	55
<b>Figure 30:</b> Congélation des embryons bovins .....	55
<b>Figure 31:</b> Schéma de conditionnement d'un embryon dans une paillette .....	56
<b>Figure 32:</b> Courbe de congélation lente des embryons bovins.....	57
<b>Figure 33:</b> Le protocole de préparation des receveuses pour les embryons congelés.....	57
<b>Figure 34:</b> Transfert des embryons bovins aux receveuses .....	58
<b>Figure 35:</b> Décongélation des embryons .....	58
<b>Figure 36:</b> Évolution de BCS des donneuses de race locale pendant la supplémentation....	61
<b>Figure 37:</b> Ovaire d'une génisse avec plusieurs corps jaunes .....	63

<b>Figure 38:</b> Taux moyens de volume aspiré/corne .....	64
<b>Figure 39:</b> Taux d'embryons collecté par rapport au nombre de corps jaunes.....	65
<b>Figure 40:</b> Différents stades d'embryons collectés.....	66
<b>Figure 41:</b> Jeune blastocyste décongelé.....	67
<b>Figure 42:</b> Taux de réponse en fonction du nombre des follicules anovulatoires.....	69
<b>Figure 43:</b> Taux de liquide aspiré pour chaque génisse .....	70
<b>Figure 44:</b> Taux d'embryons collecté par rapport au nombre de corps jaunes.....	70
<b>Figure 45:</b> Embryons collectés de la race améliorée .....	71
<b>Figure 46:</b> Morula avant et après la congélation.....	71

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Rappel de principales caractéristiques et fonctions des hormones du cycle œstral chez la vache.....	02
<b>Tableau 2:</b> Tableau récapitulatif de la croissance folliculaire chez la vache .....	05
<b>Tableau 3 :</b> Signes observables en fonction de la période de cycle .....	10
<b>Tableau 4:</b> Chronologie du développement de l'embryon bovin.....	11
<b>Tableau 5:</b> Différents stades d'embryons collectés .....	14
<b>Tableau 6:</b> Classification des embryons selon leur qualité .....	15
<b>Tableau 7 :</b> Classification des cryoprotecteurs .....	20
<b>Tableau 8 :</b> Différentes techniques de vitrification chez les embryons des mammifères	37
<b>Tableau 9 :</b> Comparaison entre la congélation lente et la vitrification .....	38
<b>Tableau 10:</b> Les différents protocoles de réchauffement des embryons congelés lentement.....	40
<b>Tableau 11 :</b> Différents protocoles de réchauffement des embryons vitrifiés .....	40
<b>Tableau 12 :</b> Utilisation de saccharose pour diluer les embryons vitrifiés .....	41
<b>Tableau 13 :</b> transfert direct des embryons et l'utilisation de saccharose pour diluer des embryons congelé lentement.....	41
<b>Tableau 14 :</b> Donneuses de la locale race .....	43
<b>Tableau 15 :</b> Donneuses de la race améliorées .....	44
<b>Tableau 16 :</b> Les receveuses pour les embryons congelés .....	44
<b>Tableau 17:</b> Les doses des produits de la préparation des animaux .....	47
<b>Tableau 18 :</b> Les doses des hormones de synchronisation.....	48
<b>Tableau 19:</b> Quantité des doses de la FSHP pour la race locale.....	48
<b>Tableau 20:</b> Les doses de D-PBS injectés par corne.....	53
<b>Tableau 21 :</b> Protocole de congélation des embryons bovins .....	56
<b>Tableau 22 :</b> Évolution du poids et de l'état corporel chez les donneuses de race locale .....	60
<b>Tableau 23:</b> Délais d'apparition des chaleurs chez les donneuses après injection de PGF $\alpha$ 2 .....	61
<b>Tableau 24:</b> Réponses au traitement de superovulation.....	62
<b>Tableau 25:</b> Volumes de liquide de PBS injecté et aspiré .....	63
<b>Tableau 26:</b> Réponses au traitement de superovulation et les structure collectés .....	64
<b>Tableau 27:</b> Résultats de transfert des embryons congelés.....	68
<b>Tableau 28:</b> Distribution des organites dans les ovaires issus du traitement de superovulation via la PMSG .....	68
<b>Tableau 29 :</b> Taux des génisses ayant des follicules dans leurs ovaires .....	69
<b>Tableau 30:</b> Taux de liquide aspiré.....	69
<b>Tableau 31:</b> Réponse au traitement de superovulation et les structures collectés .....	70
<b>Tableau 32:</b> Résultats de transfert de l'embryon congelé.....	72

## SOMMAIRE

<b>I. Introduction .....</b>	<b>01</b>
I.1. Historique.....	01
I.2. Évolution commerciale de la congélation et du transfert d'embryon dans le monde.....	02
I.3. Cycle œstral chez la vache.....	03
I.4. Folliculogenèse.....	04
I.4.1. L'ovaire.....	04
I.4.2. Folliculogenèse « proprement dite ».....	04
I.4.3. Formation du corps jaune.....	06
I.4.4. Atrésie folliculaire.....	07
I.5. Production d'embryons.....	07
I.5.1. Principe du traitement de superovulation.....	08
I.5.2. Hormones du traitement de superovulation.....	08
I.5.2.1. Equin chorionic gonadotrophin « eCG ».....	08
I.5.2.2. Follicule stimulating hormone « FSH ».....	08
I.5.3. Variabilité des réponses au traitement de superovulation.....	09
I.5.4. Protocoles des traitements de superovulation.....	09
I.5.5. Observation des chaleurs et l'insémination artificielle.....	10
I.5.5.1. Les signes des chaleurs.....	10
I.5.5.2. Détection des chaleurs.....	10
I.5.5.3. Insémination artificielle.....	10
I.5.6. Fécondation.....	10
I.5.7. Développement précoce de l'embryon.....	12
I.5.8. La collecte.....	12
I.5.9. Stade optimale pour le transfert frais et la cryoconservation.....	13
I.5.10. Classification des embryons collectés.....	14
I.6. Cryoconservation des embryons.....	14
I.6.1. Les bases de cryobiologie.....	14
I.6.1.1. Les bases physiques de l'eau.....	14
I.6.1.2. Comportement de la cellule pendant la congélation.....	15
I.6.1.2.1. Effet du refroidissement sur la cellule.....	15
I.6.1.2.2. Effet de l'état de surfusion et la température de la nucléation sur la cellule.....	16
I.6.1.2.2.1. État de surfusion.....	16

I.6.1.2.2.2. La nucléation .....	16
I.6.1.2.2.3. Formation des cristaux de glace .....	16
I.6.1.2.2.4. Plateau de cristallisation .....	17
I.6.1.2.3. Effet de la vitesse de refroidissement sur la cellule .....	18
I.6.1.2.3.1. Refroidissement très lent .....	18
I.6.1.2.3.2. Refroidissement rapide .....	18
I.6.1.2.3.3. Refroidissement correspondant au pic de survie .....	19
I.6.1.2.3.4. Refroidissement ultrarapide (vitrification) .....	19
I.6.2. Cryoprotecteurs .....	19
I.6.2.1. Définition .....	20
I.6.2.2. Cryoprotecteurs pénétrants la cellule .....	20
I.6.2.3. Les cryoprotecteurs non pénétrants .....	20
I.6.2.4. Mode d'action .....	20
I.6.2.5. Choix des cryoprotecteurs .....	22
I.6.2.6. Composants supplémentaires .....	23
I.6.2.7. Préparation des solutions de cryoconservation .....	24
I.6.3. Lésions de l'embryon durant la cryoconservation .....	25
I.6.3.1. Lésions pendant la congélation .....	25
I.6.3.2. Lésions pendant le réchauffement .....	27
I.6.3.3. Toxicité des Cryoprotecteurs .....	28
I.6.4. Congélation lente .....	30
I.6.4.1. Définition .....	30
I.6.4.2. Conditions de la congélation lente .....	30
I.6.4.3. Étapes de la congélation lente .....	32
I.6.4.3.1. Équilibre entre l'embryon et le cryoprotecteur .....	32
I.6.4.3.2. Contrôle de la vitesse de refroidissement .....	32
I.6.4.3.2.1. Vitesse de refroidissement : température ambiante-seeding	32
I.6.4.3.2.2. Seeding .....	32
I.6.4.3.2.3. Vitesse de refroidissement .....	32
I.6.4.3.2.4. Le stockage .....	33
I.6.4.4. Avantages de la congélation lente .....	33
I.6.4.5. Inconvénients de la congélation lente .....	33
I.6.4.6. Utilisation sur le terrain .....	34
I.6.5. Vitrification .....	35
I.6.5.1. Définition .....	35

I.6.5.2. Conditions de la vitrification .....	35
I.6.5.3. Mécanisme d'obtention de l'état vitreux .....	37
I.6.5.4. Les avantages de la vitrification .....	37
I.6.5.5. Les inconvénients de la vitrification .....	38
I.6.5.6. Utilisation sur le terrain .....	39
I.6.6. La décongélation des embryons .....	39
I.6.6.1. Le réchauffement des embryons .....	39
I.6.6.2. L'enlèvement de cryoprotecteurs pendant la décongélation .....	40
I.7. Problématique et objectifs .....	41
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>43</b>
II.1. Matériel .....	43
II.2. Méthodes .....	46
II.2.1. Alimentation .....	46
II.2.2. Préparation et traitement des animaux .....	47
II.2.3. Synchronisation et superovulation des animaux .....	47
II.2.3.1. Synchronisation et superovulation des donneuses de la race locale	47
II.2.3.2. Superovulation de la race améliorée .....	50
II.2.4. Insémination artificielle .....	50
II.2.5. Collecte des embryons .....	51
II.2.6. Décantage .....	53
II.2.7. Siphonage .....	54
II.2.8. Observation et manipulations des embryons .....	54
II.2.9. Congélation des embryons .....	55
II.2.10. Transfert des embryons congelés .....	57
II.2.11. Diagnostic de gestation .....	59
<b>III. Résultats et discussion .....</b>	<b>60</b>
<b>III.1. Résultats</b> .....	<b>60</b>
III.1.1. Donneuses de race locale .....	60
III.1.1.1. Evolution de l'état corporel .....	60
III.1.1.2. Chaleurs des donneuses .....	61
III.1.1.3. Réponse au traitement de superovulation .....	62
III.1.1.4. Volume de liquide aspiré .....	63
III.1.1.5. Embryons collectés .....	64
III.1.1.6. Devenir des embryons collectés .....	67
III.1.1.7. Décongélation des embryons .....	67

III.1.1.8. Résultats du transfert .....	68
III.1.2. Résultats pour la race améliorée .....	68
III.1.2.1. Réponses au traitement de super ovulation .....	68
III.1.2.2. Volume de liquide injecté et aspiré durant la collecte .....	69
III.1.2.3 Nombre d'embryons collectés .....	70
III.1.2.4. Qualité de l'embryon après la décongélation .....	71
III.1.2.5. Résultats de transfert de l'embryon congelé .....	72
<b>III.2. Discussion générale.....</b>	<b>73</b>
III.2.1. Sur la méthodologie de travail .....	73
III.2.2. Sur les résultats .....	75
III.2.2.1. Chaleur de superovulation .....	75
III.2.2.2. Réponse au traitement de superovulation par la PMSG .....	76
III.2.2.3. Réponse au traitement de superovulation par la FSHp .....	77
III.2.2.4. Décongélation des embryons .....	77
III.2.2.5. Résultats du transfert .....	78
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>81</b>
<b>V. Recommandations et perspectives .....</b>	<b>82</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## I. Introduction

### I.1. Historique

En 1949, Polge *et al.*, ont découvert, après la décongélation des spermatozoïdes congelés au moyen d'un cryoprotecteur, le glycérol, que le taux de survie augmente. Suite à cette découverte, la cryoconservation de plusieurs types de cellules est devenue possible. Cependant, les protocoles de congélation développés pour les petites cellules telles que les spermatozoïdes, n'étaient pas efficaces sur les embryons à cause du volume liquidien important représenté par le blastocœle et les cytoplasmes des blastomères. De ce fait, la probabilité de formation des cristaux de glaces intracellulaires est fortement élevée causant des dommages létaux pour les cellules assujetties à la cryoconservation.

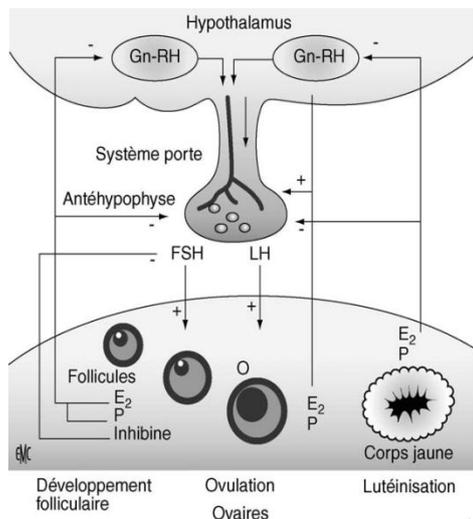
En 1972, Whittingham *et al.*, ont rapporté une naissance d'un souriceau vivant issu de transfert du premier embryon (morula) congelé. En effet, ils ont utilisé une faible concentration de cryoprotecteur, approximativement 1 mole de DMSO, à une vitesse de refroidissement lente (0,2 à 0,5 °C /minute). A la température de -80 °C, les embryons ont été stockés dans l'azote liquide. Le transfert faisait suite à une décongélation lente (4 à 25°C/min). Cette méthode originale de congélation lente a montré également une efficacité vis-à-vis des embryons bovins (Wilmot and Rowson, 1973) et humains (Trounson *et al.*, 1983). Une autre méthode alternative dite méthode conventionnelle basée sur une décongélation rapide (360 °C/minute) a vu le jour (Willadsen *et al.*, 1977). Cette dernière permet de réduire la durée de congélation en immergeant l'embryon à -30°C dans l'azote liquide. Actuellement, cette méthode conventionnelle de la congélation lente est largement utilisée pour conserver les embryons des mammifères.

En 1985, Rall et Fahy ont innové une nouvelle méthode de congélation dite vitrification, dont les embryons sont exposés à une concentration élevée de cryoprotecteurs puis immergés directement dans l'azote liquide (-196 °C). Cette immersion génère un refroidissement rapide à l'origine d'un état amorphe dit « vitreux » empêchant, complètement, la formation des cristaux de glace intra et extracellulaires responsables des lésions.

Récemment, des modifications dans la méthode de vitrification ont permis, via une diminution du volume de la solution de vitrification, d'atteindre des vitesses de congélation/décongélation ultrarapides. Cette approche est réservée, dans la plupart des cas, pour les embryons ayant une sensibilité élevée aux lésions de refroidissement et de formation des cristaux de glace (Vajta *et al.*, 2006).

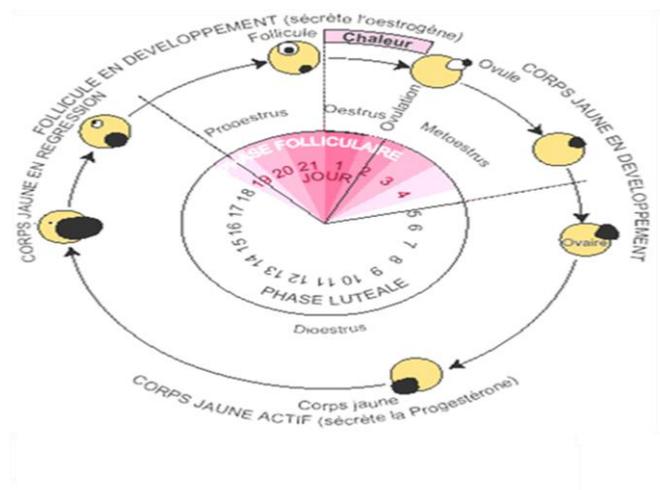
**Tableau 1 :** Rappel de principales caractéristiques et fonctions des hormones du cycle œstral chez la vache (Brassard *et al.*, 1997).

Gn-RH	<b>Gonadotropin releasing hormone</b>	E2	<b>Œstrogène</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétée de façon pulsatile par l'hypothalamus</li> <li>• Induit la sécrétion de la FSH et LH par l'hypophyse</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétée par le follicule dominant</li> <li>• Stimule la lutéolyse en augmentant le</li> </ul>
FSH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Follicle stimulating hormone</li> <li>• Sécrétée par l'hypophyse</li> <li>• Essential à la survie et à la croissance folliculaire</li> <li>• Il ya un pic de FSH avant de l'ovulation</li> <li>• Permet de conversion des androgènes en E2</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• nombre des récepteurs d'ocytocine</li> <li>• Stimule la sécrétion de GnRH par</li> <li>• l'hypothalamus</li> <li>• Stimule la sécrétion de LH par l'hypophyse</li> <li>• Augmente la sensibilité du follicule à la</li> <li>• FSH</li> <li>• Augmente la réponse du follicule à la LH</li> </ul>
LH	<b>Luteinizing hormone</b>	Oc	<b>Ocytocine</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétée de façon pulsatile par l'hypophyse</li> <li>• Il ya un pic de LH avant de l'ovulation</li> <li>• Lutéanise les cellules du follicule</li> <li>• Stimule le follicule à produire de P4 et des androgènes</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétée par l'hypophyse et le corps jaune</li> <li>• Induit la sécrétion de PGF2<math>\alpha</math> par l'endomètre</li> <li>• Déclenche la lutéolyse</li> </ul>
P4	<b>Progestérone</b>	PGF2 $\alpha$	<b>Prostaglandine 2</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétée par un corps jaune</li> <li>• Inhibe la libération de GnRH</li> <li>• Inhibe la libération de LH par l'hypophyse</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécrétée par les cellules de l'endomètre</li> <li>• Lyse de corps jaune</li> </ul>



**Figure 1 :** Régulation des gonadotrophines (Dubest *et al.*, 2005)

Gn-RH : gonadotropin releasing hormone ; FSH : follicle stimulating hormone ; LH : luteinizing hormone ; E2 : estradiol ; P : progestérone.



**Figure 2 :** Cycle œstral chez la vache (giroud, 2007)

## **I.2. Évolution commerciale de la congélation et du transfert d'embryon dans le monde**

La commercialisation des embryons est devenue possible depuis la réussite de leur congélation en 1973 (Wilmut and Rowson, 1973). Les années suivantes, les premiers échanges d'embryons bovins de race exotique étaient effectués entre l'Amérique du Nord et l'Europe (Hasler, 2003). Au milieu des années 80, les Pays-Bas ont importé 2450 embryons congelés de la vache de la race Holstein américaine pour améliorer leur race locale Frison Hollandaise (Hasler, 2003). De plus, depuis l'adoption d'une méthode de congélation permettant un transfert direct des embryons, en éliminant certaines étapes de manipulation (réhydratation, évaluation de la qualité..), la commercialisation des embryons bovins a augmenté (Voeklel et Hu (1992).

D'après, l'AETA (American Embryo Transfer Association) et la CETA (Canadian Embryo Transfer Association), l'Amérique du Nord exporte 30.000 à 40.000 embryons par an (Hasler, 2003) et 571.000 embryons (frais et congelés) sont transférés chaque année (Thibier, 2001). En Europe, 106.499 embryons ont été transférés en 1989 (dont la France occupe la première place avec 25.788 embryons transférés dont 45% d'embryons congelés) (Thibier et Nibart, 1992). Enfin, le Brésil est le seul pays qui connaît un développement rapide dans les activités de transfert embryonnaire : de 40.000 en 1995 à 75.000 transferts en 1999. La même année, l'importation de 1.950 embryons de l'Amérique du Nord a été enregistrée (Hasler, 2003).

## **I.3. Cycle œstral chez la vache**

La vache est une espèce polyœstrienne de type continu avec une durée moyenne de cycle de 21 jours. La durée des chaleurs est de 18 à 20 heures avec une ovulation spontanée de 10 à 12 h après la fin des chaleurs soit 30 heures après le début des chaleurs (Rathbone *et al.*, 2001).

En fonction des structures présentes dans l'ovaire, le cycle œstral de la vache est divisé en 2 phases, une lutéale et l'autre folliculaire (Figure n° 2) (Rathbone *et al.*, 2001 ; Macmillan *et al.*, 1996). La régulation hormonale du cycle oestral de la vache est régit par des hormones de l'hypothalamus (GnRH), de l'antéhypophyse (FSH, LH), de l'ovaire (progestérone, l'œstrogène et l'inhibine) et de l'utérus (prostaglandine) (Tableau n° 1 et Figure n° 1) (Dubest *et al.*, 2005).

Les modifications hormonales durant le cycle permettent de distinguer 2 périodes pour chaque phase (Rathbone *et al.*, 2001 ; Macmillan *et al.*, 1996).

### **I.3.1. Phase lutéale (corps jaune actif)**

#### **I.3.1.1. Post-œstrus (ou met-œstrus) (J1-J5)**

Le post-œstrus fait suite à l'ovulation. Il permet la mise en place d'un corps jaune qui se développe en sécrétant de la progestérone (Adams *et al.*, 2001). Pendant cette période de croissance, le corps jaune est insensible à l'hormone de la lutéolyse (PGF2 $\alpha$ ) (Rathbone *et al.*, 2001). L'augmentation de la concentration de FSH juste après l'ovulation aboutit à l'initiation de la 1<sup>ère</sup> vague folliculaire (Edqvist *et al.*, 1997).

#### **I.3.1.2. Di-œstrus (J5-J18)**

Pendant cette période, on note une sécrétion maximale de la progestérone. Celle-ci exerce un feed-back négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. De la sorte, elle induit l'atrésie du follicule dominant de la 1<sup>ère</sup> vague folliculaire et de la 2<sup>ème</sup> vague dans le cas où le cycle contient 3 vagues (Adams *et al.*, 2001 ; Forde *et al.*, 2010). En raison de l'absence de signaux embryonnaires (gestation), le corps jaune se lyse en sécrétant l'ocytocine qui, via des récepteurs utérins, stimule l'endomètre pour la sécrétion de l'hormone de la lutéolyse, la PGF2 $\alpha$  (Edqvist *et al.*, 1997 ; Forde *et al.*, 2010).

### **I.3.2. Phase folliculaire (corps jaune régressé)**

#### **I.3.2.1. Pro-œstrus (J18-J21)**

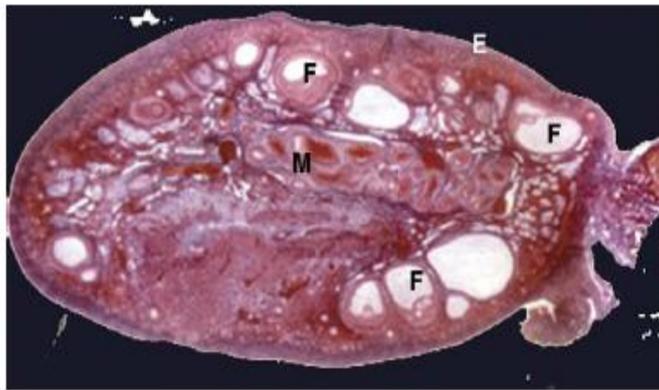
Elle commence avec la régression du corps jaune du 16<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour du cycle (Rathbone *et al.*, 2001) permettant au follicule dominant de la 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> vague de continuer sa croissance accompagnant l'augmentation de la sécrétion folliculaire de l'E2.

#### **I.3.2.2. Œstrus (J21-J1)**

L'augmentation de la concentration plasmatique de E2 faisant suite à la croissance du follicule dominant et la diminution de la concentration de P4 induisent la décharge de la GnRH. Cette dernière stimule la sécrétion pulsatile de LH, survenant toutes les 40 à 70 minutes, conduisant à une ovulation (10 à 14 heures après la fin des chaleurs) et à la formation du corps jaune qui caractérise le début de la phase lutéale (Forde *et al.*, 2010).

## **I.4. Folliculogénèse**

Comme la plupart des activités physiologiques de la reproduction chez la vache non gestante surviennent dans l'ovaire, un rappel anatomique sur ce dernier et sur la physiologie de



**Figure 3:** Coupe histologique d'un ovaire normal montrant les trois couches fondamentales(Bazot et al.,2004). E : épithélium de surface ; F : follicules ; M : mésenchyme

la folliculogénèse permet de connaître les différentes modifications physiologiques durant le cycle œstral et de comprendre la réponse de l'animal vis-à-vis d'un traitement hormonal.

#### **I.4.1. L'ovaire**

L'ovaire est un organe paire, situé dans le bassin, avec une double fonction exocrine (production des ovocytes) et endocrine (production des hormones principalement les stéroïdes) (Bazot *et al.*, 2004). Il est constitué de l'extérieur à l'intérieur par les trois structures suivantes :

- **L'épithélium germinatif superficiel** qui est en continuité avec le péritoine. Sa face intérieure est plus ou moins fibreuse dite albuginée.
- **Cortex** : c'est une zone périphérique qui abrite les follicules à différents stades de la croissance. Toutes les étapes de la folliculogénèse sont réalisées dans le stroma très dense de cette zone (Figure n° 3).
- **Medulla** : ou zone centrale, elle est bien vascularisée constituant un tissu ovarien nutritionnel et de soutien (Leung *et al.*, 2004).

#### **I.4.2. Folliculogénèse « proprement dite »**

Le succès du transfert embryonnaire dépend principalement du traitement de superovulation qui vise à induire une maturation simultanée de plusieurs follicules via la stimulation de la folliculogénèse (Ectors *et al.*, 1989). Cette dernière se définit comme l'ensemble des processus de multiplication, de croissance et de maturation folliculaire entre le stade du follicule primordial et l'ovulation (Bazot *et al.*, 2004).

##### **I.4.2.1. Multiplication**

Pendant la vie fœtale, les ovogonies entrent en mitose puis en méiose (Hanzen *et al.*, 2000). Cette dernière s'interrompt au stade prophase 1 formant des ovocytes 1. Seulement les ovocytes 1 qui s'entourent par une couche de cellules somatiques et une membrane basale, future membrane de Slavjanski, composent des follicules primordiaux (Drion *et al.*, 1996). Durant cette période de multiplication, un nombre d'ovogonies et des follicules primordiaux subissent une dégénérescence. La multiplication des ovogonies et les modifications morphologiques de l'ovocyte 1 se terminent par un stock de 235.000 follicules primordiaux avant la naissance chez la vache (Hanzen *et al.*, 2000).

##### **I.4.2.2. La croissance folliculaire et sa régulation hormonale**

Chez les bovins, peu après la naissance, 50 à 80 follicules primordiaux quittent le stock chaque jour pour former les follicules tertiaires. Ce nombre augmente jusqu'à 120 follicules puis décline par la suite pour stabiliser à la puberté aux alentours de 80 follicules par jour (Hanzen,

**Tableau 2** : Tableau récapitulatif de la croissance folliculaire chez la vache (Hanzen et al., 2000 ; Ectors et al 1989 ; Hyttel *et al.*, 1997).

Follicule	Diamètre du follicule en $\mu\text{m}$	Diamètre de l'ovocyte en $\mu\text{m}$	Caractéristiques	Contrôle hormonale
<i>Follicule primordial</i>	34,6 $\pm$ 3,7	27,9 $\pm$ 3,3	Ovocyte, bloqué au prophase 1, entouré par un nombre variable des cellules aplaties ou rondes.	Phase : Non gonado-dépendante (facteurs intra-ovariens tels que IGF-1, FGF, TGFB...)
<i>Follicule primaire</i>	46,1 $\pm$ 6,1	31,6 $\pm$ 4,3	Organisation des cellules folliculaires en seule couche régulière de cellules cubiques, Apparition d'une couche hyaline entoure l'ovocyte, appelée la zone pellucide, constituée de glycoprotéines synthétisées par l'ovocyte, ZP1, ZP2 et ZP3 sont trois majeures glycoprotéines qui forment la zone pellucide, dont ZP3 est la seule reconnue par le spermatozoïde lors la fécondation.	
<i>Follicule secondaire</i>	101,7 $\pm$ 41,8	45,6 $\pm$ 14,0	Zone pellucide est très bien différenciée, 2 à 3 couches de cellules cubiques entourent l'ovocyte, L'ensemble est entouré par une membrane basale dite Slavjanski ;	
<i>Follicule tertiaire</i>	3 mm à 4 mm	100 à 110	Appelé aussi cavitaire en raison de l'apparition des petites cavités remplies par un transsudat plasmatique et les sécrétions des cellules folliculaires, Formation une seule cavité ou antrum par la confluence des petites cavités, L'antrum sépare les cellules de granulosa et les cellules qui porte l'ovocyte à l'intérieur du follicule forme le cumulus oophorus, ainsi les cellules qui entoure directement l'ovocyte se différenciées en formant la corona radiata qui constitue, via les GAP junctions entre elles et leurs projections qui pénètrent la zone pellucide, un lien de communication entre l'ovocyte et l'antrum, Le follicule est entouré par deux couches, une s'appelle la thèque interne qui intervient dans la stéroïdogénèse, l'autre appelé la thèque externe formée de tassement du tissu conjonctif du stroma ovarien.	Phase : Gonado-dépendante
<i>Follicule mûr</i>	10 à 25 mm		S'appelle aussi follicule de GRAAF ou préovulatoire Les deux thèques interne est externe sont bien différenciées, ainsi que la membrane Slavjanskiest bien visible. La thèque interne devient une glande, l'autre devient une couche fibreuse Augmentation dans le nombre des cellules folliculaires et dans le volume de la cavité folliculaire par le liquide folliculaire.	

IGF : Insuline growth factor ; FGF : Facteur de croissance fibroblastique, TGFB : transforming growth factor

2000). Durant cette période prépubertaire notamment entre le 7ème et le 12ème du mois, la croissance des follicules se manifeste comme chez la vache c'est-à-dire croissance par vague (Hanzen, 2000). A la naissance, les follicules de la velle vont subir une atresie et quelques uns d'entre eux serviront à la reproduction (Ectors *et al.*, 1989). Classiquement, la régulation hormonale de la folliculogenèse est divisée en deux phases (Ectors *et al.*, 1989) :

#### **I.4.2.2.1. Phase non gonado-dépendante**

Pendant cette phase, 50 à 80 follicules primordiaux quittent la réserve pour former des follicules primaires, secondaires puis tertiaires (Tableau n° 2). Certains, parmi eux, subissent une atresie à différents stades (Thibault, 2001). Cette phase, qui dure approximativement 6 mois, est régie par un complexe endocrinien, notamment, des facteurs de croissance locaux (Bendell, 1990 ; Roche *et al.*, 1998).

#### **I.4.2.2.2. Phase gonado-dépendante**

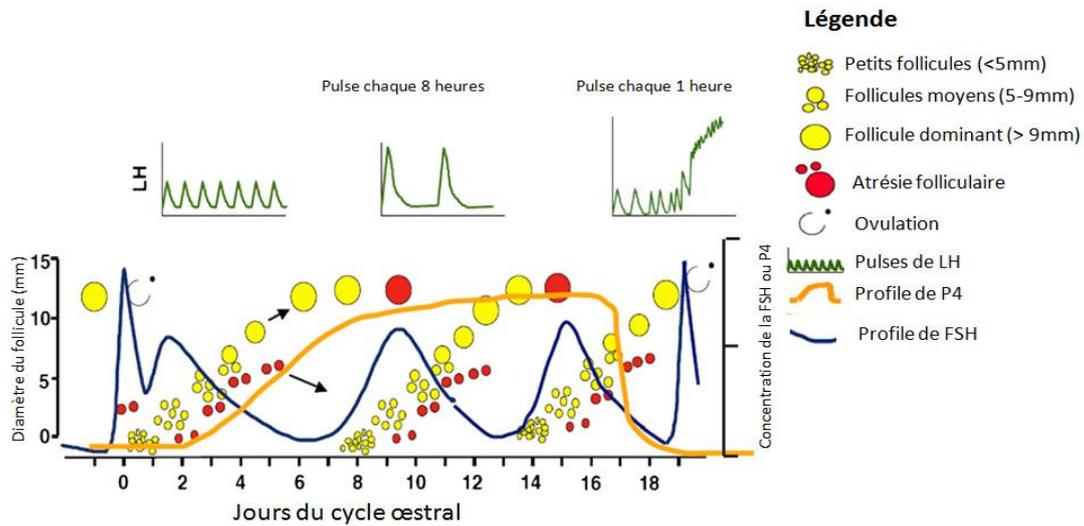
Durant cette phase, les follicules tertiaires ayant un diamètre  $\geq 4$  mm entrent en croissance cyclique par groupe dite vague folliculaire (Hanzen, 2000). Chez la vache, le cycle œstral comporte 2 à 3 vagues folliculaires (Figures n° 4 et 5) dont chacune est caractérisée par une dynamique de croissance se déroulant en trois étapes :

##### **I.4.2.2.2.1. Recrutement**

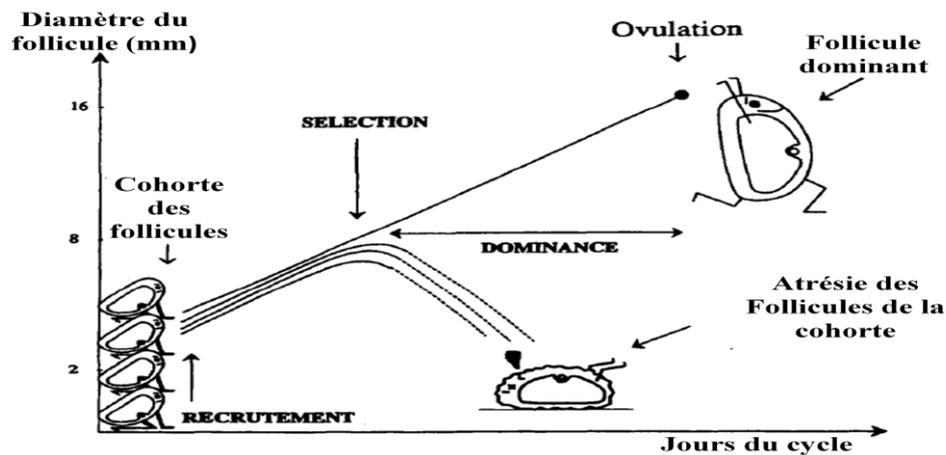
C'est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules tertiaires de diamètre  $\geq 4$  mm (Hanzen *et al.*, 2000) généralement 5 à 20 follicules (Forde *et al.*, 2010) ayant des récepteurs pour la FSH. Il nécessite une augmentation de la concentration de la FSH (Roche *et al.*, 1998), une intervention des facteurs de croissance et des substances polypeptidiques telles que l'inhibine et l'activine (Drion *et al.*, 2000).

##### **I.4.2.2.2.2. Sélection**

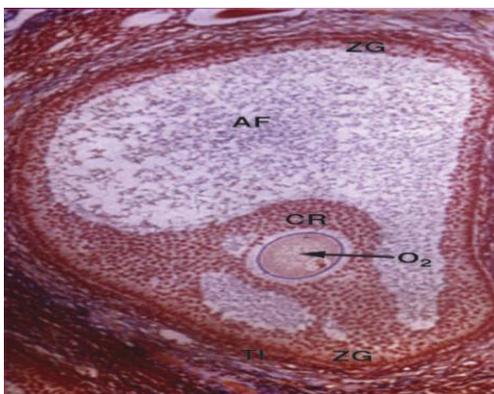
les sécrétions de l'œstradiol et de l'inhibine par les follicules recrutés exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en diminuant la sécrétion de la FSH (Taya *et al.*, 1996). Le mécanisme de la sélection d'un ou des follicules recrutés suite à la diminution de la concentration de la FSH, n'est pas tout à fait compris mais des récepteurs bien développés de la FSH ont été observés chez les follicules sélectionnés. Ces récepteurs ont un rôle dans le mécanisme de sélection (Drion *et al.*, 2000). Les follicules non sélectionnés subissent une dégénérescence communément appelée « atresie » (Bazot *et al.*, 2004).



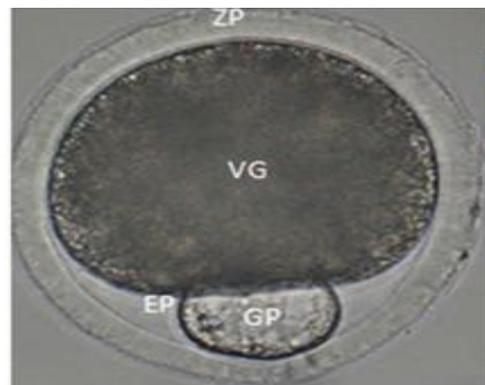
**Figure 4 :** Schématisation de la croissance des follicules gonado-dépendants et sa régulation hormonale durant le cycle œstral (Forde *et al.*, 2010).



**Figure 5 :** Les trois étapes qui caractérisent la croissance folliculaire durant la phase gonado-dépendante (Driancourte, 2001).



**Figure 6 :** Coupe histologique d'un follicule mature préovulatoire avec ses divers éléments. (Bazot *et al.*, 2004). (Ovocyte (O) entouré par corona radiata (CR), couche de cellules granuleuses (ZG), La thèque interne (TI), Antrum folliculaire (AF)).



**Figure 7:** Ovocyte II (Franciosi *et al.*, 2008).

Espace périvitellin (ep), globule polaire (gp), vesicule germinale (vg), zone pellucide (zp).

#### **I.4.2.2.2.3. Dominance**

Cette étape est caractérisée par un développement d'un ou des follicules sélectionnés en un ou des gros follicules dits follicules préovulatoires ou de GRAAF (diamètre 20 mm) (Figures n° 5) apte à ovuler (Drion *et al.*, 1996). Bien que la faible concentration en FSH persiste, un ou des follicules sélectionnés deviennent dominants en continuant leur croissance car ils ont acquis un mécanisme d'autostimulation interne par la sécrétion folliculaire de l'IGF-1 qui stimule à son tour (paracrine) la synthèse des œstrogènes (Spicer, 2004) et l'acquisition des récepteurs de LH (Roche *et al.*, 1998). Le ou les follicules dominants provoquent la régression des follicules en croissance et bloquent le recrutement des autres (Drion *et al.*, 1996).

#### **I.4.2.2.2.4. Devenir du follicule dominant**

Lorsque un follicule dominant coïncide avec la présence d'un corps jaune, le destin de ce follicule est l'atrésie. Ce phénomène est dû à la progestérone sécrétée par le corps jaune inhibant, ainsi, la décharge ovulante de LH par un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Ball, 2004). Dans le cas contraire, le follicule dominant subit une maturation puis une ovulation répondant au pic de LH. Ce dernier est stimulée par l'œstradiol folliculaire qui coïncide avec la lutéolyse (Taya *et al.*, 1996).

#### **I.4.2.2.2.5. La Maturation folliculaire**

L'intervalle entre le pic de LH et l'ovulation permet des changements morphologiques, biologiques et chimiques qui touchent, en premier lieu, la membrane, le cytoplasme et le noyau (vésicule germinale) de l'ovocyte et, en deuxième lieu, le follicule dominant (Hanzen *et al.*, 2000). Ces modifications permettent à l'ovocyte 1 de reprendre sa division méiotique qui s'arrête en métaphase 2 donnant un ovocyte 2 (Drion *et al.*, 1996). Juste avant l'ovulation, la maturation se termine par l'émission du premier globule polaire dans l'espace péri-vitellin (Figure n° 7) (Thibault, 2001). L'ovulation fait suite à la croissance et la maturation du follicule dominant donnant un follicule mûr ou préovulatoire (Figure n°6). Ce dernier ovule en réponse au pic de LH (Hanzen *et al.*, 2000).

### **I.4.3. Formation du corps jaune**

Après l'ovulation, l'ensemble de la cavité du follicule ovulé est rempli par un liquide séro-hémorragique et des cellules folliculaires qui se lutéinisent sous l'effet de LH formant un corps jaune hémorragique. ce dernier croît pendant la période met-oestrus en fermant la cavité (Rathbone *et al.*, 2001). Le corps jaune est formé de deux types de cellules : les cellules lutéales

(petites et grandes) secrétant la Progéstérone et les cellules vasculaires (cellules endothéliales, érythrocytes, leucocytes et le tissu conjonctif) non stéroïdogènes (Hansel *et al.*, 1996).

La détection de P4 plasmatique débute, généralement, au 5<sup>ème</sup> jour du cycle c'est-à-dire à la fin de la croissance du corps jaune (la fin de méto-oestrus) où ce dernier devient sensible à l'effet lutéolytique de la PGF2 $\alpha$ . La durée de l'activité du corps jaune chez la vache est entre le 5<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour du cycle qui correspond à la période du di-oestrus (Rathbone *et al.*, 2001). Pendant cette dernière, l'injection de PGF $\alpha$  entraîne la lyse du corps jaune et l'apparition des chaleurs en 03 jours après l'injection (Hansel *et al.*, 1996). La concentration élevée de P4 durant la phase lutéale, notamment, durant le di-oestrus, prépare l'endomètre pour une éventuelle gestation (Rathbone *et al.*, 2001). Au 16<sup>ème</sup> jour du cycle, le corps jaune regrésse en raison de l'absence des signaux de gestation et la phase folliculaire commence. Par contre, la présence d'une gestation empêche la lutéolyse via des signaux embryonnaires et le corps jaune devient un corps jaune dit gestatif qui maintient la gestation jusqu'à terme (Forde *et al.*, 2010 ; Drion *et al.*, 1996).

#### **I.4.4. Atrésie**

Le devenir d'un follicule (l'atrésie ou l'ovulation) est déterminé principalement par des critères morphologiques. L'involution de l'ovocyte, la forme irrégulière du follicule et /ou de l'ovocyte et surtout la pycnose des couches de granulosa qui résulte de l'apoptose de leurs cellules sont les critères les plus utilisés pour décrire l'atrésie d'un follicule (Leung *et al.*, 2004).

L'atrésie est un élément essentiel pour la régulation du nombre d'ovulations. Elle touche la majorité des follicules de réserve (99,9%) (Hanzen *et al.*, 2000). Pour les follicules qui n'entament pas leur croissance et ceux qui ont un diamètre inférieur à 1mm, leur atrésie est caractérisée par une dégénérescence précoce et rapide de l'ovocyte avec une hypertrophie de la thèque interne suivie par l'apoptose de la granulosa. Par contre, pour les follicules ayant un diamètre supérieur à 1mm, l'ovocyte reste longtemps après la disparition des cellules de granulosa, il continue sa division méiotique comme l'ovocyte du follicule prèovulatoire (alignement des chromosomes en métaphase, l'émission de premier globule polaire....) puis il dégénère (Leung *et al.*, 2004).

#### **I.5. Production d'embryons**

Durant le cycle œstral de la vache, 2 à 3 vagues folliculaires émergent pour qu'un ou deux follicules arrivent à ovuler, les autres follicules subissent une atrésie. Pour les

vaches d'élite, l'atrésie est responsable d'un gaspillage de matériel génétique précieux (Adams *et al.*, 2001). Ce dernier impose les biologistes d'intervenir pour exploiter le maximum de follicules d'une vague folliculaire. Pour cela, ils ont utilisé un traitement de superovulation qui permet aux follicules recrutés de continuer leur croissance et leur maturation jusqu'à l'ovulation en donnant un nombre important d'ovocytes. Ces derniers sont fécondés via une insémination artificielle suivie, plus tard, par une récolte d'embryons aux premiers stades du développement. Les embryons collectés sont congelés ou transférés chez d'autres vaches préalablement préparées (Saumande, 1995).

En plus de la méthode précédente dite *in vivo*, une méthode *in vitro* est utilisée pour exploiter le matériel génétique d'un animal vivant ou abattu au moyen d'une aspiration des ovocytes de follicules ponctionnés (Blondin *et al.*, 1997). Les ovocytes subissent, via des milieux créant un environnement semblable à celui rencontré *in vivo*, une maturation (Goodhand *et al.*, 1999), une fécondation (Brackett, 1983) et un développement jusqu'au stade de transfert ou de congélation (Brackett et Zuelke, 1993).

### **I.5.1. Principe du traitement de superovulation**

Le principe du traitement de superovulation est basé sur l'augmentation de la concentration des gonadotrophines durant les phases de sélection et de dominance folliculaires. La superovulation permet aux follicules, programmés pour l'atrésie, de continuer leur croissance jusqu'à l'ovulation (Moor *et al.*, 1984).

### **I.5.2. Hormones du traitement de superovulation**

Chez les bovins, les deux principales hormones gonadotrophes utilisées pour le traitement de superovulation sont les suivantes :

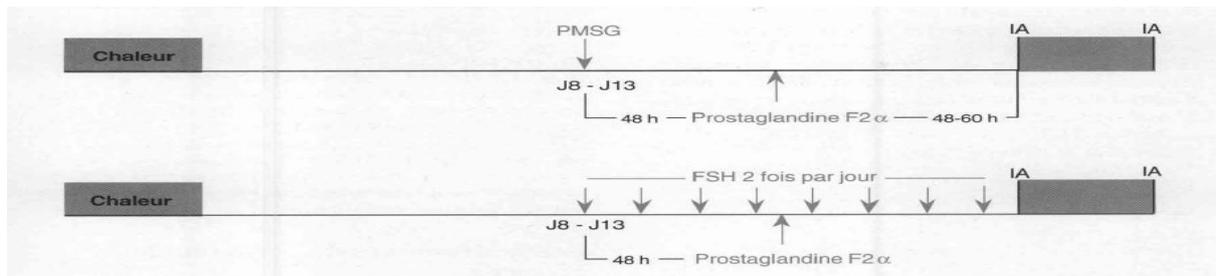
#### **I.5.2.1. Equin chorionic gonadotrophin « eCG »**

Connu aussi sous le nom de PMSG « pregnant mare serum gonadotropin », c'est une glycoprotéine placentaire extraite du sérum de jument gravide entre le 40<sup>ème</sup> et le 150<sup>ème</sup> jour (England, 2005). C'est une grosse molécule riche en acide sialique (10%) lui conférant une bonne stabilité qui limite son catabolisme cellulaire. Sa demi-vie est longue, environ 4 à 6 jours, chez la vache. Cette propriété permet de réaliser une stimulation sur plusieurs jours (Beckers, 1989).

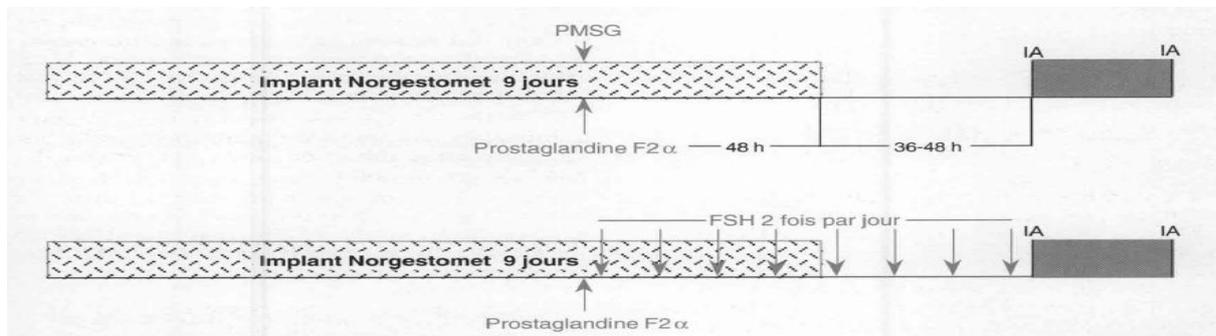
#### **I.5.2.2. Follicule stimulating hormone « FSH »**

La FSH est une hormone de croissance folliculaire d'origine hypophysaire (Norman *et al.*, 1997). C'est une glycoprotéine pauvre en acide sialique (5%) avec une demi-vie courte (6 heures chez la vache) par rapport à celle de la PMSG (Ectors *et al.*, 1989).

### Superovulation sur un cycle naturel



### Superovulation sur un cycle maitrisé au moyen de l'implant



**Figure 8 :** Description des différents traitements de superovulation couramment utilisés chez les bovins (Dominique,2001 ; Saumande, 1995).

La FSH utilisée dans les traitements de superovulation est extraite de broyats hypophysaires principalement de porc en raison de leur teneur élevée en hormones. La FSHp (FSH porcine) varie en fonction de son degré de purification c'est-à-dire son rapport FSH/LH (Beckers, 1989).

### **I.5.3. Variabilité des réponses au traitement de superovulation**

Bien que le traitement de superovulation soit moins cher par la seule injection d'eCG, le traitement coûteux à base de FSH reste la méthode de choix en raison des résultats supérieurs, en termes d'embryons utilisables (Sendag *et al.*, 2008). La superovulation par l'eCG ne donne pas toujours de bons résultats car sa demi-vie, longue, est responsable d'une croissance folliculaire continue induisant un changement du climat hormonal qui affecte principalement la LH et l'œstradiol (Bevers *et al.*, 1989). Les conséquences de ces événements sont la réduction du nombre d'ovulations, la présence des follicules anovulatoires et un mauvais développement embryonnaire qui diminue la qualité des embryons collectés (Kafi *et al.*, 1997). L'utilisation des anticorps anti-eCG après le traitement de superovulation permet d'améliorer la réponse ovarienne (Katagiri *et al.*, 1991). Les fluctuations dans les réponses aux traitements de superovulation sont dues aussi aux variations des rapports FSH/LH présentés dans les préparations commerciales de la FSH et de l'eCG (Saumande, 1995).

### **I.5.4. Protocoles des traitements de superovulation**

Il a été démontré que les meilleurs résultats de traitement par la FSH sont obtenus lorsqu'elle est injectée 2 fois par jour en doses décroissantes, pendant 4 jours (Kelley *et al.*, 1997). La dose totale préconisée est entre 28 et 50 mg (Mapletoft *et al.*, 1994). Cependant, l'eCG, qui est caractérisé par une demi-vie longue, requiert une seule injection pour la superovulation. La dose habituellement recommandée est de 1500 à 3000 UI (Mapletoft *et al.*, 1994). Afin que le traitement de superovulation coïncide avec le démarrage d'une vague folliculaire, la plupart du temps, la stimulation de l'ovaire débute en phase lutéale, entre le 8ème et le 13ème jour du cycle c'est-à-dire après des chaleurs dites « chaleurs de référence » (J0=œstrus) (Saumande, 1995). Ces dernières sont observées par l'éleveur ou induites par deux injections de PGF2 $\alpha$  dans un intervalle de 11 jours (Weems *et al.*, 2006). Une alternative consiste à réaliser le traitement de superovulation au cours de la période d'induction des chaleurs au moyen de progestagènes sans avoir besoin de repérer les chaleurs de référence (Figure n° 8) (Saumande, 1995).

L'apparition des chaleurs est, généralement, de 48 heures après l'administration de prostaglandine (Fields *et al.*, 2002). Cette dernière est injectée, habituellement, à 48 heures après le début de traitement de superovulation (Mapletoft *et al.*, 1994).

**Tableau 3** : signes observables en fonction de la période de cycle (Lacerte, 2003).

<i>Période du Cycle</i>	<i>Pro-œstrus</i>	<i>Œstrus (vraie chaleur ou rut)</i>	<i>Post-œstrus</i>
<b><u>Signe externe</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitation de l'animal</li> <li>- Crainte des autres vaches</li> <li>- Tentative de monte chez d'autres vaches</li> <li>- Vulve congestionnée humide et légèrement rosée</li> <li>- Mucus</li> <li>- Beuglements.</li> <li>- Moins d'appétit.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vulve très congestionnée, couleur rougeâtre.</li> <li>- Mucus très filant et clair</li> <li>- Vaches nerveuse, aux aguets</li> <li>- Beuglements pouvant être fréquents</li> <li>- Peut retenir son lait</li> <li>- La vache se laisse monter sans se dérober, seul signe fiable du rut</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La vache ne se laisse plus monter mais peut parfois monter les autres</li> <li>- Ne fait que sentir les autres</li> <li>- Plus souvent redevient calme.</li> <li>- Mucus visqueux et d'apparence laiteuse</li> <li>- Vulve décongestionnée</li> <li>- Le saignement survient 24 à 48 heures après le début de cette période et est observée chez environ 50% des vaches.</li> </ul>

### **I.5.5. Observation des chaleurs et l'insémination artificielle**

L'ensemble des modifications physiologiques qui accompagnent l'ovulation définit l'œstrus. Les manifestations extérieures de ce dernier sont connues sous le nom de « chaleurs » (Dominique, 2001).

#### **I.5.5.1. Les signes des chaleurs**

Les chaleurs de la vache et de la génisse durent 18 heures en moyenne (Dominique, 2001), dont le déroulement est divisé en trois phases : une phase de préparation (pro-œstrus), une phase d'œstrus (vraie chaleur) et une phase de fin de chaleurs (met-œstrus) (Tableau n° 3).

#### **I.5.5.2. Détection des chaleurs**

Les observations continues peuvent se faire par l'observation visuelle directe par le personnel ou indirecte via la vidéosurveillance. Dans le premier cas, les contraintes du personnel rendent difficile la mise sur pied d'un tel programme de surveillance. Les observations continues via les personnes sont réservées, principalement, aux auteurs à titre expérimental (Renard, 1982).

L'efficacité des observations discontinues des chaleurs dépend de la fréquence des observations. Il est préconisé de faire 2 à 3 observations par jour, dont la première doit s'effectuer tôt le matin et la dernière tard le soir pour éviter les périodes d'activité telles que l'alimentation et la traite (Lacerte, 2003). Chaque observation dure entre 20 et 30 minutes (Allrich, 1994).

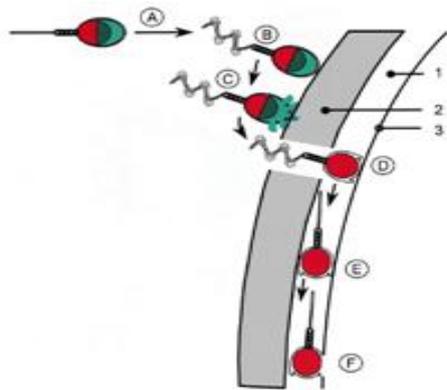
#### **I.5.5.3. Insémination artificielle**

Une double insémination doit être réalisée respectivement 12 et 24 heures après le début de l'œstrus (Dalton *et al.*, 2000 ; Kanitz *et al.*, 2002). Si le traitement de superovulation est effectué au moyen d'un progestagène, l'insémination se fait en aveugle 48 et 60 heures après le retrait de l'implant ou la spirale (Dominique, 2001).

En raison de la variation du nombre de follicules ovulés d'un traitement de superovulation à l'autre, le nombre de paillettes utilisé pour inséminer une vache superovulée dépend de l'inséminateur. Il est recommandé d'inséminer la vache avec 3 paillettes de bonne qualité de semence, dont 2 paillettes réservées pour la première insémination et l'autre pour la deuxième (Andrews *et al.*, 2004).

### **I.5.6. Fécondation**

Les voies génitales de la vache jouent un rôle vital en assurant la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Durant leur remontée dans les voies génitales jusqu'à l'ampoule pour féconder l'ovule, les spermatozoïdes sont exposés à différents environnements qui



A : éjaculation du sperme dans les voies génitale où ils vont subir une capacitation, B : spermatozoïde capacité, hypermobilité de Spz qui devient apte à se lier avec la ZP, C : réaction acrosomique (sécrétion des enzymes), D : digestion et pénétration de la Z Puis dans l'espace péri-vitellin et l'attachement de la partie apicale de la tête et la membrane plasmatique de l'ovocyte, E et F : fusion les deux membranes des gamètes.

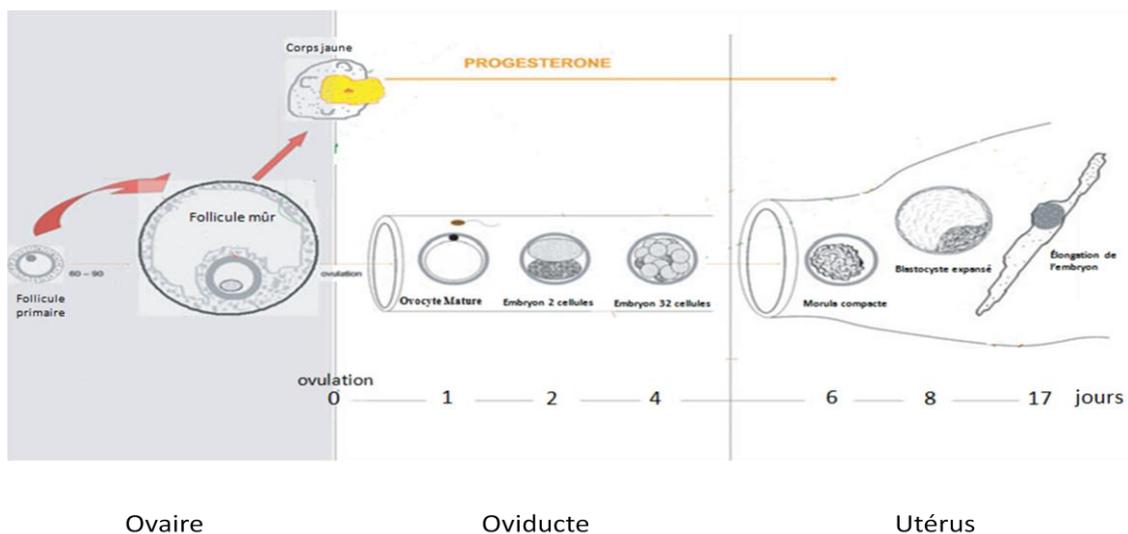
Spz : spermatozoïde, ZP : zone pellucide, 1 : espace péri-vitellin, 2 : la zone pellucide, 3 : la membrane plasmatique de l'ovocyte.

**Figure 9** : les séquences de fécondation (Flesch *et al.*, 2000).

**Tableau 4**: chronologie du développement de l'embryon bovin (Menezo *et al.*, 1982).

Jours	Heures	Événement
0	0	Début des chaleurs
0	7	Pic de LH
0	15	Insemination
1	30	Ovulation
1	35	Fécondation
2	50	Stade deux cellules
2	55	Stades 4 cellules
3	75	Stades 8 cellules
4	100	Stades 16 à 32 cellules

Jours	Heures	Événement
5	120	Passage de l'embryon dans l'utérus
6	130	Stades 30 à 64 cellules
7	150	Stade jeune blastocyste
8	200	Stade blastocyste
10		Sortie de pellucid
11		Début de la phase d'élongation
22		Premiers accolements entre le conceptus et l'endomètre
35		implantation
40-50		Fin de l'organogenèse.



**Figure 10** : Développement et migration de l'embryon bovin (leroy *et al.*, 2008)

assurent leur capacitation. Cette dernière rend les spermatozoïdes aptes à reconnaître la zone pellucide (Patrat *et al.*, 2009).

### **I.5.6.1. Capacitation**

#### **I.5.6.1.1. Rôle de la glaire cervicale dans l'initiation de la capacitation**

Pour la saillie naturelle, la glaire cervicale joue un rôle important comme une première barrière sélective qui agit de façons multiples:

- Retrait des spermatozoïdes de la cavité vaginale,
- Initiation de la capacitation par élimination du plasma séminal, des facteurs décapacitants et plusieurs lipides membranaires dont le cholestérol. Ces derniers sont deux évènements précoces de la capacitation,
- Élimination sélective des spermatozoïdes anormaux et tri des spermatozoïdes mobiles,
- Stockage des spermatozoïdes en préservant leur fertilité (Patrat *et al.*, 2009).

#### **I.5.6.1.2. Rôle de l'utérus et de l'oviducte dans la capacitation**

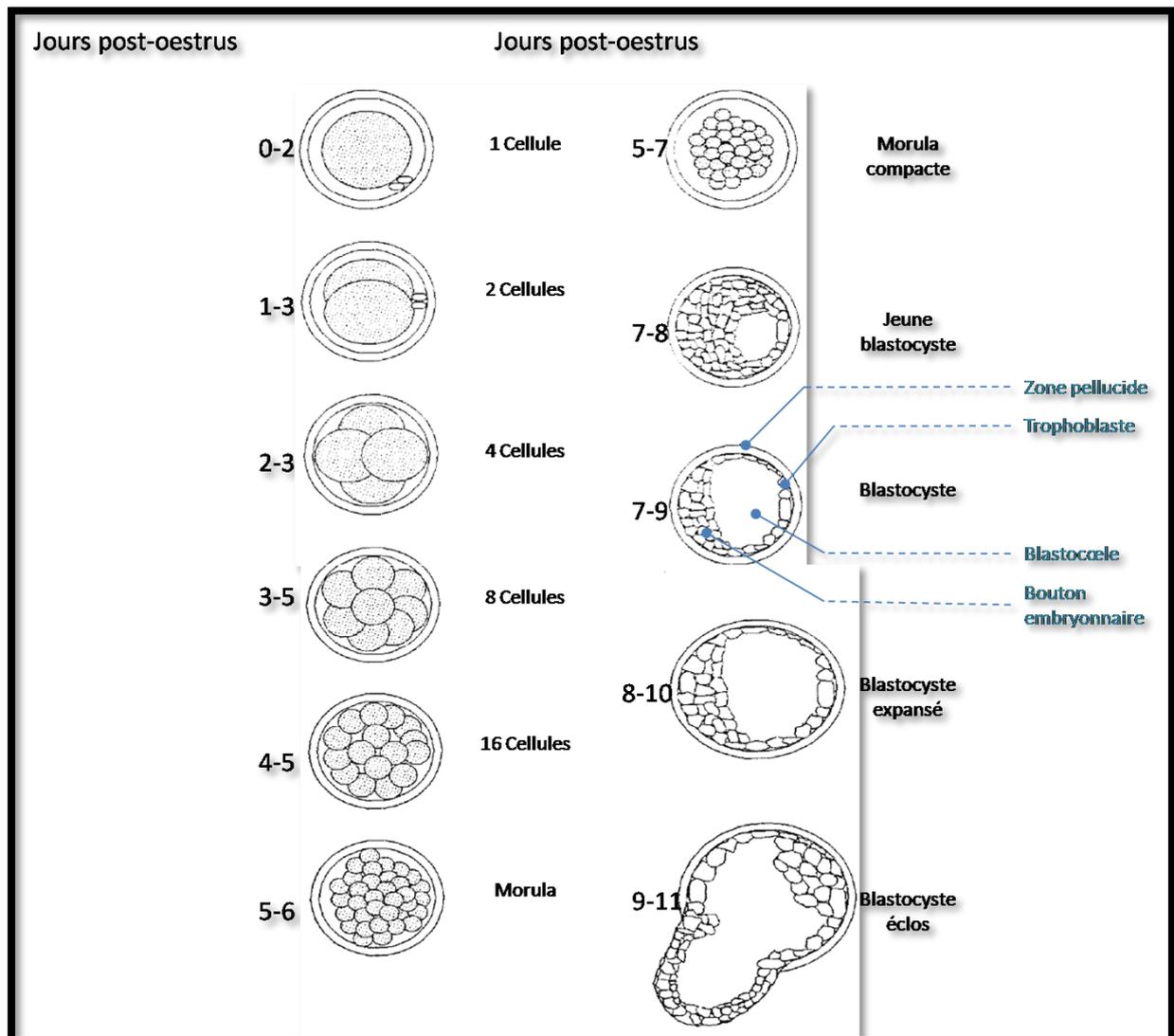
Pour que les spermatozoïdes, qui arrivent à l'utérus ou ceux qui sont déposés dans l'utérus lors de l'insémination artificielle, deviennent apte à féconder un ovocyte, ils doivent subir une capacitation qui a lieu dans l'utérus et l'oviducte. Cette dernière assure un environnement propice pour, d'une part, le transport, le stockage et la capacitation des spermatozoïdes et d'autre part, le recueil ovocytaire, le transport, la fécondation et enfin le clivage embryonnaire précoce (Rodriguez-Martinez, 2007) (Figure n° 9).

Les principales modifications des spermatozoïdes pendant la capacitation sont les suivantes :

- Les spermatozoïdes sont stockés en période préovulatoire dans l'isthme caudale de la vache pendant 28 à 30 heures, Leur vitalité est assurée par des liaisons entre eux et de l'épithélium de l'oviducte (Patrat *et al.*, 2009),
- Détachement des spermatozoïdes de l'épithélium via des glyco-aminoglycanes,
- Augmentation de la concentration de  $Ca^{++}$  intraspermatic ainsi la phosphorylation de certaines protéines (Rodriguez-Martinez, 2007),
- Hyperactivité des spermatozoïdes (Abou-Haila *et al.*, 2000).

### **I.5.6.2. Réaction acrosomiale**

Les modifications que subissent les spermatozoïdes durant leur remontée dans le tractus génital, leur confient la capacité de déclencher une réaction acrosomiale (Figure n° 9). Celle-ci



**Figure 11 :** Les premiers stades du développement embryonnaire (Gordon, 2003).

commence par une liaison entre le spermatozoïde et une glycoprotéine de la zone pellucide induisant ainsi, diverses modifications dans le spermatozoïde. La décharge de  $Ca^{++}$  accompagnée par la fusion à différents sites de sa membrane permet d'exposer la membrane externe de l'acrosome. Ensuite, le contenu de l'acrosome, principalement les enzymes hydrolytiques, est dispersé via des vésicules formées de la membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome permettant la digestion de la zone pellucide. La dispersion de ces vésicules permet à la membrane interne de devenir la barrière externe du spermatozoïde. Cette dernière fait une autre liaison avec la zone pellucide. Vu l'hypermobilité du flagelle, le spermatozoïde entre dans l'espace péri-vitellin. À cet endroit, la tête de spermatozoïde débute par une fusion latérale avec la membrane plasmique de l'ovocyte aboutissant à une fusion complète des membranes et des noyaux des deux gamètes déclenchant la première segmentation (Flesch *et al.*, 2000 ; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). L'entrée du spermatozoïde déclenche la libération des milliers de granules corticaux dans l'espace péri-vitellin qui empêchent la polyspermie (Dominique, 2001).

### **I.5.7. Développement précoce de l'embryon**

Aussitôt après la fécondation, l'œuf commence sa division mitotique. L'ensemble des cellules filles « blastomères » commence à former une masse pleine, toujours entourée de membrane pellucide, appelé morula (Figure n° 11). A ce stade, l'embryon a terminé sa migration dans l'oviducte et atteint la lumière de l'utérus vers le 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> jour (Figure n°10, Tableau n° 4). Le stade suivant, appelé blastocyste, est caractérisé par la présence, dans la périphérie, de petites cellules entourant la face interne de la zone pellucide formant le trophoblaste, une cavité appelé blastocœle et une masse de cellules qui forme l'ébauche de l'embryon : le bouton embryonnaire (Gordon, 2003).

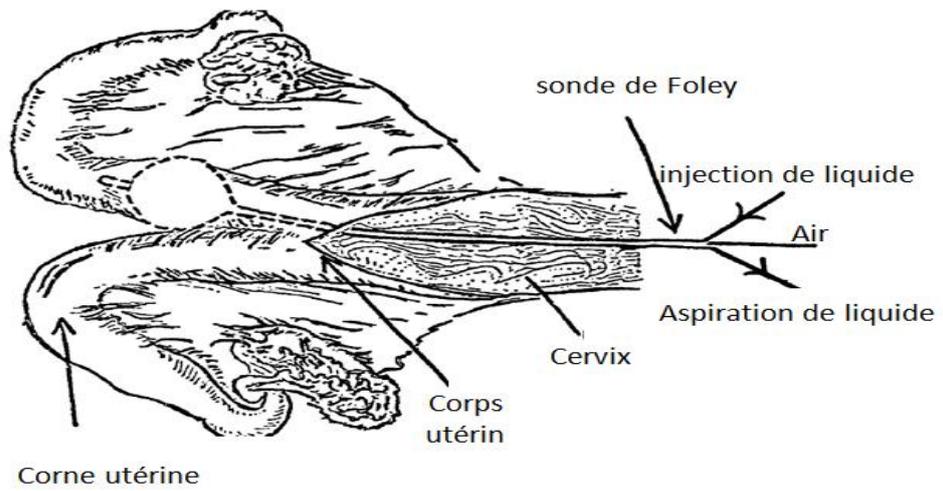
Durant son développement précoce, l'embryon est en état libre dit « la vie libre ». Il se nourrit de sécrétions utérine d'origine plasmique appelé le lait utérin. La vie libre de l'embryon de la vache cesse vers 20 et 30 jours par la formation de la première adhésion entre les structures embryonnaires et celles de l'endomètre de la vache, appelé l'implantation. La migration de l'embryon du lieu de fécondation jusqu'à son implantation est réalisé par des mouvements ciliaires de l'oviducte et des contractions utérines (Thibault *et al.*, 2001) .

### **I.5.8.La collecte**

#### **I.5.8.1. Matériel de collecte**

Sonde de collecte : il existe deux types de sondes

- Sonde à deux voies, dont une voie réservée pour l'injection de l'air provoquant le gonflement d'un ballonnet situé à quelques centimètres de son extrémité antérieure, l'autre voie est utilisée à la fois



**Figure 12** : Position d'un ballonnet dans la corne utérine (Elsden *et al.*, 1976)

pour injection et l'aspiration du liquide de collecte via des ouvertures présentes juste après le ballonnet jusqu'à l'extrémité antérieure de la sonde (Drost *et al.*, 1976).

- Sonde à trois voies, comme la précédente munie d'une troisième voie pour récupérer le liquide injecté c'est-à-dire que l'injection et l'aspiration se font par deux voies différentes (Drost *et al.*, 1976).

#### **I.5.8.2. Liquide de collecte**

Pour que la survie de l'embryon ne soit pas affecté, le milieu de collecte doit être un milieu tampon, c'est-à-dire neutralisant les modifications de PH du milieu collecté qui font suite, principalement, au métabolisme embryonnaire. Le TCM99 (tissue culture medium) et PBS (Phosphate buffered saline) sont les deux milieux les plus utilisés pour la récolte des embryons (Sreenan, 1989).

#### **I.5.8.3. Méthode de collecte**

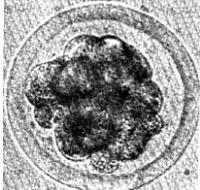
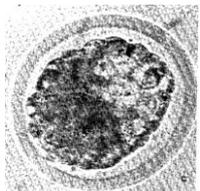
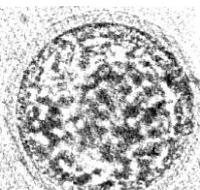
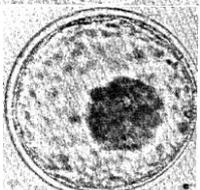
Pour diminuer le péristaltisme et les mouvements de l'animal, une anesthésie épidurale est préconisée (Ozil *et al.*, 1979).

Après la mise en place de la sonde dans la corne par la voie cervicale, le ballonnet est gonflé. L'injection et l'aspiration du liquide de collecte se fait, généralement, au moyen d'une seringue. Après la récolte, le ballonnet est dégonflé permettant de retirer la sonde. La collecte pour la deuxième corne est effectuée de la même manière que la première. D'autres dispositifs et des filtres sont aussi utilisés, principalement, pour la sonde à trois voies facilitant, ainsi, la collecte et la recherche plus tard des embryons (Pugh *et al.*, 1980). Pour les vaches ayant des cols non cathétérissables, la collecte peut se faire chirurgicalement (Hasler, 2003) c'est à dire via une laparotomie. L'utérus est extériorisé et la sonde de collecte est introduite, à travers une petite incision, à la base de la corne (Figure n°12). Ensuite, la collecte se fait de la même manière que celle réalisée par voie cervicale.

#### **I.5.9. Stade optimale pour le transfert frais et la cryoconservation**

En 2001, après avoir transféré des embryons frais et congelés à différents stades, Hasler a confirmé, en termes de gestation, que le blastocyste (classe 1 et 2) est le stade optimal à transplanter qu'il soit frais ou congelé. En effet, sa collecte doit se faire entre le 6<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour post-insémination. En 2003, Aderson *et al.*, ont montré, en terme de gestation, que le blastocyste congelé est le meilleur stade à transférer comparativement aux autres stades embryonnaires.

**Tableau 5:** Différents stades d'embryons collectés (lindner *et al.*, 1983)

<i>Stade</i>	<i>Age approximative (jours)</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Image</i>
Morula	5	<p>Connu aussi sous le nom « boule de cellules »</p> <p>C'est une masse de cellules qui occupe la majeure partie de l'espace péri-vitellin.</p> <p>Il est difficile de discerner des blastomères les uns des autres</p>	
Morula compact	6	<p>Les blastomères se regroupent pour former une masse compacte</p> <p>Cette dernière occupe 60 à 70% de l'espace péri-vitellin</p>	
Jeune blastocyste	7	<p>Caractérisé par une petite cavité dite blastocœle</p> <p>L'embryon occupe 70 à 80 % de l'espace péri-vitellin</p> <p>A ce stade, la différenciation visuelle entre le trophoblaste et la masse interne est possible</p>	
Blastocyste	7	<p>La différenciation entre le trophoblaste et la masse cellulaire interne est évidente</p> <p>Le blastocœle occupe la majeure partie de l'espace péri-vitellin</p>	
Blastocyste expansé	8	<p>Son diamètre est augmenté conduisant à amincir de la zone pellucide à 1/3 de son épaisseur initiale</p>	
Blastocyste éclos	9	<p>L'identification de ce stade par un opérateur inexpérimenté est difficile.</p> <p>La récolte à ce stade peut entraîner éclosion ou une perte de la zone pellucide de l'embryon</p>	

Après la collecte, l'injection de PGF2 $\alpha$  permet à la donneuse de reprendre assitôt sa cyclicité d'une part, et de diminuer le risque de formation d'un kyste ovarien d'une autre part (Andrews, 2004).

#### **I.5.10. Classification des embryons collectés**

Puisque les ovulations ne sont pas toutes synchrones, plusieurs stades embryonnaires peuvent être observés au cours d'une même récolte. Les stades du développement des embryons fréquemment récupérés au moment de la récolte sont démontrés dans le tableau n°5. L'appréciation de la qualité d'un embryon collecté est basée exclusivement sur des critères morphologiques permettant de déterminer 5 classes qui désignent la qualité de l'embryon (Tableau n° 6).

### **I.6. Cryoconservation des embryons**

La cryoconservation, de son préfixe cryo qui désigne le froid et la glace, repose sur la suspension de toute activité biologique aux basses températures qui permet un stockage prolongé, en théorie illimité, et un retour à la viabilité des cellules après réchauffement. La température, généralement, utilisée pour la cryoconservation des gamètes et des embryons, est celle de l'azote liquide, -196 °C (Fuller *et al.*, 2004).

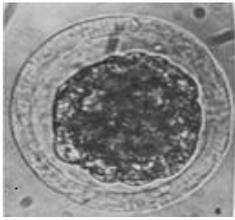
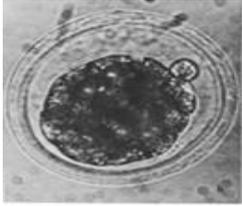
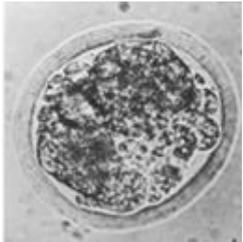
Les connaissances sur les bases cryobiologiques, notamment les propriétés de l'eau, le comportement cellulaire aux basses températures, des lésions cellulaires et le rôle des cryoprotecteurs durant le refroidissement ont permis de déterminer, en terme de survivance maximale, une courbe de congélation pour chaque type cellulaire.

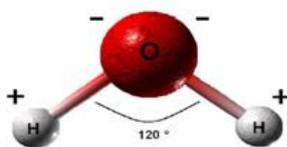
#### **I.6.1. Les bases de la cryobiologie**

##### **I.6.1.1. Les bases physiques de l'eau**

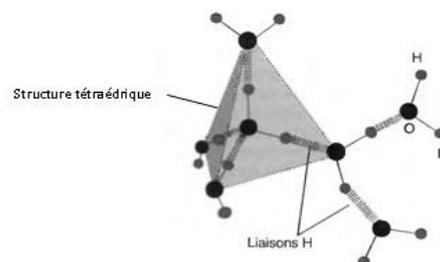
L'eau, est une molécule constituée d'un atome d'oxygène dont la couche externe est insaturée (Constituée de 6 électrons). Elle nécessite, donc, la contribution de deux atomes d'hydrogène (Un seul électron) en vue de sa saturation. l'ensemble des atomes sont liés par des liaisons dites covalentes à forte énergie (nécessitant une forte énergie pour leur rupture) mais ces derniers ne se trouvent pas en symétrie spatiale et se voient espacés d'un angle de 120° par rapport à l'atome d'oxygène (Daniel *et al.*, 2004). Cette asymétrie octroi à l'atome d'oxygène deux pôles négatifs tandis que chaque atome d'hydrogène se voit attribuer un pôle positif. L'orbite de la molécule est dit dipolaire éclectique avec deux pôles négatifs et autant de pôles positifs (Figure n° 13) (Reed, 2008).

**Tableau 6:** Classification des embryons selon leur qualité (Lindner et al., 1983 ; INRA UNCEIA, 1990)

Classe	Qualité	Description	Illustration (Morula compact)
1	excellent	- Embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable. - Blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact.	
	bon	- Embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, - ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique, - ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace péri-vitellin (figure B)	
2	Moyen	- Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomères sphériques au stade morula) ou des défauts bien précis comme : nombreuses cellules échappées dans l'espace péri-vitellin, des vésicules, des cellules dégénérées, blastomères de taille variable (figure C). Aspect plus clair ou plus sombre que normal	
3	Mediocre	- Nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes, des vésicules grosses et nombreuses ; - Mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable (figure D).	
4	Mort ou dégénéré	- Arrêt de développement à un stade précoce. - Cellules dégénérées.	



**Figure 13:** Géométrie et répartition de charges de la molécule d'eau (Daniel et al., 2004)



**Figure 14 :** Liaisons H entre les molécules d'eau et sa structure tétraédrique (Daniel, 2004).

Chaque molécule d'eau peut se lier à quatre molécules d'eau adjacentes par des interactions électrostatiques en formant des liaisons hydrogènes ou liaison H. Chaque liaison H s'établit toujours entre un atome d'hydrogène engagé dans une liaison covalente chargée positivement et un atome d'oxygène, lui-même engagé dans une liaison covalente, chargée négativement. Etant donné la répartition des charges positives et négatives, chaque molécule d'eau peut en principe établir 4 liaisons d'hydrogène de faible énergie avec les molécules voisines (Figure n° 14) (Daniel *et al.*, 2004).

A l'état liquide, les molécules d'eau sont en perpétuel mouvement. De nombreuses liaisons hydrogènes se créent, alors, et se cassent entre elles (Karow, 2001) (la durée moyenne de la liaison hydrogène entre deux molécules d'eau est  $1.10^{-9}$  sec (Daniel *et al.*, 2004).

A l'état solide, l'eau prend différentes formes de cristaux de glace, la différence fondamentale entre l'état liquide et l'état solide de l'eau est que les molécules d'eau qui forment les cristaux sont arrangées de manière uniforme et répétitive dans lesquels chaque molécule d'eau est toujours liée aux quatre molécules d'eau voisines (Figure n° 14) par des liaisons H (forme tétraédrique) (Chaikin *et al.*, 1995).

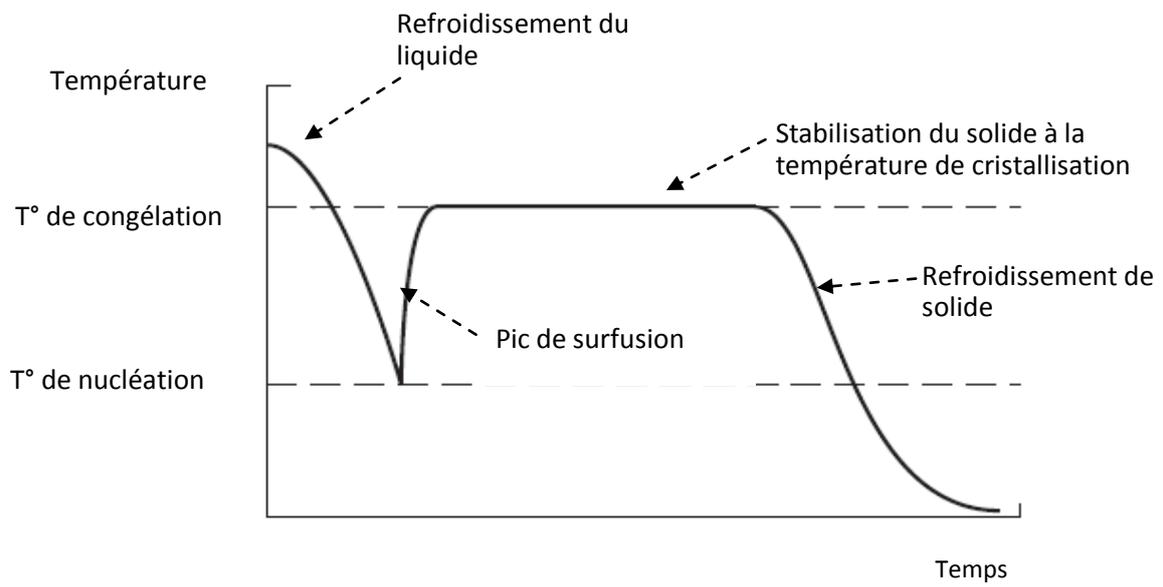
La structure cristallographique de la glace dépend des conditions de température et de pression (Odagescu, 2005), mais la taille des cristaux de glace dépend de la vitesse de refroidissement. Plus le refroidissement est rapide, plus le nombre de cristaux est grand et plus ces derniers sont petits (Courbière *et al.*, 2009).

Peu importe la structure des cristaux de glace, leur présence en extra ou en intracellulaire entraîne des lésions létales pour la cellule. Le premier objectif de la cryoconservation est d'éviter, au maximum, la formation de cristaux de glace (Vanderzwalmen *et al.*, 2010).

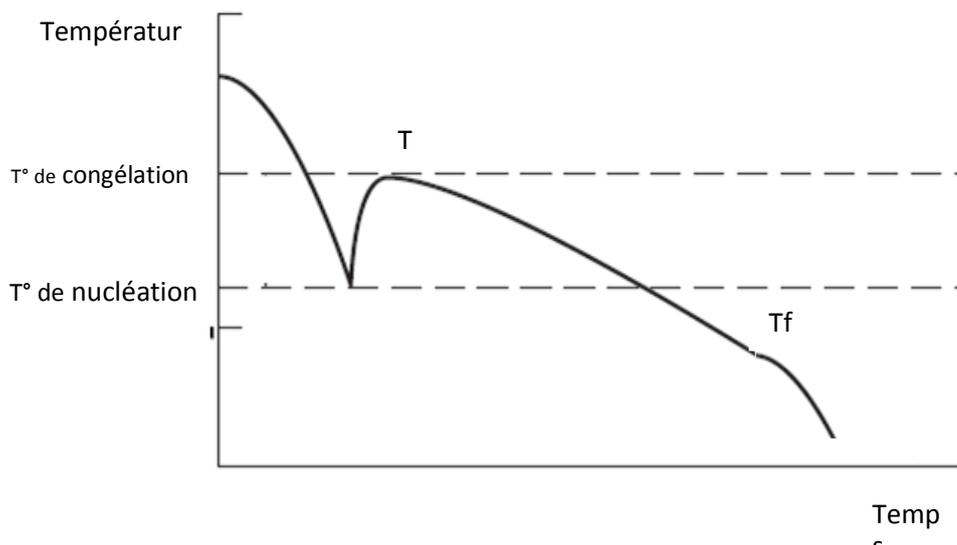
### **I.6.1.2. Comportement de la cellule pendant la congélation**

#### **I.6.1.2.1. Effet du refroidissement sur la cellule (refroidissement entre la température ambiante et la température de congélation)**

Le changement brusque de température au cours d'un refroidissement rapide peut entraîner des lésions cellulaires même en l'absence de formation de cristaux de glace, c'est le « choc thermique ». Ce dernier se produit essentiellement entre +37 et +15 °C. Des lésions se produisent au niveau de la membrane cellulaire et au niveau des organites intracellulaires. L'utilisation des cryoprotecteurs dans les milieux de congélation permet d'éviter le choc thermique (Courbière *et al.*, 2009).



**Figure 15 :** Courbe de congélation de l'eau (Zhmakin, 2009)



**Figure 16 :** Courbe de la congélation d'une solution aqueuse (Zhmakin, 2009)

### **I.6.1.2.2. Effet de l'état de surfusion et la température de la nucléation sur la cellule**

#### **I.6.1.2.2.1. Etat de surfusion**

Lorsqu'une petite quantité de liquide est refroidie en dessous de sa température de congélation, elle ne gèle pas immédiatement, mais demeure pour quelques temps dans un état instable dit de « surfusion » (Figure n° 15) dû à l'absence de noyau de cristallisation (Odagescu, 2005).

#### **I.6.1.2.2.2. La nucléation**

L'état de surfusion ne peut pas durer indéfiniment, il cesse spontanément à une température dite de nucléation, en dessous de laquelle le liquide se cristallise (Odagescu, 2005). La nucléation est définie comme le développement d'un noyau de taille critique à partir des agrégats de molécules d'eau sous l'effet de leur attraction électrostatique (Odagescu, 2005). Ce phénomène est expliqué par la théorie moléculaire, selon laquelle, dans un solide, les molécules sont ordonnées, alors que celles des liquides sont désordonnées. Pour se solidifier, un liquide doit avoir un noyau (point d'ordre moléculaire), autour duquel les molécules désordonnées peuvent cristalliser. La formation d'un noyau se fait au hasard, mais une fois le noyau formé, le liquide "surfondu" se solidifie rapidement. Dans le cas de l'eau pure, ce phénomène de nucléation a lieu à  $-40^{\circ}\text{C}$  (Figure n° 18). L'expansion de « noyaux » est un processus connu sous le nom de « croissance de cristaux de glace ». Le changement de l'état liquide vers l'état solide se fait en rompant les liaisons hydrogènes. La solidification s'accompagne donc d'un dégagement de chaleur (réaction exothermique) (figures n° 15, 16) (Reed, 2008).

#### **I.6.1.2.2.3. Formation des cristaux de glace**

Les cellules sont constituées d'une grande quantité d'eau. À la température de nucléation, des cristaux de glace intracellulaires peuvent se former et au fur et à mesure de la descente de température (réaction exothermique), leur volume devient plus important. Cette formation de cristaux de glace, s'accompagnant d'une augmentation de volume, présente des risques mécaniques de ruptures des organites intracellulaires ainsi que de leur membrane. Et ces lésions peuvent être immédiatement létales ou induire des déficits fonctionnels au sein de la cellule (Fuller *et al.*, 2004).

Plusieurs théories ont montré l'effet de la température de nucléation sur la formation des cristaux intracellulaire, parmi ces théories, nous citons :

➤ A la température de nucléation la cristallisation débute au milieu extracellulaire (Barry *et al.*, 2004);

➤ La formation des cristaux intracellulaires à une température supérieure à  $-30^{\circ}\text{C}$  nécessite la présence des cristaux de glace extracellulaires et que ces derniers doivent être en contact avec la cellule soit par la présence des brèches dans la membrane plasmique soit par sa disparition totale (Barry *et al.*, 2004). Les lésions membranaires résultant du choc de refroidissement, des effets des cristaux extracellulaires, ou rupture osmotique (c'est-à-dire la grande vitesse de sortir de l'eau intracellulaire peut entraîner des lésions membranaires, notamment, au niveau des pores membranaires). Ces hypothèses peuvent expliquer la présence des brèches dans les membranes cellulaires responsables de la propagation de la glace extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Barry *et al.*, 2004).

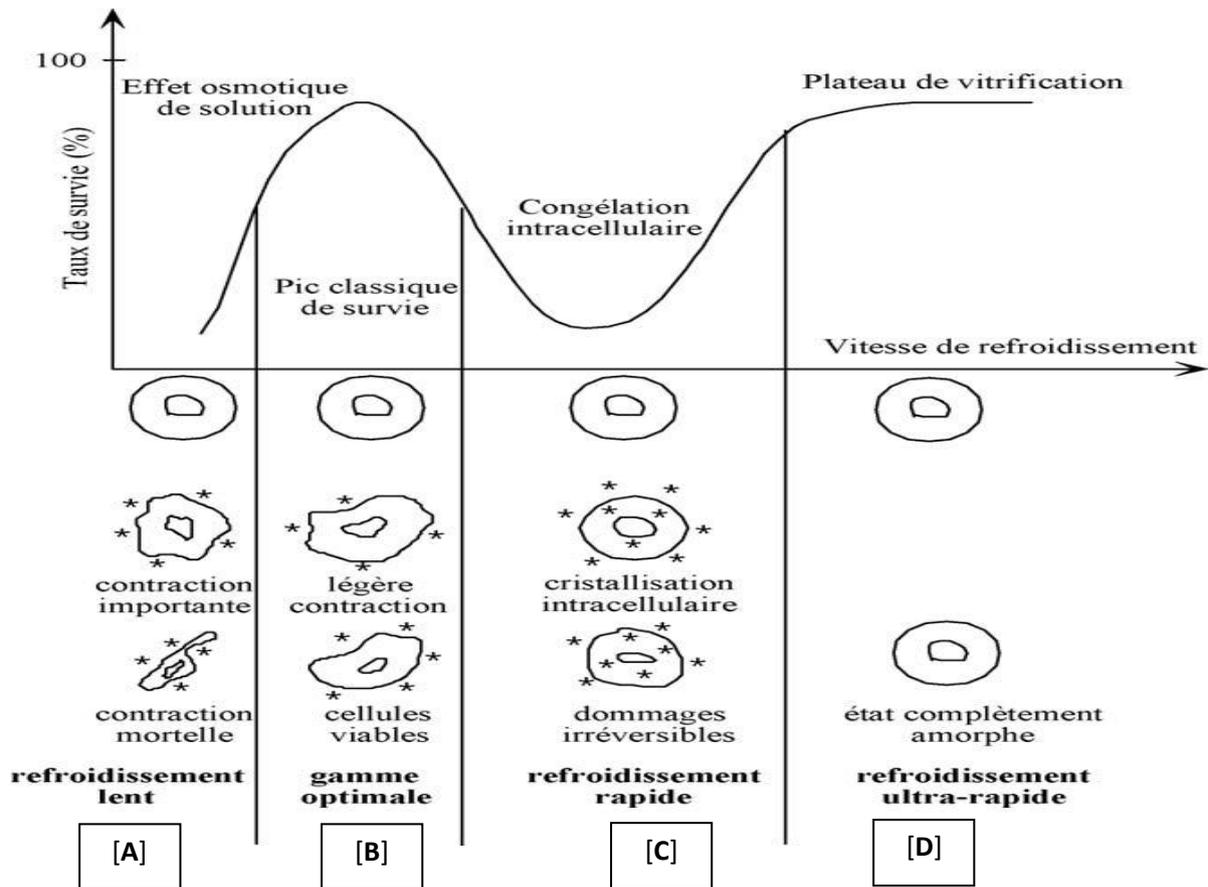
➤ La cristallisation intracellulaire se produit en absence des cristaux de glace extracellulaires quand la température de nucléation est inférieure de  $-30^{\circ}\text{C}$  (Barry *et al.*, 2004).

➤ Si les cristaux de glace extracellulaires se forment au delà de la température de nucléation, la cellule restera non gelée, quoique son eau soit surfondu, c'est-à-dire au dessus de la température de nucléation spontanée les cristaux de glace intracellulaires ne se forment pas même en présence des cristaux de glace extracellulaires (Barry *et al.*, 2004). Au dessus de la température de nucléation spontanée, la membrane plasmique constitue une barrière physique contre la propagation des cristaux de glace extracellulaires à l'intérieur de la cellule (Zhmakin, 2009). L'induction de cristallisation aussi appelée « seeding » à une température supérieure à la température de nucléation spontanée (cristallisation spontanée) permet d'éviter la formation des cristaux de glace intracellulaires (Reed, 2008). Par différents mécanismes d'action, les cryoprotecteurs empêchent la formation des cristaux de glace intracellulaires pendant la congélation lente et assurent un état amorphe intra et extracellulaire pendant la vitrification (Fuller *et al.*, 2004).

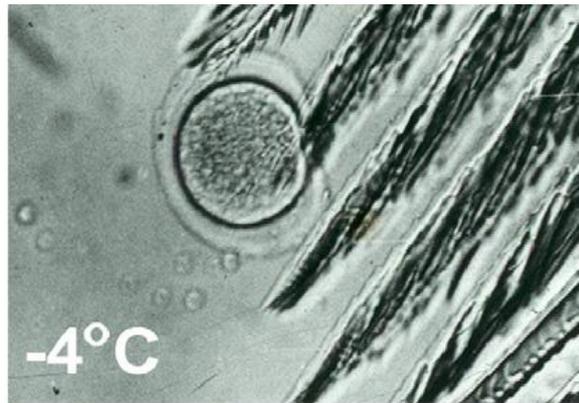
#### **I.6.1.2.2.4. Plateau de cristallisation**

Une fois que la nucléation produite, la croissance en cristal rapide a comme conséquence de libérer de la chaleur (la cristallisation c'est une réaction exothermique), ce qui entraîne une élévation de la température en la ramenant à celle de la congélation. La température de l'eau pure demeure alors constante pendant un certain temps jusqu'à ce que toute l'eau soit transformée en glace, puis si le refroidissement externe est maintenu, la température de l'eau diminue encore (Figure n° 15) (Zhmakin, 2009).

L'eau contenue dans les cellules n'est pas pure, elle peut être assimilée à une solution aqueuse qui contient des électrolytes, des protéines et d'autres solutés (cryoprotecteurs) qui modifient ses propriétés physico-chimiques. Toute solution aqueuse possède une température de congélation qui dépend de sa concentration en solutés. Cette température diminue avec l'augmentation de la concentration du milieu. En conséquence, la température du début de



**Figure 17 :** Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement (Courbière et *al.*, 2009).



**Figure 18 :** Formation des cristaux extracellulaire (Leibo, 2008)

congélation (notée  $T_c$ ) n'est pas la même que la température de fin de congélation (notée  $T_f$ ) car les électrolytes qui restent dans la partie non gelée se concentrent au fur et à mesure que celle-ci croît. On obtient alors une nouvelle courbe de congélation (Figure n° 16) (Lornage, 1994).

### **I.6.1.2.3. Effet de la vitesse de refroidissement sur la cellule (vitesse de cristallisation)**

Pendant la congélation, le comportement de la cellule est tributaire de la vitesse de formation des cristaux (vitesse de cristallisation), elle-même régie par la vitesse de refroidissement.

#### **I.6.1.2.3.1. Refroidissement très lent**

Si une solution isotonique contenant une cellule est refroidie, les cristaux de glace vont se former en premier lieu dans le milieu extracellulaire (Figure n° 18) (Vanderzwalmen *et al.*, 2010). En effet, du fait de ses divers constituants naturels, la solution intracellulaire est initialement plus concentrée que la solution extracellulaire (Courbièrel *et al.*, 2009). Comme les premiers cristaux sont formés à partir d'eau pure, les sels dissouts dans l'eau voient leur concentration augmenter car l'eau est progressivement piégée dans la glace dont les cristaux se composent uniquement d'eau pure (Courbièrel *et al.*, 2009) et la solution devient hypertonique. De l'eau intracellulaire va sortir de la cellule embryonnaire par osmose pour rééquilibrer le milieu. De l'eau sort, la cellule se déshydrate (Figure n° 17[A]). C'est ce que l'on appelle l'effet solution. Comme pour la formation de glace intracellulaire, cet effet peut s'appliquer à toutes les cellules qui constituent l'embryon (Seidel, 1996).

Lors de la congélation, les cristaux de glace se forment, généralement, d'abord dans le milieu extracellulaire. Il peut résulter de cette déshydratation une importante diminution du volume des cellules et par effet osmotique elle peut endommager la membrane cellulaire et altérer le cytosquelette intracellulaire si elle conduit à une forte contraction des cellules. Les tensions exercées sur la membrane provoquent alors une diminution irréversible du volume cellulaire, jusqu'au moment où les cellules atteignent le volume critique, au dessous duquel elles meurent du fait de fortes contraintes mécaniques (Odagescu, 2005).

#### **I.6.1.2.3.2. Refroidissement rapide**

Si le refroidissement est trop rapide, les cellules n'ont pas assez de temps pour se déshydrater suffisamment par effet osmotique, avec un risque de formation de glace intracellulaire (Figure n° 17 [C], 18) (Bakhach *et al.*, 2007). Ce type de glace est létal pour la majorité des cellules. Elle peut provoquer la destruction des structures internes des cellules et déchirer leurs membranes (Odagescu, 2005).

### **I.6.1.2.3.3. Refroidissement correspondant au pic de survie**

Il est possible de déterminer, pour un type de cellule donné, une zone de vitesse de refroidissement pour laquelle le taux de survie est maximum (Figure n° 17 [B]). Il s'agit du pic classique de survie. C'est le compromis entre les vitesses lentes de refroidissement qui provoquent la contraction par déshydratation et déformation des cellules et les vitesses rapides qui entraînent la formation de glace intracellulaire (Odagescu, 2005). Cette méthode est largement utilisée à l'heure actuelle pour la conservation par congélation de cellules isolées (spermatozoïdes, globules rouges...). Il existe pour chaque type de cellule une vitesse de refroidissement optimale permettant la congélation la moins délétère possible. Dans de telles conditions, pendant le refroidissement, les cellules se déforment peu, les lésions mécaniques sont donc moindres (Courbière *et al.*, 2009). De plus, la surconcentration du milieu intracellulaire empêche la formation de glace dans les cellules. Par conséquent, on peut supposer qu'il y a vitrification du milieu intracellulaire. La valeur de la vitesse au maximum de ce pic est dépendante du type cellulaire, du type de cryoprotecteur et de sa concentration.

### **I.6.1.2.3.4. Refroidissement ultrarapide (vitrification)**

Si la concentration en cryoprotecteur dans la solution cryoprotectrice est élevée, le taux de survie augmente de nouveau pour les vitesses ultrarapides par l'immersion directe dans l'azote liquide (Figure n° 17 [D]). La survie est alors élevée, pratiquement égale à celle au pic classique (Figure n° 18) (Vanderzwalmen *et al.*, 2010). Dans ce cas, en raison de la forte concentration en solutés et en cryoprotecteurs intra et extracellulaires qui augmente la viscosité des liquides et l'immersion directe des embryons dans l'azote liquide, les liquides se solidifient si rapidement que les molécules n'ont pas le temps de se réarranger en structure cristalline. Ce qui induit la formation d'un état vitreux intra- et extracellulaire (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

A partir du comportement des cellules à différentes vitesses de refroidissement, deux techniques principales sont utilisées en cryobiologie pour cryoconserver les cellules : soit une technique de congélation dite congélation lente qui correspond au pic de survie [B], soit une technique de vitrification exigeant un refroidissement dite « d'ultrarapide » en comparaison au pic de survie (Courbière *et al.*, 2009).

## **I.6.2. Cryoprotecteurs**

La stratégie de résistance au froid de certains animaux poïkilothermes dits à sang froid démontre la possibilité de survivre à de très basses températures, souvent très en dessous de la température de congélation de leurs liquides biologiques. Ces animaux, comme par exemple

**Tableau 7 : Classification des cryoprotecteurs (Borini *et al.*, 2009)**

Penetrating Cryoprotectants	Non-penetrating cryoprotectants		
Increasing Molecular Weight 			
MW <100 Da Low molecular weight agents	180 Da < MW < 594 Da Sugars		MW >1000 Da High molecular weight agents
Formamide	Monosaccharides	Glucose	Polyethylene glycol
Acetamide		Fructose	Polyvinyl pyrrolidone
Ethylene glycol (EG) <sup>a</sup>		Lactose	Dextran
Dimethyl sulfoxide <sup>a</sup> ; Propylene glycol <sup>a</sup>	Disaccharides	Sucrose	Ficoll
2,3-Butanediol		Trehalose	Polyvinyl alcohol
Glycerol <sup>b</sup>	Polysaccharides	Raffinose	Hydroxyethyl starch

 Increasing molecular weight

certains lézards, tortues ou arthropodes, arrivent à empêcher les processus de cristallisation grâce à la synthèse de substances antigels parmi lesquelles on compte le glycérol, le glucose, le sorbitol, des glycoprotéines antigel naturelles. Ces substances antigel régulent les processus de cristallisation et sont appelées cryoprotecteurs (Courbière *et al.*, 2009). Les cryoprotecteurs sont indispensables lors de la congélation car quelque soient les courbes de refroidissement, les embryons de mammifères ne survivent pas à des températures inférieures à  $-20^{\circ}\text{C}$  en l'absence de ces substances (Legrand *et al.*, 1997).

Les objectifs de la cryoconservation sont de limiter ces lésions et pour cela, des cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants la cellule sont utilisés. De plus, la vitesse de congélation et le volume congelé sont contrôlés (Chian *et al.*, 2010).

### **I.6.2.1. Définition**

Les cryoprotecteurs sont des composés chimiques, naturels ou de synthèse dont le but est de protéger les cellules des effets délétères des très basses températures (Courbière *et al.*, 2009). On distingue deux catégories de cryoprotecteurs:

### **I.6.2.2. Cryoprotecteurs pénétrants la cellule**

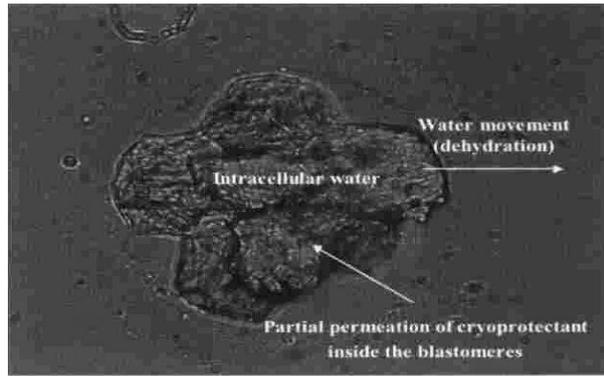
Ce sont des substances organiques très solubles, dérivées le plus souvent d'alcools ou du diméthylsulfoxyde (DMSO). Ils sont caractérisés par un poids moléculaire faible (Tableau n°7). Les cryoprotecteurs les plus utilisés en biologie de la reproduction sont : 1.2 propanediol (PM=76.1), DMSO (PM=78.13), glycérol (PM=92.1), éthylène-glycol (PM=62.07) et d'autres alcools (Palasz, 1996). Voelkel et Hu (1992) ont montré l'efficacité de l'éthylène glycol à une concentration de 1.5 M en tant que cryoprotecteur pour les embryons de la vache. La basse toxicité de l'éthylène glycol a été démontrée par Sommerfeld et Niemann (1999) qui ont examiné des concentrations de 1.8 à 8.9 M.

### **I.6.2.3. Les cryoprotecteurs non pénétrants la cellule**

- **A poids moléculaire faible**, nous citons : galactose (PM=180.2), glucose (PM=181.1), sucrose (PM =342.3), tréhalose (PM=378.3) et tous autres sucres (Tableau n°7).
- **A poids moléculaire élevé** ( $> 50,000$  Daltons) comme la polyvinylpyrrolidone (7.34), l'alcool polyvinylique (34.109), l'amidon hydrox éthylique (7.34), le hyaluronate de sodium (46.78) et d'autres polymères (Palasz *et al.*, 1996).

### **I.6.2.4. Mode d'action**

Les cryoprotecteurs contiennent des groupements électronégatifs capables de former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Ainsi, si les molécules d'eau sont fortement liées au



**Figure 19 :** Embryon humain (8-cellules) déshydraté. L'eau intracellulaire est remplacée par les cryoprotecteurs (Liebermann *et al.*, 2003).

cryoprotecteur, leur mobilité diminue et la viscosité de la solution augmente, avec comme conséquence une diminution du taux de cristallisation. Grâce à leur grande affinité avec l'eau, les cryoprotecteurs interfèrent donc avec les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace (Courbière *et al.*, 2009).

Les cryoprotecteurs sont capable de diminuer le point de congélation des solutions. Ces dernières peuvent rester à l'état dégel de -5 °c jusqu'à -15°C (Veeck, 2003).

Les cryoprotecteurs aident à déshydrater les cellules par l'effet osmotique, réduisant ainsi la quantité d'eau intracellulaire et en résulte une diminution du risque de formation des cristaux (Figure n° 19) (Veeck, 2003).

Bien que, les mécanismes de cryoprotection font encore l'objet de nombreuses recherches, les scientifiques s'accordent à dire que le cryoprotecteur, qu'il soit pénétrant ou non, a une action avérée sur les processus de congélation et de décongélation, conditionnant le succès des ces dernières (Palasz *et al.*, 1996).

#### **I.6.2.4.1. Cryoprotecteurs pénétrants la cellule**

La présence des cryoprotecteurs pénétrants à faible poids moléculaire sont absolument nécessaire. A l'intérieur des cellules, ils augmentent la concentration des solutés intracellulaires afin de diminuer la formation de cristaux intracellulaires (Courbière *et al.*, 2009). A fortes concentrations, ils empêchent même toute cristallisation et conduisent à un état dit vitrifié, solide mais sans cristaux (Dessolle *et al.*, 2009).

#### **I.6.2.4.2. Cryoprotecteurs non pénétrants la cellule**

- **A poids moléculaire faible**

Leur principe d'action est d'entraîner une fuite d'eau intracellulaire par effet osmotique : l'augmentation de la concentration en solutés intracellulaires qui en résulte vise à empêcher la cristallisation dans les cellules (Courbière *et al.*, 2009). Ils réduisent la quantité de cryoprotecteurs intracellulaire. En fait, l'incorporation du sucrose a réduit de manière significative la toxicité d'une solution de vitrification (Kaisi *et al.*, 2004). Au cours de la décongélation, ils préviennent le choc osmotique en maintenant l'osmolarité du milieu extracellulaire (Dessolle *et al.*, 2009).

L'incorporation des cryoprotecteurs non pénétrants dans la solution de vitrification et l'incubation de la cellule dans cette solution permet à l'eau de fuir le compartiment intracellulaire et de diminuer le temps d'exposition à l'effet toxique des cryoprotecteurs (Liebermann *et al.*, 2003). Cependant, ils doivent être combinés avec des cryoprotecteurs pénétrants pour protéger, efficacement, les cellules pendant la congélation (Kaisi *et al.*, 2004).

- **A poids moléculaire élevée**

Les polymères, à haut poids moléculaire, sont généralement, moins toxiques et peuvent protéger les embryons contre le froid en augmentant la viscosité de la solution. La matrice visqueuse dans laquelle les embryons sont encapsulés prévient aussi la cristallisation de l'eau pendant le refroidissement et le réchauffement. Kuleshova *et al.*, (2001) ont constaté une plus grande survie des ovocytes après vitrification avec des macromolécules qu'avec une solution de vitrification classique contenant seulement des cryoprotecteurs pénétrants.

Les cryoprotecteurs de ce groupe protègent les cellules d'embryon pendant la congélation et le réchauffement en changeant la formation des cristaux de glace à une taille et à une forme inoffensives (Palasz *et al.*, 1996).

### **I.6.2.5. Choix des cryoprotecteurs**

Le choix de cryoprotecteurs dépend de la toxicité, la solubilité, la pénétration cellulaire et la vitesse de refroidissement utilisée (Borini *et al.*, 2009).

#### **I.6.2.5.1. Toxicité**

Tous les cryoprotecteurs pénétrant sont toxiques pour la cellule particulièrement à des concentrations élevées (Youssry *et al.*, 2008). En effet, la vitrification nécessite une concentration élevée de cryoprotecteur, l'effet toxique de ce dernier devient un grand obstacle (Mukaida *et al.*, 2002). Plusieurs cryoprotecteurs sont testés pour leur toxicité et les résultats montrent que l'éthylène glycol est le moins toxique suivi par le glycérol (Liebermann *et al.*, 2003).

Différentes méthodes existent pour limiter la toxicité des cryoprotecteurs. L'utilisation d'une solution contenant deux cryoprotecteurs différents diminue la toxicité relative de chacun. Une autre alternative consiste en l'ajout de macromolécules à la solution cryoprotectrice (Kaisi *et al.*, 2004). L'addition des molécules à haut poids moléculaire tel que le saccharose aux milieux de vitrification permet de réduire la quantité de cryoprotecteur intracellulaire nécessaire pour la cryopreservation et, par conséquent, de réduire la toxicité du cryoprotecteur (Liebermann *et al.*, 2003).

#### **I.6.2.5.2. La diffusion**

La diffusion des cryoprotecteurs dans et hors des cellules est réglée par des paramètres de diffusion propres au cryoprotecteur et au type cellulaire (Odagescu, 2005).

La taille des molécules de cryoprotecteur (corrélée à leur poids moléculaire) mais aussi leur liposolubilité influencent leur vitesse de diffusion :

- vitesse de pénétration : méthanol (32D) > propanediol (76,10D) > éthylène glycol

(62,07)> DMSO (78,13D)> glycérol (92,09D), parfois la diffusion semble trop rapide par rapport au degré de liposolubilité et du poids moléculaire : c'est le cas du méthanol et de l'éthylène glycol pour lesquels a été avancée l'hypothèse d'une diffusion facilitée par certaines protéines de la membrane plasmique (Arakawa *et al.*, 1990). Grâce à son poids moléculaire faible et sa perméabilité rapide, l'éthylène glycol est le plus utilisé en cryopreservation des embryons (Zhmakin, 2009).

Il est important de mentionner que les cryoprotecteurs doivent être choisis, premièrement, par leur faible toxicité et, secondairement, par leur diffusion (Liebermann *et al.*, 2003).

#### **I.6.2.5.3. Le stade du développement embryonnaire**

Il a été démontré que certains cryoprotecteurs sont convenable pour les premiers stades du développement, et d'autres sont adéquat pour les stades tardifs. Diméthylsulfoxyde (DMSO) et 1,2-propanediol (PROH) sont, plus fréquemment, utilisés pour congeler les embryons aux premiers stades (pré-embryon), le propylène glycol, glycérol et l'éthylène glycol sont, généralement, utilisés pour congeler les blastocystes (Veeck, 2003).

#### **I.6.2.5.4. La vitesse de refroidissement**

En pratique courante, la cryopreservation des oocytes et des embryons avec des techniques de congélation conventionnelles (vitesse de refroidissement lent) comporte, le plus fréquemment, l'utilisation d'un cryoprotecteur simple tel que le glycérol, l'éthylène-glycol, ou le propanediol, tandis que, la congélation rapide (vitesse de refroidissement rapide) ou la vitrification comportent l'utilisation des mélanges de cryoprotecteurs tels que le glycérol et l'éthylène-glycol, le glycérol et le propanediol ou le propanediol et l'éthylène-glycol en combinaison avec le saccharose, le trehalose ou le galactose (Palasz *et al.*, 1996).

### **I.6.2.6. Composants supplémentaires**

#### **I.6.2.6.1. Sérum**

Le sérum est un composant commun des milieux de congélation des cellules, il stabilise les membranes cellulaires des embryons, empêche le durcissement de la zone pellucide des embryons et des ovocytes pendant le processus de congélation et d'autres fonctions mal définies. Les sérums des mammifères les plus utilisés sont le sérum du veau foetal (FCS) ou donor bovine serum (DBS, sérum de bovin) (Palasz *et al.*, 1996).

#### **I.6.2.6.2. Composants du sérum**

Des composants raffinés de sérum sont utilisés dans les milieux de conservation. L'albumine du sérum bovin (BSA) est la macromolécule la plus, généralement, utilisée dans les milieux de culture et de conservation d'embryon. L'albumine est différente d'un sérum à l'autre. Il

faut, donc, examiner chaque groupe d'albumine pour déterminer sa capacité de soutenir le développement embryonnaire (Gardner *et al.*, 2004).

Des sérums biologiques et ses composants raffinés ont été souvent contaminé par des virus représentent un risque de transmission des maladies via le transfert d'embryon, ce qui peut compromettre le commerce international des embryons animaux.

On peut éliminer le risque de contamination d'embryon par le sérum en utilisant des molécules de remplacement tel que l'albumine recombinante de sérum humain, le hyaluronan et les macromolécules de synthèse. Le hyaluronan est présent dans l'oviducte et des fluides utérins des vaches (Block *et al.*, 2009). L'utilisation de l'albumine de recombinaison et hyaluronan dans les milieux de congélation confère un avantage synergique à l'embryon (Block *et al.*, 2009).

#### **I.6.2.6.3. Protéines antigel**

Les protéines antigel (antifreeze protein : AFPs) sont des cryoprotecteurs naturels trouvés dans les plantes, les insectes (Barry, 2004), et dans nombreux poissons arctique et antarctique (Inglis *et al.*, 2006).

Les AFPS adhèrent aux cristaux de glace pour prévenir leur croissance durant le refroidissement et le réchauffement, donc, la diminution du dommage cellulaire. *In vitro*, ils stabilisent la membrane cellulaire durant le stockage hypothermique (Martínez-Páramo *et al.*, 2009).

#### **I.6.2.7. Préparation des solutions de cryoconservation**

Des solutions cryoprotectrices sont habituellement préparées dans des milieux tampons avec un pH stable entre 7.2 et 7.4. Bien que le Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS) soit généralement le plus utilisé, les autres milieux tampons tels que le TCM-199 ou les salins physiologiques simples ont été également employés avec succès (Palasz *et al.*, 1996).

### **I.6.3. Lésions de l'embryon durant la cryoconservation**

Les manipulations durant les différentes étapes du transfert embryonnaire exposant les embryons aux dangers de lésions de plusieurs facteurs tels que la toxicité des cryoprotecteurs ; les lésions de réfrigération ; les dommages mécaniques de formation des cristaux de glace; la toxicité des électrolytes concentrés ; les lésions de rupture et le gonflement osmotique (Kasai, 1996).

### **I.6.3.1. Lésions pendant la congélation**

#### **I.6.3.1.1. Lésions de refroidissement**

Ce type de dommage survient entre +15 et -5, aussi appelé lésions de chilling (Vajta *et al.*, 2006). Dans cet intervalle, les lésions intracellulaires touchent, principalement, le cytoplasme notamment les gouttelettes lipidiques, le cytosquelette et les fuseaux mitotiques et méiotiques. Cependant, les lésions du noyau sont minimales pendant le refroidissement (Smith *et al.*, 2004).

Le cytosquelette est un ensemble de fibres qui parcourent le cytoplasme. Leur fonction principale consiste à apporter un soutien mécanique et à lui conserver sa forme (Daniel *et al.*, 2004). Il comprend principalement les microtubules et les filaments d'actine. Ils sont sensibles aux stress mécanique, thermique et chimique qui se produisent au cours du refroidissement. Ces fibres interviennent également dans la division cellulaire notamment la formation des fuseaux mitotiques et méiotiques (Chian *et al.*, 2010).

Chez la souris, une dépolymérisation des fuseaux méiotiques des ovocytes en métaphase II se produit lors de la baisse de la température aux alentours de +10°C. Elle est plus ou moins réversible selon les espèces (Ambrosini *et al.*, 2006). Cette dépolymérisation expliquerait une mauvaise répartition des chromosomes (aneuploïdie, polyploïdie) (Coticchio *et al.*, 2004) et également une expulsion prématurée des granules corticaux (Bernard *et al.*, 1996).

À certains stades, les embryons de quelques espèces (porc, avant l'étape de péri-éclosion) sont sensibles seulement au refroidissement au dessous de +20°C. Avec cette sensibilité au refroidissement, les embryons semblent sombres avec les gouttelettes cytoplasmiques de lipide. Les stratégies possibles pour éviter ces dommages sont d'enlever les gouttelettes lipidiques, d'employer des embryons aux stades avancés quand la quantité de gouttelettes a diminué ou adopter le refroidissement ultra-rapide (vitrification) et le réchauffement rapide dont la température critique peut être dépassée rapidement (Tucker *et al.*, 2007).

#### **I.6.3.1.2. Formation des cristaux de glace et l'effet de solution**

- **Congélation lente**

La formation des cristaux de glace extra et intracellulaire est considérée comme la source majeure des lésions des membranes et les organites cellulaires tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries et la dénaturation du cytosquelette de la cellule (Baust *et al.*, 2007). Le phénomène peut se produire entre -5 et -80°C (principalement, entre -5 et -40°C) et a, la plupart du temps, des effets mécaniques délétères sur toutes les structures (Tucker *et al.*, 2007).

Lors de la congélation lente, les cristaux de glace vont se former d'abord dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne une augmentation de la concentration des solutés à l'extérieur des

cellules. L'augmentation de la concentration en composés dissous dans le liquide extracellulaire engendre la fuite, hors de la cellule, d'une partie de l'eau intracellulaire afin de rétablir l'équilibre osmotique. De l'eau sort, la cellule se déshydrate. C'est ce que l'on appelle l'effet solution (Karlsson *et al.*, 2000).

La toxicité de l'effet solution pourrait être de deux types. D'une part, ce serait la forte concentration en solutés intracellulaires qui endommagerait la cellule. D'autre part, la contraction induite par une déshydratation trop importante, réduirait le volume de l'embryon jusqu'à une valeur seuil que l'embryon ne pourrait plus tolérer, ce qui endommagerait les membranes (Courbière *et al.*, 2009).

Il existe plusieurs hypothèses qui soutiennent que la formation des cristaux de glace intracellulaire est due à la propagation des cristaux de glace extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. La membrane cellulaire est une barrière contre la propagation de la glace du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Cependant, la vitesse rapide de refroidissement permet de former des cristaux de glace extracellulaires de petites tailles. Ces derniers traversent les pores de la membrane cellulaire ce qui permettent la propagation de la glace vers l'intérieur de la cellule (Meryman, 2007). La présence des lésions membranaires aide aussi à la formation de la glace intracellulaire. Malgré ces hypothèses et d'autres qui sont basées sur l'implication de la glace extracellulaire dans le déclenchement du processus de cristallisation intracellulaire, les mécanismes qui régulent ces interactions restent encore non élucidés (Bakhach *et al.*, 2007).

Le but principal de la congélation lente est d'empêcher la cristallisation intracellulaire et de réaliser l'état de vitrification à l'intérieur de la cellule (Meryman, 2007).

Pour empêcher les lésions causées par les cristaux de glace intracellulaire, l'embryon doit être chargé avec un cryoprotecteur, et la solution de congélation doit être refroidie lentement de sorte que le contenu cellulaire devienne concentré par déshydratation progressive en réponse à la concentration de la fraction non gelée extracellulaire pendant la croissance de la glace extracellulaire (Gardner *et al.*, 2004).

La vitesse optimale de refroidissement permet à la cellule de se déshydrater suffisamment (Bakhach *et al.*, 2007) et permet aussi de former des cristaux de glace extracellulaire de grandes tailles. Ces derniers peuvent être tolérés par la cellule. Les grands cristaux extracellulaire ne traversent pas la membrane cellulaire, donc il n'y a pas de propagation de la glace extracellulaire vers l'intracellulaire (Meryman, 2007). L'utilisation des cryoprotecteurs extracellulaires permet de contrôler la croissance des cristaux de glace extracellulaires qui peuvent entraîner, parfois, des lésions létales pour la cellule (Palasz *et al.*, 1996).

- **Vitrification**

Pendant la congélation la formation de glace extracellulaire est un préalable à la cristallisation intracellulaire. Avec la méthode de vitrification, la chance de la formation de glace intracellulaire est très minime parce qu'il n'y a aucune glace en dehors des cellules pendant la vitrification. Cependant, la glace intracellulaire peut se former même dans la vitrification si la concentration en cryoprotecteurs dans la cellule n'est pas assez haute. Dans une solution avec une quantité réduite de cryoprotecteurs, la glace peut se former dans la solution pendant le réchauffement, un processus connu sous le nom de « dévitrification ». Cette dernière n'est pas nocive aussi longtemps que la glace reste en dehors de la cellule (Gardner *et al.*, 2004).

#### **I.6.3.1.3. Fracture de la zone pellucide**

Le dommage de fracture de la zone pellucide survient, généralement, entre -80 et -150°C. Ce type de dommage survient plus souvent pendant le réchauffement, et peut être minimisé en diminuant légèrement la vitesse de changements de température dans cette zone de température, bien que cette approche soit plutôt empirique et soit sans explication scientifique claire (Tucker *et al.*, 2007).

Les dommages de fractures sont également liés au support pour les embryons, avec des supports plus flexibles ayant pour résultat moins de dommages (Gardner *et al.*, 2004 ; Vajta *et al.*, 2006). Ce dommage de fracture augmente l'incidence de polyspermie pour l'ovocyte. La fracture de la zone pellucide peut toucher aussi les embryons pendant la congélation lente et le réchauffement. Plusieurs études ont montrés que la fracture de la zone pellucide post-réchauffement ne présente pas un problème pour le développement des blastomères et la viabilité de l'embryon (Smith *et al.*, 2004).

#### **I.6.3.2. Les lésions pendant le réchauffement**

Les lésions qui se produisent, durant le réchauffement lent, sont les mêmes que celles observées pendant la congélation, évidemment dans un ordre d'inversion (Tucker *et al.*, 2007).

Le réchauffement lent des embryons congelés par la technique de congélation lente entraîne une formation des cristaux de glace de grandes tailles (recristallisation) qui sont létales pour la cellule.

La cristallisation (dévitrification) peut se produire aussi durant le réchauffement des embryons vitrifiés. Cette dévitrification est responsable de lésions irréversibles de la cellule (Barry *et al.*, 2004). Le réchauffement doit être rapide pour éviter la recristallisation et la dévitrification des embryons congelés, donc, prévenir des lésions de la cellule (Dessolle *et al.*, 2009).

La taille a une importance dans le cas des objets relativement petits, par exemple, les ovocytes, les zygotes, et les embryons de premiers stades sont, généralement, plus sensibles aux dommages que les blastocystes. Cependant, juste après l'éclosion, avec l'augmentation importante de la taille et la complexité croissantes, les chances du succès de cryopreservation diminuent radicalement (Tucker *et al.*, 2007).

### **I.6.3.3. Toxicité des Cryoprotecteurs**

L'utilisation des cryoprotecteurs et le contrôle des vitesses de refroidissement et de réchauffement sont deux éléments essentiels pour réduire les lésions causées par les cristaux de glace pendant la cryoconservation. L'effet le plus important (mais pas le seul) des cryoprotecteurs est de minimiser la formation des cristaux de glace soit par enlèvement de l'eau du cytoplasme avec l'effet osmotique (cryoprotecteurs non pénétrants), soit par interférant avec la nucléation et la croissance de glace à l'intérieur du cytoplasme ou dans milieu extracellulaire entourant étroitement les cellules (cryoprotecteurs extracellulaires).

Malheureusement, l'utilisation des concentrations élevées en cryoprotecteurs pendant la vitrification induit une nouvelle source des dommages (Tucker *et al.*, 2007). Les cryoprotecteurs sont à l'origine de deux types de toxicité :

#### **I.6.3.3.1. Une toxicité par stress osmotique**

- **l'addition de cryoprotecteur (milieu de congélation)**

Puisque la membrane de cellules est habituellement plus perméable pour l'eau qu'aux cryoprotecteurs, l'addition de cryoprotecteur crée un environnement hypertonique. L'eau sera diffusée plus rapidement hors la cellule que le cryoprotecteur diffuse dans la cellule, et la cellule se rétrécit. Puis la pénétration de cryoprotecteur dominera le transport, et la cellule augmentera lentement en volume car le cryoprotecteur diffuse dans la cellule. Pendant cette phase de gonflement, l'eau aussi rediffuse dans la cellule par osmose (concentration de cryoprotecteur intracellulaire) (Karlsson *et al.*, 2000).

Pour éviter un choc osmotique brutal pendant la vitrification, il est préférable de réaliser une exposition progressive par paliers lors de l'exposition aux cryoprotecteurs, avec des bains de concentrations molaires croissantes (Courbière *et al.*, 2009).

- **Enlèvement du cryoprotecteur (milieu de décongélation)**

- **Le gonflement osmotique**

Juste après le réchauffement, les embryons cryopreservés contiennent un cryoprotecteur pénétrant, qui doit être enlevé (Courbière *et al.*, 2009). Si les embryons sont directement récupérés dans une solution isotonique, ils risquent des dommages du gonflement osmotique parce que l'eau diffuse plus rapidement bien que le cryoprotecteur diffuse dehors (Guignot, 2005). La stratégie la plus commune pour empêcher ces dommages est de diluer des embryons avec une solution hypertonique contenant le sucrose comme sucre non pénétrant la cellule pour contrecarrer l'apport de l'excès d'eau (Courbière, 2009). L'inclusion de sucrose dans la solution de cryopreservation peut aider à prévenir les cellules de se gonfler car le sucrose favorise le rétrécissement des cellules avant la dilution (Guignot, 2005).

- **Plasmolyse osmotique**

Quand on utilise une solution de sucrose durant la dilution de l'embryon, le cryoprotecteur pénétrant diffuse hors des cellules et, par conséquent, les embryons demeurent rétrécies. Par osmose, l'eau des cellules embryonnaires va, donc, sortir dans le milieu extracellulaire. C'est l'effet de solution. Il présente un grand risque pour l'embryon, car une augmentation trop forte de la concentration des solutés intracellulaires entraîne la mort cellulaire par effet de salage. Pour éviter ce type de lésion, après la première étape de diffusion du cryoprotecteur pénétrant hors de la cellule dans une solution hypertonique (saccharose), les embryons devraient être transférés dans une solution moins hypertonique et, finalement, dans une solution isotonique (Guignot, 2005).

Le glycérol était le cryoprotecteur le plus, généralement, utilisé. Cependant, car des embryons congelés en glycérol doivent être transférés dans les solutions d'enlèvement de cryoprotecteur pendant la décongélation, le glycérol a été remplacé par l'éthylène glycol. Ce dernier diffuse dans et hors de l'embryon plus rapidement et permet "le transfert direct" d'embryons (sans *ex vivo* lavage) et prévoit le taux de gestation similaire (Scherzer *et al.*, 2008).

#### **I.6.3.3.2. Les effets biochimiques toxiques**

Ils sont différents pour chaque cryoprotecteur et dépendent de la concentration en cryoprotecteurs et de la durée d'exposition. Cette toxicité peut être réduite en cas d'utilisation de mélanges de cryoprotecteurs par diminution de leur concentration respective, car les toxicités de certains cryoprotecteurs se compensent : ainsi par exemple, le formamide et le DMSO neutralisent leur toxicité.

Les dommages osmotiques sont mieux compris et plus fréquemment étudiés que la toxicité chimique et biochimique qui est plus évasive. Bien que la recherche sur la toxicité chimique et/ou

biochimique soit essentielle pour améliorer la survie d'embryon de post-réchauffement (Palasz *et al.*, 2000).

#### **I.6.4. Congélation lente**

##### **I.6.4.1. Définition**

C'est une congélation classique basée sur l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et l'embryon et elle utilise une descente programmée de la température dans un appareil de congélation après une exposition à des cryoprotecteurs de faible concentration qui conduisent à une déshydratation cellulaire et limitent la formation de cristaux intracellulaires (Dessolle *et al.*, 2009).

##### **I.6.4.2. Conditions de la congélation lente**

###### **I.6.4.2.1. Équilibration entre l'embryon et le milieu de congélation**

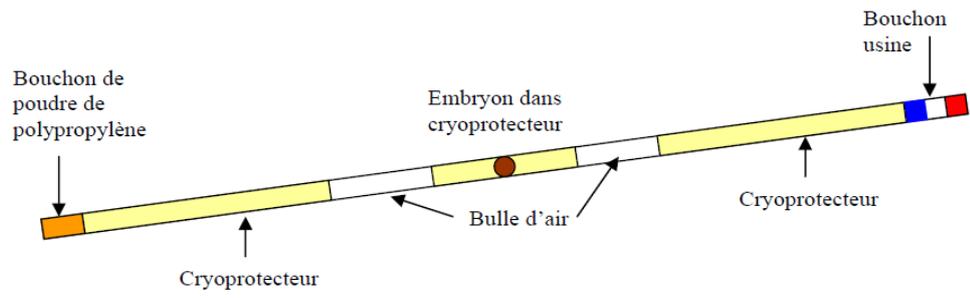
Il a été montré que la cellule placée dans un milieu contenant un cryoprotecteur, son eau la quitte rapidement, contrairement au cryoprotecteur pénétrant (Gardner *et al.*, 2009). Donc, avant la congélation, les embryons se sont partiellement déshydratés dans un milieu contenant un cryoprotecteur. Les embryons ont besoin de temps pour leur équilibre dans la solution cryoprotectrice (Andrews *et al.*, 2004). Le temps et la température de l'équilibration dépendent de cryoprotecteur utilisé (Karow *et al.*, 1997).

###### **I.6.4.2.2. Induction de la cristallisation « seeding »**

Lors de la congélation, les cristaux de glace se forment généralement d'abord dans le milieu extracellulaire (Courbière *et al.*, 2009) ce qui entraîne une augmentation en concentrations des solutés (les sels) extracellulaires, le milieu intracellulaire reste non gelé et devient partiellement surfuser à cause de la diminution du point de congélation grâce à l'influx de cryoprotecteur dans la cellule et la déshydratation de la cellule par phénomène d'osmose (concentrations élevées des solutés extracellulaires) (Tulandi *et al.*, 2004).

Pendant la phase de surfusion de milieu de congélation, les cellules ne se sont pas déshydratées, et quand la cristallisation extracellulaire spontanée se produit (-6 à -15°C), la cristallisation du milieu se fait très rapidement et par conséquent les cellules n'ont pas le temps de se déshydrater et donc des cristaux intracellulaires se forment (Sailley, 2008).

L'induction de cristallisation, connue, aussi, sous le nom de seeding, élimine les effets néfastes de la congélation rapide qui se produit quand la cristallisation spontanée de glace se produit (Palasz *et al.*, 1996). La vitesse de cristallisation extracellulaire induite qui est moins rapide que



**Figure 20 :** La place d'un embryon dans une paille (Allard, 2004)

celle de la cristallisation spontanée permet aux cellules de se déshydrater avant la congélation. Cette dernière entraîne une élévation en solutés intracellulaire ce qui minimise la formation des cristaux de glaces intracellulaire et permet de former un état vitreux intracellulaire (Vajta *et al.*, 2006).

#### **I.6.4.2.3. Support de conditionnement**

Pendant la congélation lente les embryons bovins sont congelés dans les paillettes de l'insémination artificielle de 0,25 ml (Andrews, 2004). L'avantage de cette paillette par rapport aux supports précédents (ampoule de verre de 1 ml) est d'inclure une meilleure exposition de l'embryon et du milieu de congélation à l'effet de refroidissement de l'azote liquide et la facilité de stocker un grand nombre des paillettes dans des unités dans l'azote liquide (Gordon, 2003). L'utilisation de la paillette donne de meilleurs résultats pour la congélation de jeunes embryons (Slade *et al.*, 1985).

Lors de la mise en paillette de l'embryon, il faut que l'embryon soit emprisonné entre deux bulles d'air pour éviter que l'embryon s'entraîne vers l'une ou l'autre des extrémités où il risquerait de se coller au bouchon et d'être perdu (Allard, 2004) (Figure n° 20). En plus, Les bulles d'air assurent l'expulsion de l'embryon hors la paillette au moment du transfert (Fields *et al.*, 2002).

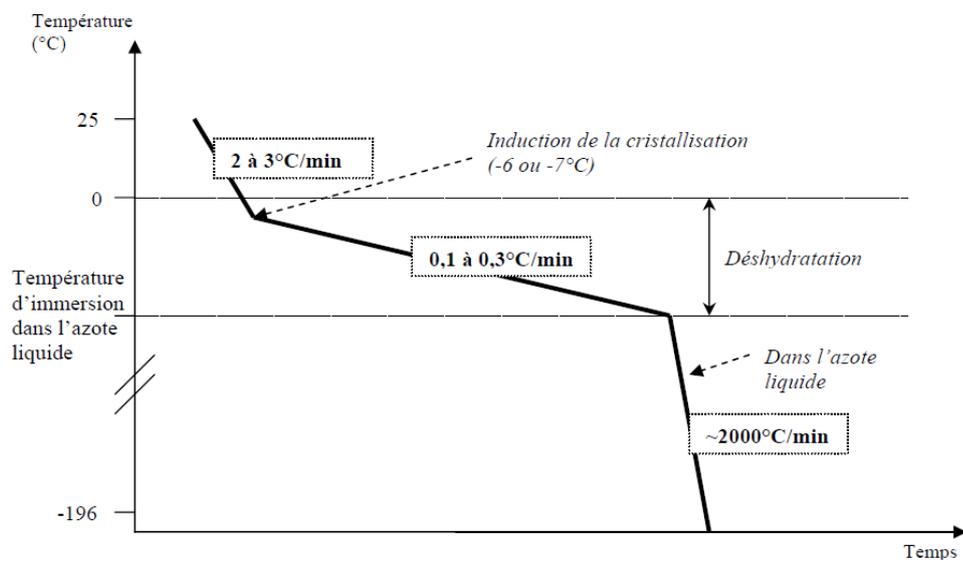
#### **I.6.4.2.4. Vitesse de refroidissement optimale après l'induction de cristallisation**

Quand la vitesse de refroidissement est rapide, la diffusion de l'eau hors de la cellule est relativement faible et, par conséquent, le phénomène de formation des cristaux intracellulaire est prédominant. Ce dernier est létal pour la cellule (Bakhachi *et al.*, 2007). Par contre, c'est la vitesse de refroidissement est trop lente, la sortie de l'eau intracellulaire est très importante et les concentrations intracellulaire sont élevées. La cellule subit alors à une déshydratation létale (effet de la solution) (Mazur, 1970).

Il est possible de déterminer, pour un type de cellule donnée une zone de vitesse de refroidissement pour laquelle le taux de survie sera maximum (Courbière *et al.*, 2009). Cette dernière s'appelle la vitesse lente optimale qui doit être, suffisamment, lente pour permettre aux cellules de se déshydrater et d'éviter la formation de cristaux intracellulaire, ainsi, elle doit être suffisamment rapide pour éviter l'effet de solution (Courbière *et al.*, 2009).

#### **I.6.4.2.5. Concentration faible en cryoprotecteur**

La congélation classique requiert un seul cryoprotecteur intracellulaire de faible concentration (Dessolle *et al.*, 2009) 1,5 mole tel que l'éthylène glycol et DMSO (Chian *et al.*, 2010). L'utilisation des cryoprotecteurs permettent de contrôler la formation des cristaux de glace à la température critique (Gardner *et al.*, 2009).



**Figure 21 :** La courbe de congélation lente pour les embryons (Allard, 2004)

#### **I.6.4.2.6. Appareil de congélation lente**

La congélation lente n'est réalisée qu'avec un congélateur programmable (Dessolle *et al.*, 2009). La plupart de ces congélateurs utilisent les vapeurs d'azote pour faire chuter progressivement la température. D'autres congélateurs fonctionnent avec un bain d'éthanol dans lequel les paillettes sont placées et le refroidissement a lieu au moyen d'un compresseur (Legrand, 2003).

#### **I.6.4.3. Étapes de la congélation lente**

##### **I.6.4.3.1. Équilibre entre l'embryon et le cryoprotecteur**

Les embryons doivent être exposés au milieu de cryoprotecteur pénétrant la cellule jusqu'à ce que l'équilibre s'achève entre la solution cryoprotectrice et les embryons (Palasz *et al.*, 1996). Cet état s'achève après 5 à 10 minutes dans un milieu contenant 1,5 mole de l'éthylène glycol (Andrews *et al.*, 2004).

##### **I.6.4.3.2. Contrôle de la vitesse de refroidissement**

###### **I.6.4.3.2.1. Vitesse de refroidissement : température ambiante-seeding**

Juste après son équilibration avec le milieu de congélation, l'embryon est placé dans la paillette (Gardner *et al.*, 2009). Les paillettes sont réfrigérées de la température ambiante (20 à 25°C) jusqu'à -6, -7°C (Menezo, 2004) avec une vitesse de 1 à 3°C/min (Allard, 2004) (Figure n° 21).

###### **I.6.4.3.2.2. Seeding**

La cristallisation est induite entre -6,5 et -7°C (Vutyavanich *et al.*, 2008) (Figure n° 21) en appliquant une barre métallique préalablement refroidie dans l'azote liquide sur les extrémités des paillettes ou grâce à un système incorporé dans le congélateur (Dessolle *et al.*, 2009).

###### **I.6.4.3.2.3. Vitesse de refroidissement : seeding-température de l'immersion dans l'azote**

Après l'induction de la cristallisation, les embryons sont refroidis lentement, à une vitesse moins de 1°C/minute (Allard, 2004). C'est à ce moment que la déshydratation des cellules embryonnaires se produit. Une fois que la déshydratation cellulaire a été suffisamment achevée (par le refroidissement aux températures entre -30 à -80 °C) les embryons peuvent être refroidis rapidement sans cristaux intracellulaire létales (Karow *et al.*, 1997). Pour cela, la paillette est plongée dans l'azote liquide (Allard, 2004).

#### **I.6.4.3.2.4. Le stockage**

Après immersion des paillettes dans l'azote liquide, elles sont par la suite stockées dans des gobelets de plastiques dans l'azote liquide (Andrews *et al.*, 2004).

#### **I.6.4.4. Avantages de la congélation lente**

##### **I.6.4.4.1. Taux de gestation et parturition acceptables**

La congélation lente a donné des résultats acceptables en terme de taux de gestation et parturition chez les bovins, les ovins et les caprins. Les taux sont inférieurs de 10% par rapport au transfert frais (Vajta, 2000).

##### **I.6.4.4.2. Faible toxicité du cryoprotecteur**

Les concentrations des cryoprotecteurs utilisées dans la plupart des protocoles de la congélation lente sont entre 1,5 et 1,8 mole (Guignot, 2006), et ces concentrations ne sont pas toxiques pour les cellules (Stacheki, 2004).

##### **I.6.4.4.3. Technique facile**

Cette technique est facile à mettre en œuvre. Les temps dans chacun des bains sont relativement longs, ce qui peut permettre à une personne peu expérimentée de pratiquer cette méthode (Allard, 2004).

##### **I.6.4.4.4. Technique du terrain**

C'est la technique classiquement utilisée sur le terrain pour la congélation des embryons bovins, caprins et ovins produits *in vivo* (Guignot, 2003).

#### **I.6.4.5. Inconvénients de la congélation lente**

##### **I.6.4.5.1. Lésions de congélation**

Deux lésions peuvent toucher la cellule vivante, les lésions de cristallisation intracellulaire et les lésions de déshydratation (effet de solution) (Marie, 1981). Une vitesse optimale de refroidissement permet d'éviter les deux lésions (Courbière *et al.*, 2009), elle déshydrate la cellule et elle évite la formation des cristaux (Marie, 1981).

##### **I.6.4.5.2. Embryons sensibles à la congélation lente**

La présence des lipides intracellulaires en quantité importante tels que les embryons porcins est souvent évoquée comme un obstacle à la congélation lente (Martinat-Botté *et al.*, 2006).

Le rôle exact que ces lipides peuvent jouer en ce qui concerne la cryo-sensibilité est inconnu. Chez le porc, il est clairement démontré que l'enlèvement des lipides cytoplasmiques par micromanipulation à l'étape 1-cell après centrifugation, augmente la tolérance des embryons au refroidissement, à la congélation ou à la vitrification (Diez *et al.*, 2001).

#### **I.6.4.5.3. Technique pour les embryons produits in vivo**

Les taux de gestation pour les embryons bovins produits *in vivo* et congelés par la méthode classique peuvent arriver à 70 %. Par contre, les résultats pour les embryons bovins produits *in vitro* est variable et ils ont été considérés faibles. Les embryons produits *in vitro* sont plus sensible à la diminution de la température que ceux produits *in vivo* (Sommerfeld *et al.*, 1999).

#### **I.6.4.5.4. Technique longue et coûteuse**

La durée de la congélation lente est longue, elle est d'environ 2 heures (Dessolle, 2009). Un autre aspect non négligeable de cette technique réside dans le coût élevé car elle requiert un appareil de congélation programmable (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

#### **I.6.4.5.5. Le cycle de refroidissement**

Un cycle de refroidissement ne peut être lancé que lorsqu'un nombre suffisant d'embryons a été collecté, ce qui fait que les premiers embryons collectés attendent avant d'être refroidis (Guignot, 2005).

#### **I.6.4.6. Utilisation sur le terrain**

Le glycerol et le DMSO sont les cryoprotecteurs, pénétrant la cellule, utilisés dans les premiers protocoles de congélation lente des embryons. Pour que ce dernier soit transférable après la décongélation, le cryoprotecteur intracellulaire doit quitter les cellules, pour cela, le contenu de la paillette est vidé dans un milieu permettant son extraction en dehors des cellules. En fin le transfert se fait après reconditionnement de l'embryon dans une autre paillette, ces manipulations diminuent la pratique de la congélation lente sur le terrain (Palasz *et al.*, 1996). L'innovation de deux méthodes de congélation dites « one-step straw » (Palasz *et al.*, 1996) et « transfert direct » permettant un transfert direct des embryons juste après leur réchauffement sans recours aux manipulations de l'étape d'enlèvement de cryoprotecteur, car cette dernière survient dans la même paillette réchauffée (voir décongélation). Grâce à la méthode de transfert direct induisant des taux de gestation et de parturition élevés, la congélation lente a mérité d'être la technique, numéro 1, de congélation et de transplantation des embryons en pratique courante (Dochi *et al.*, 1998).

## **I.6.5.Vitrification**

Le mécanisme de la congélation lente est de maintenir l'équilibre entre plusieurs facteurs (Vajta, 2000) ces derniers peuvent entraîner des lésions résultant, principalement, de la formation des cristaux de glace. Plusieurs études ont été faites pour minimiser la formation de cristaux de glace, diminuer le temps nécessaire durant la congélation lente et afin de s'affranchir des besoins d'un congélateur programmable assez onéreux (Vajta, 2000). Pour éviter les lésions consécutives à la cristallisation et toutes autres contraintes rencontrées lors de la congélation lente le recours à la technique de vitrification est largement justifié (Tucker *et al.*, 2004).

### **I.6.5.1. Définition**

La vitrification est une technique de refroidissement très rapide conduisant à un état vitreux c'est-à-dire un état solide mais non cristallisé, ce qui prévient les effets toxiques et osmotiques associés aux gradients de concentration induits par la cristallisation (Dessolle *et al.*, 2009). Les paramètres qui régissent l'obtention de l'état vitreux sont la viscosité du milieu, obtenue grâce à des solutions très concentrées de cryoprotecteurs, la vitesse élevée de refroidissement (Campos-chillon *et al.*, 2009) par immersion directe dans l'azote liquide et le volume de l'échantillon qui doit être minimisé (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

### **I.6.5.2. Conditions de la vitrification**

La vitrification permet à une solution de passer d'un état liquide à l'état solide sans formation de cristaux (Reed, 2008). Cet état vitrifié est obtenu grâce à la combinaison de cryoprotecteurs en concentration élevée associée à une vitesse de refroidissement extrêmement rapide (Chang *et al.*, 2008) (2 000 °C/min à 20 000 °C/min) (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

#### **I.6.5.2.1. Première condition : concentration élevée en cryoprotecteurs**

Des concentrations relativement faibles des cryoprotecteurs sont habituellement employées dans la cryobiologie, ces dernières ne posent, généralement, pas de problèmes de toxicité (Chian *et al.*, 2010). La vitrification, quant à elle, utilise des concentrations plus élevées en cryoprotecteurs (Kader *et al.*, 2009) 5 à 7 mol (Vajta, 2000), qui, en raison de leur toxicité, ont été un facteur limitant sur lequel devait s'axer les études à venir (Pugh *et al.*, 2000).

Différentes expériences ont été faites pour déterminer le cryoprotecteur convenable (Vajta *et al.*, 2006), la conclusion était que l'éthylène glycol était le moins toxique et le plus pénétrant la cellule (Elnahas, 2010) ce qu'il lui a valu sa place dans les protocoles usuels (Vajta *et al.*, 2006).

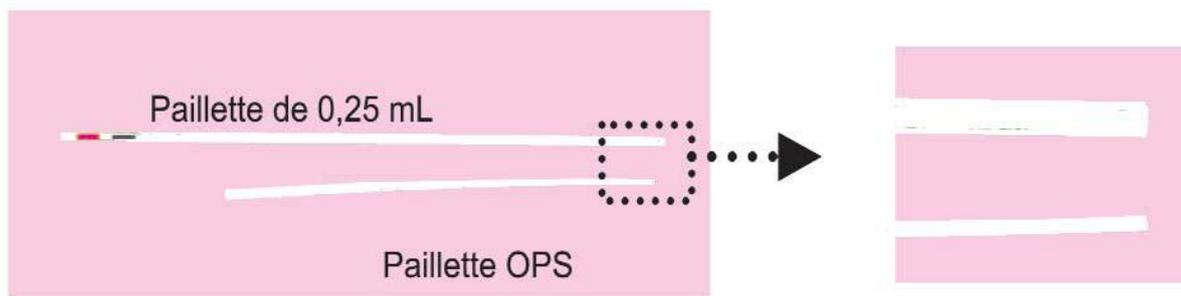
Une autre approche consistait à associer deux, voire le plus souvent trois cryoprotecteurs (Vajta, 2000) pour diminuer la toxicité d'un seul cryoprotecteur (Vajta *et al.*, 2006). Parmi eux, Au moins un pénétrant l'embryon (Vajta, 2000), les autres sont des cryoprotecteurs non pénétrants ayant une toxicité faible ou pas de toxicité (Vajta *et al.*, 2006). L'exposition des embryons à la solution cryoprotectrice en plusieurs étapes (deux à trois étapes) permet, aussi, de diminuer la toxicité des cryoprotecteurs (Vajta, 2000; Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

L'augmentation dans la vitesse de refroidissement permet de réduire la concentration des cryoprotecteurs nécessaire pour la vitrification ce qui entraîne une diminution de sa toxicité (Vajta *et al.*, 2006). Ainsi que, l'élévation de la vitesse de refroidissement de 2000 à 20,000 °c/min permet de diminuer la concentration des cryoprotecteurs jusqu'à une concentration tolérable (Varghese *et al.*, 2009).

#### **I.6.5.2.2. Deuxième condition : vitesse de refroidissement et supports de conditionnement des embryons**

L'utilisation d'un volume réduit de la solution cryoprotectrice augmente le contact profond avec l'azote liquide (Rios *et al.*, 2010) ce qui entraîne une augmentation dans la vitesse de refroidissement, donc, la probabilité d'obtenir un état vitreux est élevée (Yu *et al.*, 2009). Cette technique permet, aussi, de réduire les concentrations des cryoprotecteurs et, par conséquence, diminution de la toxicité pour l'embryon (Rios *et al.*, 2010).

Les premières expériences de vitrification sont basées sur l'utilisation d'un support traditionnel c'est-à-dire la paillette de l'insémination artificielle de 0,25 ml (Vajta *et al.*, 2006; Isachenko *et al.*, 2003). Théoriquement, sa vitesse de refroidissement est limitée, elle est approximativement de 2500°c/minute (Moussa *et al.*, 2005; Isachenko *et al.*, 2003). L'open pulled straw (OPS) est une idée simple, sûre et facile (Figure n° 22) (Vajta *et al.*, 2006). L'idée était de minimiser le volume nécessaire pour l'échantillon par réduction du diamètre de la paillette de l'insémination artificielle. Elle était réchauffée et étalée manuellement, puis le point le plus fin était coupé par une lame (Vajta *et al.*, 2006). En 1998, Vajta *et al.*, ont rapporté que la vitesse de refroidissement peut atteindre jusqu'à 20,000°c/minute par la technique de l'OPS (Rios, 2010). Plusieurs autres techniques sont aussi développées pour augmenter la vitesse de refroidissement (Tableau n° 8) et pour diminuer le volume de la solution cryoprotectrice entourant l'échantillon (Yu *et al.*, 2009), inclus cryotop (23,000°c/min) (Varghese *et al.*, 2009), cryotip (12,000°c/min) (Varghese *et al.*, 2009), electron microscope grids (Yu *et al.*, 2009) et cryoloop (Mukaida *et al.*, 2002).



**Figure 22 :** Comparaison entre la paillette traditionnelle 0,25 ml et l’oppen pulled straw (OPS) (Guignot,2005).

**Tableau 8 :** Différentes techniques de vitrification chez les embryons des mammifères (Vajta, *et al.* 2006).

Système	Référence
Direct dropping into liquid nitrogen	Landa and Tepla, 1990
Electron microscopic grids	Martino et al., 1996b
Open-pulled straw (OPS)	VAJTA et al., 1998b
Glass micropipettes (GMP)	Kong et al., 2000
Super-finely pulled OPS (SOPS)	Isachcnko V et al., 2000
Gel-loading lips	Tominaga and Hanada, 2001
Sterile stripper tip	Kuleshova and Lopata, 2002
Flexipet denuding pipette (FDP)	Liebermann et al., 2002a
Fine diameter plastic micropipetle	Cremades et al., 2004
lOO-fil pipetting tip	Hredzak et al., 2005
Closed-pulled slraw (CPS)	Chen et al., 2001
Sealed open-pulled straws	Lopez-Bejar and Lopez-Gatius, 2002
Cryotip	Kuwayama et al., 2005b
Cryoloop	Lane et al., 1999a
Nylon mesh	Matsumoto et al., 2001
Minimum drop size (MDS)	Arav, 1992
Minimum volume cooling (MVC)	Hamawaki et al., 1999
Hemi-straw system (HSS)	Vanderzwalmen et al., 2000
Cryotop	Kuwayama et al., 2005a
Vitmaster	Arav et al., 2000
Solid surface vitrification (SSV)	Dinnyes et al., 2000

### **I.6.5.3. Mécanisme d'obtention de l'état vitreux**

Durant la vitrification l'état vitrifié intracellulaire est obtenu grâce à la déshydratation de l'embryon qui concentre les solutés intracellulaires: sels et protéines et les cryoprotecteurs qui ont pénétré la cellule, l'état vitrifié extracellulaire est obtenu grâce à la concentration élevée en cryoprotecteurs (Tableau n° 9) qui encapsule l'embryon dans une gaine vitrifiante (Vanderzwalmen *et al.*, 2006). Lorsque les embryons sont immergés directement dans l'azote liquide, les molécules n'ont pas le temps de se réarranger en structure cristalline, ce qui induit la formation de l'état vitreux intra et extracellulaire (Figure n° 23) (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

### **I.6.5.4. Les avantages de la vitrification**

#### **I.6.5.4.1. L'élimination totale de la formation des cristaux**

La combinaison entre une vitesse de refroidissement ultrarapide et une concentration élevée en cryoprotecteurs durant la vitrification permettent l'élimination totale de la formation des cristaux de glace (Tucker *et al.*, 2007), ces derniers sont la source majeure des lésions cellulaires pendant la cryoconservation (Magnusson *et al.*, 2008).

#### **I.6.5.4.2. Le coût peu élevé**

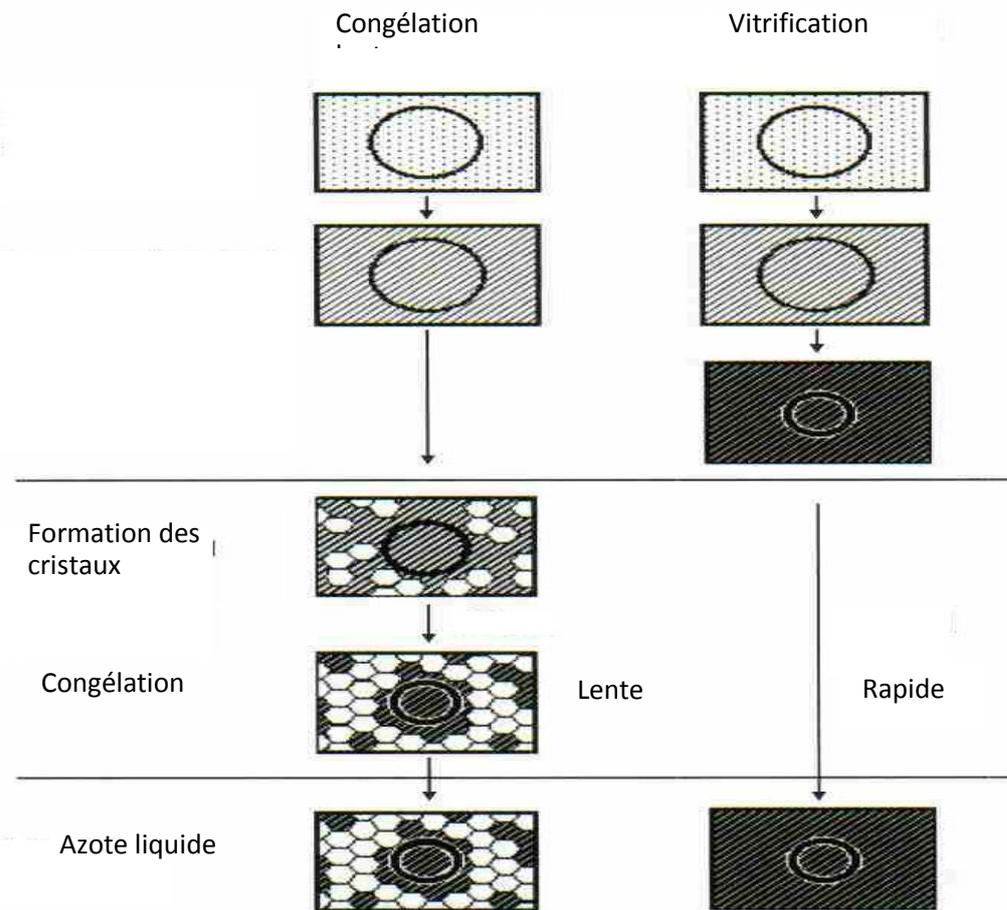
Contrairement à la congélation lente, la vitrification minimise le prix de conservation en évitant le recours aux congélateurs programmable onéreux (El-Danasouri *et al.*, 2001) par l'immersion directe des paillettes dans l'azote liquide (Dinneyés *et al.*, 1996).

#### **I.6.5.4.3. Une technique rapide**

La vitrification consiste en courte incubation des cellules dans la solution de vitrification (Moussa *et al.*, 2005), approximativement 3 minutes (Vajta, 2000).

#### **I.6.5.4.4. Une méthode fiable pour les embryons produits in vitro**

Suite à la congélation lente, le taux de survie post-réchauffement des embryons produits *in vitro* comparés à ceux produits *in vivo* est faible (Gómez *et al.*, 2008), ceci est due à leur sensibilité à la cryoconservation (Martinez *et al.*, 1998), principalement, aux cristaux de glace intracellulaire (Gómez *et al.*, 2008). En effet, la méthode de vitrification permet d'éliminer les lésions de cryoconservation (Vajta, 2000), elle a été reconnue plus adéquate pour les embryons produits *in vitro* avec un taux de gestation acceptable (Martinez *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2006).



**Figure 23 :** Schéma représente la différence entre la congélation lente et la vitrification (Mukaida *et al.*, 2002). (Hexagones représentent les cristaux de glace. Les concentrations de cryoprotecteurs sont démontrées par l'ombre foncée)

**Tableau 9 :** Comparaison entre la congélation lente et la vitrification (Courbière *et al.*, 2009).

	Vitrification	Congélation lente
Vitesse de refroidissement	Ultrapide par trempe direct dans l'azote liquide	Lente Vitesse contrôlée Congélateur programmable
Concentration en CPS	Elevée (6-9 mole)	Basse (0,5-1,5 mole)
Qualité de CPS	Mélange	Unique
Cristaux de glace	Absence	Extracellulaire

CPS : cryoprotecteurs

#### **I.6.5.4.5. Une diminution des lésions causées par le refroidissement**

La vitesse élevée de vitrification diminue significativement les lésions de refroidissement et permet aussi de passer rapidement la zone dangereuse (Ambrosini *et al.*, 2006) de +15 à -5 (Vajta, 2000).

#### **I.6.5.5. Les inconvénients de la vitrification**

##### **I.6.5.5.1. Les lésions cellulaires**

Bien que, la vitrification élimine totalement la formation des cristaux de glace, elle augmente la probabilité de survenue d'autres lésions liées à la congélation (Vajta *et al.*, 2006). Plusieurs approches, citées plus haut, sont appliquées en succès pour minimiser ces lésions (Ambrosini *et al.*, 2006).

##### **I.6.5.5.2. La solution cryoprotectrice**

La technique de vitrification est basée sur la combinaison de plusieurs cryoprotecteurs et protéines, ces milieux compliqués rendent la technique difficile à réaliser (Baril *et al.*, 2001). En plus, les paillettes doivent être congelées individuellement ce qui rend la congélation d'un nombre élevé d'embryons plus difficile (Vajta, 2000).

##### **I.6.5.5.3. La concentration de cryoprotecteur**

Le problème majeur de la vitrification était la toxicité de la haute concentration de cryoprotecteur utilisé (Walker *et al.*, 2006), actuellement, différentes techniques sont appliquées, parmi-elles une exposition des cellules aux cryoprotecteurs en plusieurs étapes de courtes durées (Vanderzwalmen *et al.*, 2006).

##### **I.6.5.5.4. L'augmentation du risque de contamination**

Certains supports de conditionnement tel que l'open pulled straw entraîne un contact direct entre la solution cryoprotectrice entourant l'échantillon et l'azote liquide, dans ce dernier, les agents pathogènes peuvent créer une source de contamination des embryons (Yu *et al.*, 2009). L'utilisation de certains supports fermés tels que closed pulled straw, cryoloop, permet d'éviter ce type de contamination (Vajta *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2009; Tucker *et al.*, 2007).

##### **I.6.5.6. Utilisation sur le terrain**

Cette technique est classiquement utilisée dans des études expérimentales de transfert (Guignot, 2005). Il était prouvé que la vitrification des embryons donnait des taux égaux ou supérieurs à la congélation lente (Vajta, 2000) [44,5 % n = 393 versus 45,1 % n = 335 (Van

Wagtendonk *et al.*, 1997)] . Cependant, comme ses résultats est satisfaisants sur le terrain (Vajta, 2000), la congélation lente est utilisé, depuis des années, dans les programmes de cryoconservation des embryons, et comme la vitrification n'offre pas de gain supplémentaire en termes de taux de réussite, elle reste peu utilisée (Guignot, 2005). En outre, l'extrême diversité dans les protocoles de vitrification et l'absence d'un protocole standard pour cette technique découragent les praticiens (Vajta, 2000). Actuellement et dans le futur, le rôle de vitrification chez les animaux domestiques n'est pas de remplacer la congélation lente mais d'offrir des secteurs spéciaux où la congélation lente ne donne pas des résultats satisfaisants (Vajta, 2000).

## **I.6.6. La décongélation des embryons**

### **I.6.6.1. Le réchauffement des embryons**

La vitesse de réchauffement des embryons est très importante pour la réussite de la cryoconservation des cellules. Les effets de cette vitesse dépendent, principalement, de la vitesse de congélation (Woods *et al.*, 2004). En effet, les lésions qui surviennent pendant la congélation peuvent aussi survenir durant le réchauffement, l'augmentation de la vitesse de réchauffement permet d'éviter la recristallisation intracellulaire pour les embryons congelés lentement, ou d'inhiber la dévitrification c'est-à-dire la cristallisation de l'eau vitreuse des embryons vitrifiés (Barry *et al.*, 2004).

#### **I.6.6.1.1. Le réchauffement des embryons congelés par la congélation lente**

Puisqu'il n'y a pas de temps suffisant pour que le cryoprotecteur sorte de l'embryon, les lésions cellulaires peuvent survenir pendant le réchauffement rapide (300 à 400°C), ainsi les cellules se gonflent et se lysent car le milieu extracellulaire devient brusquement dilué par la fonte des cristaux de glace extracellulaire (Barry *et al.*, 2004). La vitesse de réchauffement doit être de 5 à 15 °C/minute (Armand *et al.*, 1997).

Si les embryons sont congelés par la méthode classique en utilisant le glycérol ou l'éthylène glycol, le réchauffement est obtenu en mettant les paillettes contenant les embryons à la température ambiante pendant plusieurs minutes ou en plongeant directement dans un bain d'eau à 37 °C ou n'importe quelle autre forme de chauffage (Gardner *et al.*, 2001). Il est évident que le réchauffement complet dans l'air entraîne une diminution de la viabilité des embryons et l'immersion directe dans l'eau entraîne une fracture de la zone pellucide. Le protocole typique de réchauffement des embryons est de 5 à 10 secondes dans l'air suivi par leur immersion dans l'eau à 37°C jusqu'à la disparition complète des cristaux de glace (Fields, 2002) (Tableau n° 10).

**Tableau 10:** Les différents protocoles de réchauffement des embryons congelés lentement.

<b>Auteur</b>	<b>Cryoprotecteurs utilisés</b>	<b>Protocole de réchauffement</b>			
		<b>Air</b>	<b>Eau</b>		
			<b>°C</b>	<b>Durée</b>	
Day et al. (1995)	Glycérol	-	37	Fonte des cristaux	
Kwang et al. (2008)	EG, FBS, Sa	6-10 S	37	15 S	
Palasz et al. (2000)	G, BSA	-	35	Fonte des cristaux	

ET :éthylène glycol ; FBS : fetal bovine serum ; G : glycérol ; Ga : galactose ; NBCS : new born calf serum ; Sa : saccharose, S : secondes

**Tableau 11 :** Différents protocoles de réchauffement des embryons vitrifiés.

<b>Auteur</b>	<b>Protocole de vitrification</b>	<b>Cryoprotecteurs utilisés</b>	<b>Protocole de</b>		
			<b>Air</b>	<b>Eau</b>	
				<b>°C</b>	<b>Durée</b>
Campos-Chillón et al. (2009)	Two steps	Ga, EG	10 S	37	10 S
	Three steps	G, EG			
Martinez et al. (2002)	Three steps	G, EG	-	37	-
Stachecki et al. (2008)	Three steps	G, EG, HSA	5	37	10
Baril et al. (2001)	Three steps	G, EG, NBCS	5	20	10
Donnay et al. (1998)	Three steps	G, EG, FCS	-	37	10

ET :éthylène glycol ; FCS : fetal calf serum ; G : glycérol ; Ga : galactose ; HSA : human serum albumin ; NBCS : new born calf serum,

S : seconde

### **I.6.6.1.2. Le réchauffement des embryons vitrifiés**

Les embryons vitrifiés doivent être réchauffés rapidement pour prévenir la cristallisation (dévitrification) qui est nocive pour la cellule (Day *et al.*, 1995). Le réchauffement des embryons vitrifiés est réalisé de la même manière que pour les embryons ayant subi une congélation lente (Gardner *et al.*, 2009). Une fois, les paillettes ont été retirées de l'azote liquide, elles sont placées dans un bain d'eau, mais certains protocoles requièrent une période courte de l'air avant l'immersion des paillettes dans l'eau. La température du bain d'eau est de 22 à 37°C, l'immersion dure de 7 à 30 secondes selon le protocole de vitrification, et la durée d'exposition de la paillette à l'air libre, si cette étape est incluse dans le protocole de réchauffement, est 10 secondes (Andrews *et al.*, 2004) (Tableau n° 11).

### **I.6.6.2. L'enlèvement de cryoprotecteurs pendant la décongélation**

Afin de diminuer le risque de toxicité en vers les cellules durant la décongélation, le cryoprotecteur intracellulaire doit être rediffusé rapidement hors de la cellule, cela est possible, en utilisant des solutions hypotoniques (Zhmakin, 2009). Ces dernières peuvent conduire à des lésions osmotiques dues à la différence de vitesse de diffusion de l'eau à l'intérieur de la cellule et du cryoprotecteur hors de la cellule (Liebermann, 2003). Pour palier au risque de ces lésions, le saccharose (sucrose) fut proposé comme une solution de dilution qui sert à prévenir le gonflement excessif de l'embryon pendant l'enlèvement de cryoprotecteur (Vajta *et al.*, 2006).

En 1990, les cryoprotecteurs les plus utilisés étaient le glycérol, le DMSO, et le propylène glycol (Massip, 2001). Quand le glycérol (poids moléculaire élevé : 92,1 M) était utilisé comme cryoprotecteur, il devait être enlevé sans causer le dommage osmotique (Tableau n° 12). La méthode de choix étant l'utilisation de saccharose en une, deux, ou trois étapes à des concentrations décroissantes ou de recourir à la méthode dite « one-step straw ». Cette dernière permet d'éviter ces étapes de dilution, les solutions de refroidissement (glycérol) et de dilution (saccharose) sont incluses dans la même paillette séparée par un bulle d'air. Après le réchauffement, la paillette est secouée causant un mélange des deux solutions et le glycérol quitte ainsi l'embryon sous l'effet de la concentration du saccharose. L'embryon est, éventuellement, réhydraté par les fluides de l'utérus de la receveuse (Palasz *et al.*, 1996). Une autre alternative, plus simple, réalisée en incorporant le saccharose dans le milieu de congélation (glycérol), cette méthode glycérol-saccharose n'était pas largement utilisée car le taux de gestation était faible par rapport à la décongélation classique (Gordon, 2003).

L'utilisation, par la première fois en 1977 et 1978, de l'éthylène glycol en tant que cryoprotecteur (Massip, 2001), ce n'est qu'en 1999 que Sommer felied et Niemam prouvent la faible

**Tableau 12** : Utilisation de saccharose pour diluer les embryons vitrifiés.

<b>Auteur</b>	<b>Technique de congélation</b>	<b>Cryoprotecteurs utilisés</b>	<b>Molécules pour enlèvement des cryoprotecteurs</b>	<b>Etapes de dilution</b>
Stachecki et al. (2008)	Vitrification des blastocyste bovins	EG, G	Sac	5 étapes (5min/étape)
Huang et al. (2007)	Vitrification des blastocystes bovins	EG, PrOH, Sac.	Sac	3 étapes (3min/étape)
Kartberg et al. (2008)	Vitrification des embryons humains	EG, DMSO, PrOH, Sac.	Sac	4 étapes

EG :éthylène glycol ; G : glycérol ; DMSO :di-méthylesulfoxyde ;PrOH : propanediol ;Sac : saccharose.

**Tableau 13** : Transfert direct des embryons et l'utilisation de saccharose pour diluer des embryons congelé lentement.

<b>Auteur</b>	<b>Technique de congélation</b>	<b>Cryoprotecteurs utilisés</b>	<b>Molécules pour enlèvement des cryoprotecteurs</b>	<b>Etapes de dilution</b>
Dochi et al. (1998)	Congélation lente des blastocystes bovins	EG, G, Sac.	-	(transfert direct)
Dochi et al. (1995)	Congélation lente des blastocystes bovins	EG.	-	(transfert direct)
Palasz et al. (2000)	Congélation lente des blastocystes bovins	Glycérol	Sac	1 étape (6 M de Sac pour 5 min).

EG :éthylène glycol ; G : glycérol ; DMSO :di-méthylesulfoxyde ;PrOH : propanediol ;Sac : saccharose.

toxicité de l'éthylène glycol en testant les concentrations allant de 1,8 jusqu'à 8,9M. Actuellement, c'est le cryoprotecteur le plus utilisé dans la conservation des embryons bovins. Grâce à son poids moléculaire faible (62,1M), il pénètre et quitte rapidement l'embryon. Avec ces dernières caractéristiques, l'éthylène glycol est employé comme un cryoprotecteur du transfert direct des embryons bovins dans les receveuses juste après le réchauffement, la réhydratation se fait dans les fluides de l'utérus (Tableaux n° 12,13) (Palasz *et al.*, 1996).

### **I.7. Problématique et objectifs**

L'évolution importante dans les connaissances sur la physiologie de l'activité ovarienne chez la vache montre que la grande majorité des follicules subissent une dégénérescence durant leur développement, c'est le phénomène de l'atrésie. Ceci a pour conséquence une perte très importante du matériel génétique qui pourrait être exploité surtout chez les vaches d'élite de haute valeur génétique.

Durant le cycle œstral chez la vache, 2 à 3 vagues folliculaires, contenant chacune plusieurs follicules en croissance, peuvent être observées. Cependant, 1 ou 2 follicules seulement arrivent à ovuler (Mihm et Bleach., 2003 ; Rathbone *et al.*, 2001). Au moyen d'hormones gonadotropes, principalement la FSH/LH, qui régissent naturellement la croissance folliculaire et l'ovulation, les biologistes ont réussi, grâce à l'administration de doses supplémentaires de ces hormones, à atteindre une ovulation multiple communément appelée superovulation. Une fois inséminées, les vaches superovulées produisent plusieurs embryons qui sont collectés pour être transférés chez des vaches receveuses préalablement préparées qui assurent leur développement jusqu'à terme : c'est le transfert embryonnaire (Hasler *et al.*, 1983 ; Beckers, 1989).

Comme le transfert embryonnaire offre la possibilité d'obtenir plus d'un veau par vache et par an, deux étapes critiques peuvent diminuer le taux d'exploitation du patrimoine génétique des donneuses : i) l'échec de synchronisation entre les donneuses et les receveuses, ii) la variation de la réponse au traitement de superovulation ayant pour conséquence la préparation d'un nombre de receveuses inférieur, dans la plupart des cas, à la quantité d'embryons collectés. Ainsi, on enregistre une perte d'embryons en l'absence d'un procédé de conservation adéquat.

L'introduction de la technique de congélation des embryons bovins en 1972 par WILMUT *et al.* a permis la conservation ainsi que l'exploitation de tous les embryons collectés de qualité. De ce fait, elle donne la possibilité de préparer un nombre de receveuses égal au nombre d'embryons transférables au moment adéquat. En plus de son rôle crucial dans l'augmentation de la rentabilité du transfert embryonnaire, la cryoconservation facilite la commercialisation d'embryons à travers les différents continents (Mapletoft et Hasler, 2005). D'ailleurs, le gouvernement algérien devrait

---

recourir à ce moyen afin de réduire le coût des opérations d'importation d'animaux de rente sur pieds et de rentabiliser leurs productions une fois sur place. En effet, dans l'optique d'assurer l'autosatisfaction en matière de production laitière, une politique a été adoptée visant l'importation des génisses pleines qui ont des difficultés à s'adapter aux conditions locales avec pour conséquences des pertes économiques importantes. Par ailleurs, la cryoconservation permet la sauvegarde du patrimoine génétique locale ou des vaches d'élite importées en créant des banques d'embryons (Mapletoft et Hasler, 2005).

En raison de tous ces avantages, nous avons appliqué, pour la première fois à notre connaissance, la technique de congélation classique ou lente chez les bovins. A plus forte raison, que de plus en plus d'opérations de transfert d'embryons chez la vache voient le jour dans notre pays.

## II. Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé sur une période s'étalant du mois de septembre 2010 au mois Avril 2011 au sein de l'ITELv (Institut techniques des élevages) situé à Baba-Ali.

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Animaux

Dix-neuf (19) femelles dont 16 donneuses et 03 receveuses ont été recrutées dans notre étude. Le groupe des donneuses était composé de 13 femelles de la race locale en dehors de la période de lactation et 03 génisses de races améliorées. Quant aux receveuses, elles étaient toutes des génisses de race améliorée. La description détaillée des animaux de l'expérimentation est représentée dans les tableaux suivants : 14, 15 et 16.

**Tableau 14** : Donneuses de la race locale « Cheurfa »

Donneuse	Age (ans)	Parité	Cornes	Ovaires		
				OD	OG	
1	7	Primipare	Volume : Petites Rapport : Symétriques Consistance : normale	L	CJ	
2	5	Nullipare		CJ	L	
3	7	Primipare		CJ	L	
4	7	Primipare		L	L	
5	7	Nullipare		CJ	CJ	
6	5	Nullipare		CJ	L	
7	7	Primipare		CJ	L	
8	7	Primipare		CJ	L	
9	6	Nullipare		Légère asymétrie des cornes	L	CJ
10	5	Nullipare		Volume : Petites Rapport : Symétriques Consistance : normale	CJ	L
11	5	Nullipare			CJ	F
12	5	Nullipare			CJ	L
13	5	Nullipare			L	CJ

O : Ovaire; D : Droit; G : Gauche; L : Lisse ; CJ : Corps jaune, F : Follicule.

**Tableau 15** : Donneuses de la race améliorée

Génisse	Race	Date de naissance	Poids	BCS	Les cornes	Les ovaires	
						OD	OG
1	Montbéliard (PR)	23/09/08	496	3,5	Volume : Petites Rapport : Symétriques Consistance : normale	CJ	CJ
2	Holstein (PN)	09/09/08	402	3		Petit et lisse	CJ
3	Holstein (PN)	25/10/08	406	3		Petit et lisse	CJ

PN: Pie noire ; PR : Pie rouge ; BCS : Body Condition Score; O : Ovaire; D : Droit; G : Gauche; L : Lisse ; CJ : Corps jaune.

**Tableau 16** : Les receveuses pour les embryons congelés

N° de la génisse	Race	Date de naissance	Poids	BCS	Les ovaires		Les cornes
					OD	OG	
1	Holstein (PN)	08/11/08	408	3	L	CJ	Volume : Petites Rapport : Symétriques Consistance : normale
2		2008	424	3	F	CJ	
3		27/08/08	395	3	F	CJ	

BCS : Body Condition Score; O : Ovaire; D : Droit; G : Gauche; L : Lisse ; CJ : Corps jaune, F : Follicule.

### II.1.2. Produits de préparation et de traitement des animaux

- Antibiotiques : oxytétracycline et pénicilline
- Antiparasitaires : ivermectine
- Vitamines : vitamine AD<sub>3</sub>E
- Anti-inflammatoires

### II.1.3. Matériel de synchronisation et superovulation

#### II.1.3.1. Appicateurs

- Appicateur de l'implant
- Appicateur de la spirale vaginale

#### II.1.3.2. Hormones

- Prostaglandine (PGF<sub>2</sub>α)
- Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG)
- Prostagène : sous forme des implants et des spirales

- FSHp : extrait hypophysaire (40%)

#### **II.1.4. Matériels de l'insémination artificielle**

- Thermos et un thermomètre pour la décongélation des paillettes
- Pistolet de l'insémination
- Semences de deux races locale et améliorée (Holstein + Montbéliard)

#### **II.1.5. Matériels de collecte**

- Bain marie pour maintenir la température à 37°C
- Flacons de 500 ml pour la collecte et le décantage
- Les sondes de collecte des embryons à deux voies, une voie pour injecter et aspirer le liquide de collecte et l'autre voie pour gonfler le ballonnet.
- Dilatateur du col
- Chemises sanitaires
- Milieu tampon de collecte, "Dulbecco's phosphate buffer saline" son PH=7 ; 280 milimole < osmolarité > 290 milimole.

#### **II.1.6. Outils d'observation**

- Deux loupes binoculaires
- Boîtes de pétri quadrillées

#### **II.1.7. Matériels de manipulation et de conditionnement**

- Siphon : constitué d'une sonde de METRIJET<sup>ND</sup> reliée à un flexible muni d'une molette ajustant le débit (type perfuseur).
- Cupules : une pour le milieu de manipulation et une pour le milieu de congélation
- Milieu de manipulation (holding medium) prêt à l'emploi (Minitube, REF : 19982/1250), utilisé à la fois pour la conservation temporaire et le rinçage des embryons. C'est un milieu tampon : PBS contenant 4% de BSA (Bovine Serum Albumin), D-glucose, Na-pyruvate, antibiotiques (Kanamycine et gentamycine), vitamines, acides aminés et des facteurs de croissance.
- Paillettes traditionnelle de 0,25 ml de couleur jaune servant au conditionnement des embryons.
- Jones de bouchage des paillettes

### II.1.8. Matériel de congélation

- Milieu de congélation prêt à l'emploi (Minitube, REF : 19982/1302) : c'est un milieu de PBS contenant 1,5 de l'éthylène glycol et 0,1 mole de saccharose en plus les éléments du milieu de manipulation.
- Une cuve d'azote de 11 litres et une autre de 5 litres (Biosta) remplies d'azote liquide à température de -196°C
- Un congélateur pour les embryons constitué de :
  - Une cuve pour l'azote liquide
  - Un appareil électrique doté d'une barre de refroidissement, un portoir pour les paillettes et une tige pour déclencher la cristallisation.

### II.1.9. Matériel du transfert et de décongélation des embryons

- Bain d'eau à 37°C
- Loupe binoculaire : pour évaluer la qualité des embryons décongelés
- Pistolet de transfert

### II.1.10. Autres matériels

- Acépromazine : Tranquillisant pour la manipulation des donneuses de la race locale
- Lidocaïne 2% : Anesthésie épidurale pour l'opération de collecte
- Matériels de la chirurgie : pour laparotomiser des donneuses ayant des cols non cathétersables au moment de collecte des embryons.
- Tubes sous vide héparinés
- Échographe.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Alimentation

Dans le cadre du programme de la station, tous les animaux recevaient une ration de base constituée de fourrage sec à base de foin d'orge et 02 kg de VL-B17 comme de concentré (Maïs, Tourteau de soja, issus de meunerie, CMV, phosphates, sel et calcaire). Nous avons complété la quantité de concentré de la ration de base avec 01 kg de VL-B17 pour les animaux ayant un BCS entre 2 et 3.

## II.2.2. Préparation et traitement des animaux

Avant d'entamer notre étude, un déparasitage, une antibiothérapie et une vitaminothérapie ont été réalisés à deux reprises décalées de 15 jours (tableau n°17).

**Tableau 17** : Les doses des produits de la préparation des animaux

Produits	Principe actif	Posologie (par 50 Kg de PV)	Race locale	Race améliorée
Antibiotique	Oxtétracycline	5cc	40cc/tête	50cc/tête
Antiparasitaire	Ivermectine	1cc	8cc/tête	12cc/tête
Vitamine	AD <sub>3</sub> E	2cc	16 cc/tête	32 cc/tête

Rappel 15 jours plutard, cc : centimètre cube, PV poids vif

## II.2.3. Synchronisation et superovulation des animaux

### II.2.3.1. Synchronisation et superovulation des donneuses de la race locale

L'examen par palpation rectale des vaches a montré que certaines donneuses étaient en anœstrus. Afin que toutes les donneuses reviennent en chaleurs, un traitement de synchronisation à base d'implant a été appliqué. Nous avons réparti les donneuses de la race locale en 02 groupes de 04 femelles en plus d'un troisième de 05 femelles. Pour des raisons pratiques, particulièrement au moment de la collecte, la synchronisation est décalée chronologiquement de 4 jours d'un groupe à l'autre. L'utilisation de l'implant a un double intérêt : un traitement des états d'anœstrus, d'une part, et une synchronisation des chaleurs des donneuses, d'autre part. Le traitement de synchronisation a duré 10 jours entre la mise en place de l'implant et son retrait grâce à une petite incision.

Parallèlement au retrait de l'implant, l'injection de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  est opérée seulement pour les donneuses cyclées (avec présence d'un corps jaune). Alors que la PMSG a été injectée pour toutes les donneuses (tableau n° 18).

**Tableau 18:** Les doses d'hormones de synchronisation

Hormones	PGF2 « Cloprostenol »	PMSG	Prostagène
<b>Dose par animal</b>	50µg (2 ml)	500 UI (2,5 ml)	3mg de Norgestomet imprégné l'implant Injection IM contenant à la fois 3mg de norgestomet et de 5mg de valérate d'œstradiol.

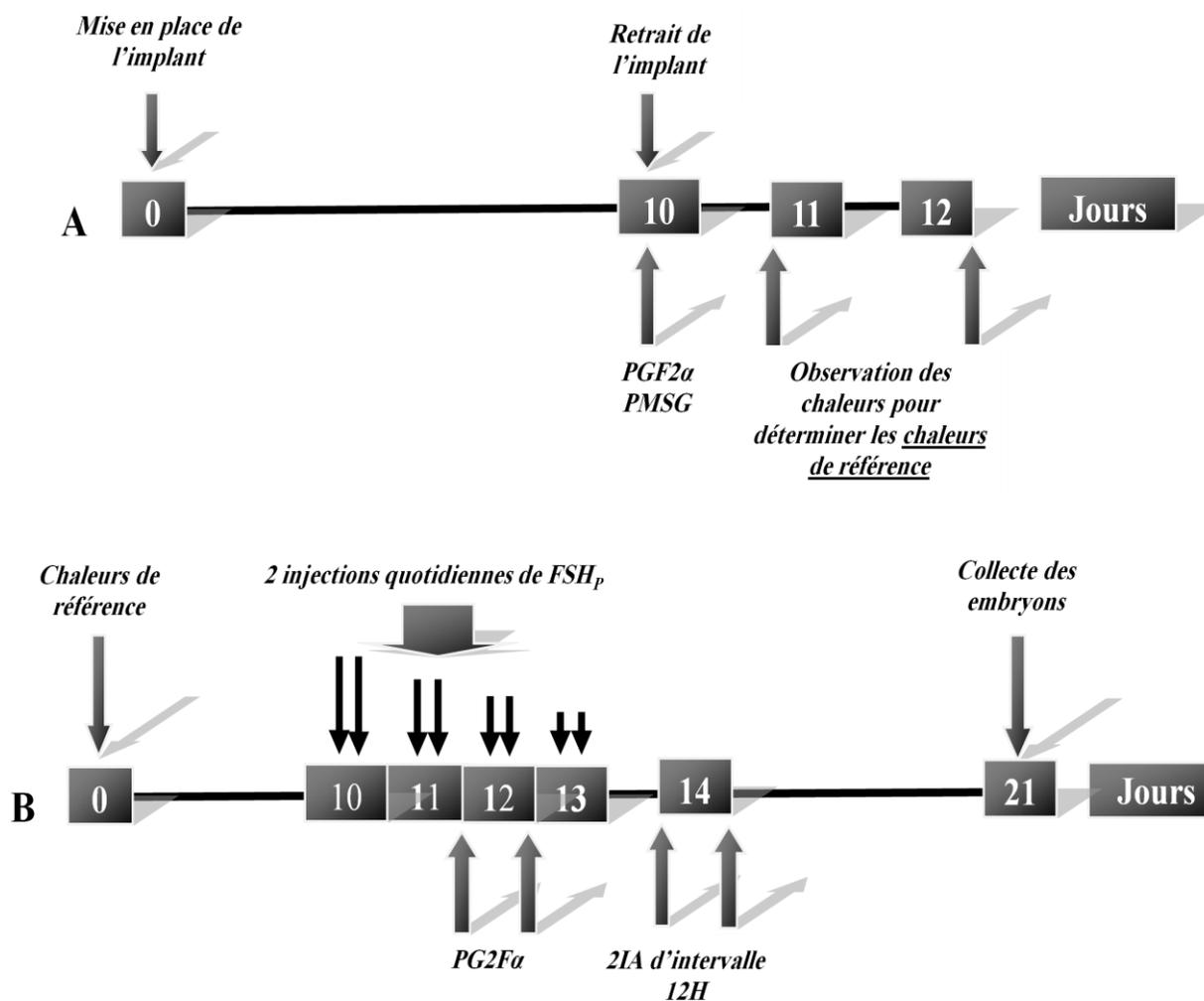
UI : Unité internationale

L'observation des chaleurs de synchronisation a été faite de manière continue pendant les 48 h suivant le retrait de l'implant. Celles-ci ont été prises comme « chaleurs de référence » pour le protocole du traitement de superovulation des donneuses de la race locale. Du 10<sup>e</sup> au 13<sup>e</sup> jour suivant les chaleurs de référence, les donneuses ont été superovulées par injection de 08 doses décroissantes de FSHp à raison de 02 injections journalières (Figure n° 24). Durant le traitement de superovulation chaque donneuse a reçu des doses totales de 32 à 40 mg Armor de FSHp (tableau n° 19). Deux injections de PGF2α a ont été réalisée 48 h et 60 h après le début du traitement c'est-à-dire, au même moment que la cinquième et la sixième injection de FSHp.

**Tableau 19 :** Quantité des doses de la FSHp pour la race locale

Jours de cycle	10		11		12		13									
	Matin		Soir		Matin		Soir		Matin		Soir					
	mg	ml	mg	ml	Mg	ml	mg	ml	mg	ml	mg	ml				
40mg	6	1,2	6	1,2	5	1,0	5	1,0	3	0,6	3	0,6	2	0,4	2	0,4
32mg	7	1,4	7	1,4	6	1,2	6	1,2	4	0,8	4	0,8	3	0,6	3	0,6

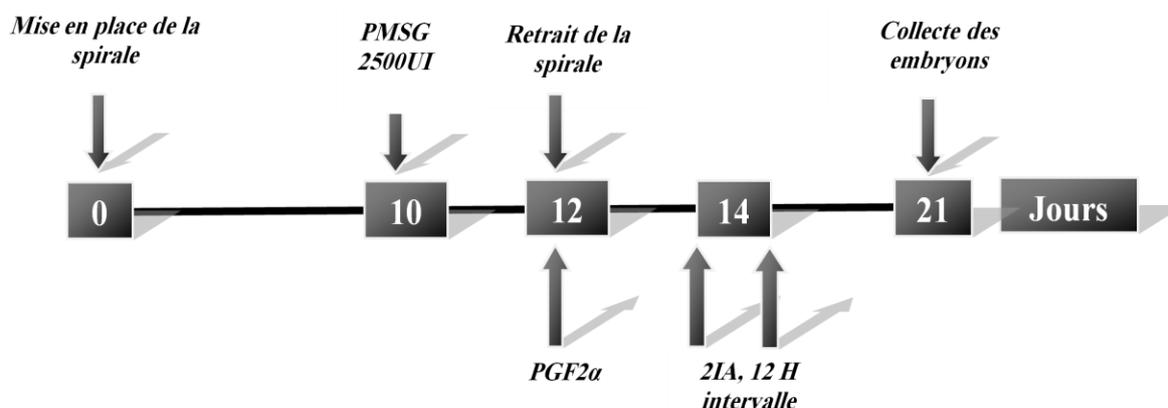
1ml contient 5mg de FSH.



**Figure 24** : Protocole de traitement de superovulation des donneuses de la race locale par FSH-p (B) sur un cycle issu d'une synchronisation des chaleurs par l'implant (A).

### II.2.3.2. Superovulation de la race améliorée

En raison de la pénurie des implants sur le marché algérien au début de notre expérimentation sur les races améliorées en décembre 2010, le recours à l'utilisation des spirales était indispensable. Par ailleurs, ne disposant plus de FSHp (ayant été entièrement utilisée chez la race locale), nous étions dans l'obligation de recourir à la PMSG comme hormone de superovulation. Pour ce faire, une injection de 2500 UI de PMSG au 10<sup>e</sup> jour du cycle maîtrisé au moyen de la spirale a été effectuée (Figure n°25).



**Figure 25** : Protocole de superovulation pour les bovins de race améliorée

### II.2.4. Insémination artificielle

Les donneuses ont été inséminées artificiellement 2 fois, 12 h et 24 h après le début des chaleurs observées pour la race locale et systématiquement 48 h et 60 h après le retrait de la spirale pour la race améliorée. Elles ont été inséminées à chaque opération par deux paillettes contenant la semence correspondant à la race des donneuses (Figure n°26).

Les semences utilisées pour inséminer les donneuses provenaient du centre national de l'insémination artificielle et l'amélioration génétique (CNIAAG). Ce dernier est un centre agréé par l'état et ne produit que des semences de bonne à excellente qualité. Par ailleurs, l'évaluation microscopique de la mobilité notamment la mobilité massale des échantillons de semences a permis de les qualifier de bonne qualité.



**Figure 26** : Insémination artificielle chez les donneuses.

### II.2.5. Collecte des embryons

Juste avant la collecte, nous avons évalué la réponse au traitement de superovulation en comptant, via la palpation rectale et l'échographie, le nombre de corps jaunes sur chaque ovaire.

Pour obtenir de jeunes blastocystes, les embryons ont été récoltés à sept (07) jours post-insémination. La voie chirurgicale a été préconisée pour deux donneuses de la race locale ayant présenté des cols difficilement cathétérisables au moment de la collecte. En revanche, les embryons d'autres donneuses (de race locale et améliorée) sélectionnées pour l'expérimentation ont été recueillis par la voie cervicale de la manière suivante :

Afin de limiter les mouvements de l'animal lors de la manipulation des cornes et d'assurer la sécurité du personnel chargé de la collecte, une anesthésie épidurale haute ou basse est réalisée par l'injection de 3 à 5 ml de lidocaïne à 2% (Figure n° 27)



**Figure 27 :** Anesthésie épidurale.

La désinfection et le nettoyage de la région péri-vulvaire précède toute introduction d'instruments utilisés dans l'expérimentation tels que la sonde et le dilatateur qui sont toujours recouverts par une chemise sanitaire. Comme le col est difficilement cathérisable en phase lutéale, nous procédons à son élargissement grâce à un dilatateur.

La sonde est introduite dans l'utérus comme le pistolet de l'insémination artificielle jusqu'à l'endocol pour être orientée, par la suite, vers l'intérieur de la corne. Une fois dans cette dernière, le mandrin est retiré et le ballonnet est gonflé, à deux doigts dans la corne par rapport à la bifurcation, par l'injection de 10 et 12 cm<sup>3</sup> d'air pour les races locale et améliorée respectivement. Afin de déplacer la sonde dans l'autre corne, il suffit de réintroduire le mandrin, de dégonfler le ballonnet et de retirer le tout jusqu'à l'endocol. A partir de ce point, la mise en place de la sonde dans la deuxième corne est effectuée de la même manière que dans la première.

Le volume de liquide de D-PBS injecté est proportionnel au volume de la corne : 250 ml et 300 à 350 ml par corne pour les races locale et améliorée respectivement (Tableau n°20). Le volume de rinçage est injecté en doses croissantes allant de 20 à 50 ml au moyen d'une seringue de 50 ml.

La collecte des embryons se fait par injection puis récupération des doses destinées à chaque corne. Les doses aspirées de chaque corne sont, ensuite, transvasées dans un même flacon.

Quant aux deux génisses laparotomisées, on introduit la sonde à travers une petite incision à la base de la corne, on gonfle le ballonnet puis on injecte et aspire du liquide de collecte de la même façon que la collecte par voie cervicale (Figure n° 28). Il est à noter que pour les 2 donneuses laparotomisées, le nombre de corps jaunes de chaque ovaire a été compté manuellement de *visu*.



**Tableau 20 : Les doses de D-PBS injectées par corne**

	Race locale	Race améliorée
Doses	20 ml x 2	20 ml x 2
injecté par	30 ml x 2	30 ml x 2
corne	40 ml x 2	40 ml x 2
	50 ml x 2	50 ml x 2
	50 ml = 20 ml d'air + 30 ml liquide	20ml + 30 ml d'air
Somme	250 ml	300 ml

Les flacons contenant le liquide de collecte de chaque donneuse sont aussitôt transférés au laboratoire pour être sauvegardés dans un bain-marie à 37°C afin d'éviter un choc thermique pour les embryons en attendant la suite des opérations.

### II.2.6. Décantage

Chaque flacon est sauvegardé pendant 10 min au minimum dans le bain-marie sur une surface stable pour la décantation des embryons.

### **II.2.7. Siphonage**

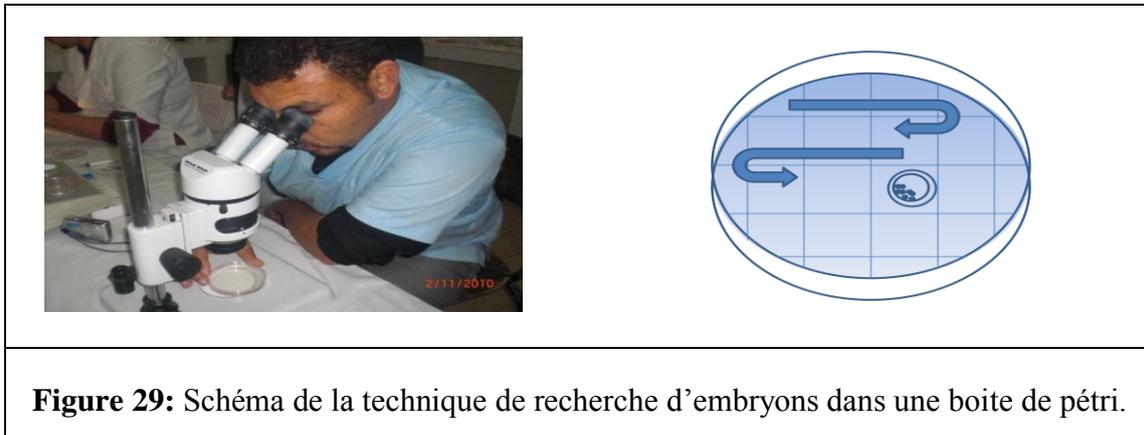
Comme les flacons contiennent beaucoup de liquide de collecte, il fallait se débarrasser du surplus qui couvrait les embryons décantés. Pour cela, on procéda à un siphonage réalisé grâce au montage d'une seringue à une des extrémités libres du flexible tout en plaçant l'autre extrémité dans le flacon juste sous la surface du liquide collecté. Pour ne pas aspirer les embryons, le débit du siphonage devait se faire lentement, en goutte à goutte. En effet, juste après l'aspiration d'une petite quantité du liquide au moyen de la seringue, nous avons placé l'extrémité du flexible dans un flacon vide en ajustant le débit via la mollette du flexible. Cette opération s'arrête quand le niveau du liquide de collecte est à 2 cm du fond du flacon, ce qui correspond dans notre cas à un volume de 100 à 150 ml.

### **II.2.8. Observation et manipulations des embryons**

Avant de commencer l'observation, il faut s'assurer que les deux cupules (une contenant le milieu de manipulation et l'autre contenant le milieu de congélation) soient sur une plaque chauffante à 37 °C et que le grossissement des deux loupes soit ajusté à la vision des 2 personnes chargées de l'opération d'observation des embryons.

En fonction du volume et de l'aspect du liquide collecté restant dans le flacon, une certaine quantité (50 ml au maximum/boîte) est versée dans deux ou trois boîtes de pétri quadrillées. Le versement dans la 3<sup>e</sup> boîte quadrillée n'étant réalisé qu'après trois lectures dans les 2 premières boîtes de pétri. Afin d'éviter que des embryons restent dans le flacon, ce dernier est agité par des mouvements circulaires pour mettre les embryons en suspension juste avant le versement dans les boîtes de pétri.

Pour observer les embryons au microscope binoculaire, la boîte de pétri doit être glissée horizontalement d'une extrémité à l'autre et lue carreau par carreau (voir Figure n° 29).

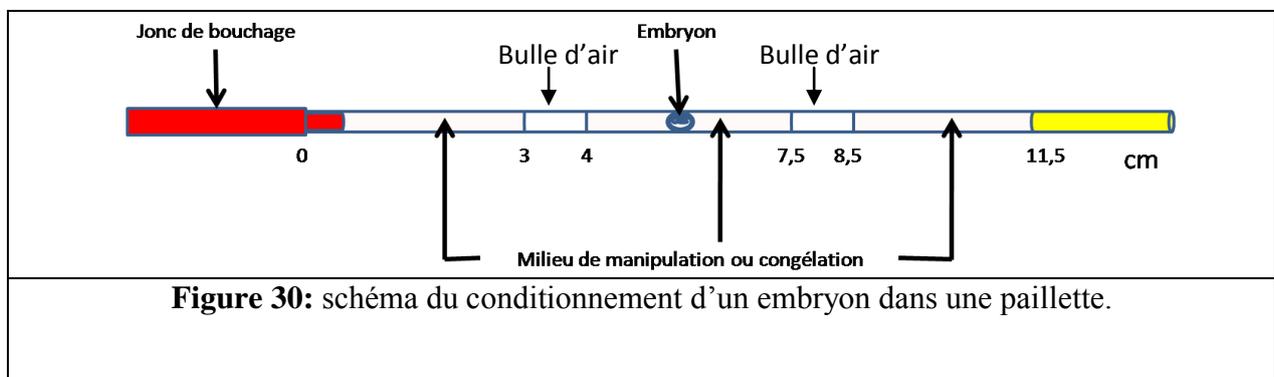


**Figure 29:** Schéma de la technique de recherche d'embryons dans une boîte de pétri.

Chaque embryon trouvé est aspiré au moyen d'une pipette et mis dans une cupule contenant 4 ml du milieu de manipulation. L'appréciation du stade de développement de l'embryon et sa qualité est effectuée dans la boîte de pétri et dans la cupule.

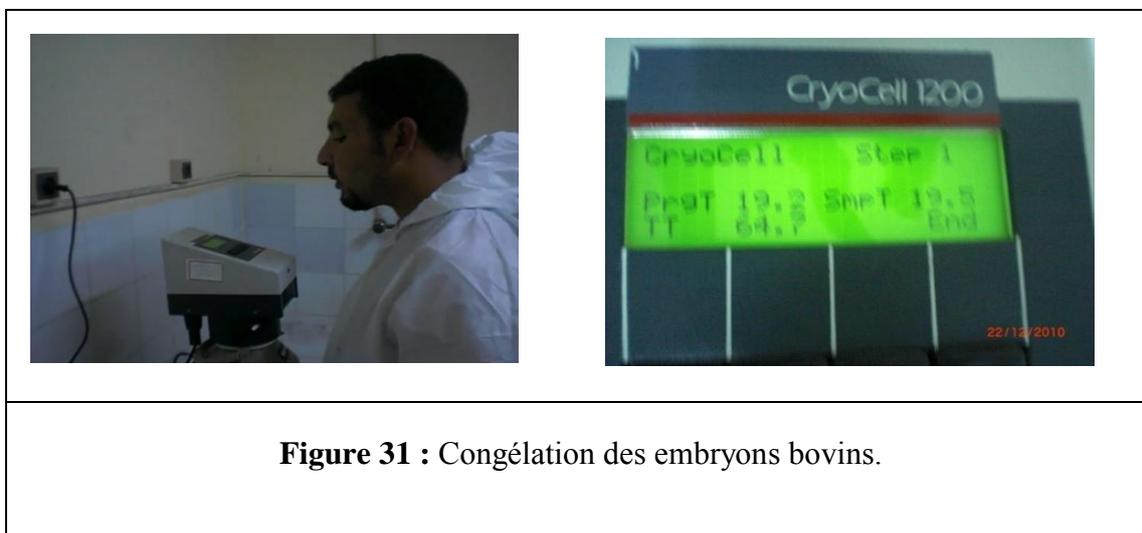
### II.2.9. Congélation des embryons

Les embryons collectés, destinés à la congélation, ont été transférés du milieu de manipulation vers la cupule remplie du milieu de congélation (MC). L'équilibration entre les embryons collectés et le milieu de congélation a duré 5 min, juste après quoi, chaque embryon était conditionné dans une paillette traditionnelle de couleur jaune de la manière suivante : 3 cm du milieu de manipulation (MM), 1 cm de bulle d'air, 3,5 cm de MC contenant un embryon, 1 cm de bulle d'air et 3 cm de MM. Enfin, la paillette, une fois montée, est fermée à l'aide d'un jonc de bouchage de couleur rouge (Figure n°30).



**Figure 30:** schéma du conditionnement d'un embryon dans une paillette.

La congélation des embryons était réalisée grâce à un appareil rempli d'azote liquide et préprogrammé respectant un protocole déterminé se déroulant en trois étapes : i) les embryons subissent un changement de température de + 20°C à -7°C avec une vitesse de refroidissement de -3°C/min, ii) agitation des paillettes grâce la mobilisation de la tige métallique de l'appareil à -7°C pendant 10 secondes pour induire la cristallisation, iii) passage de -7 à -35°C avec une vitesse de -0,5°C/min (Figures n°31 et 32, Tableau n°21).

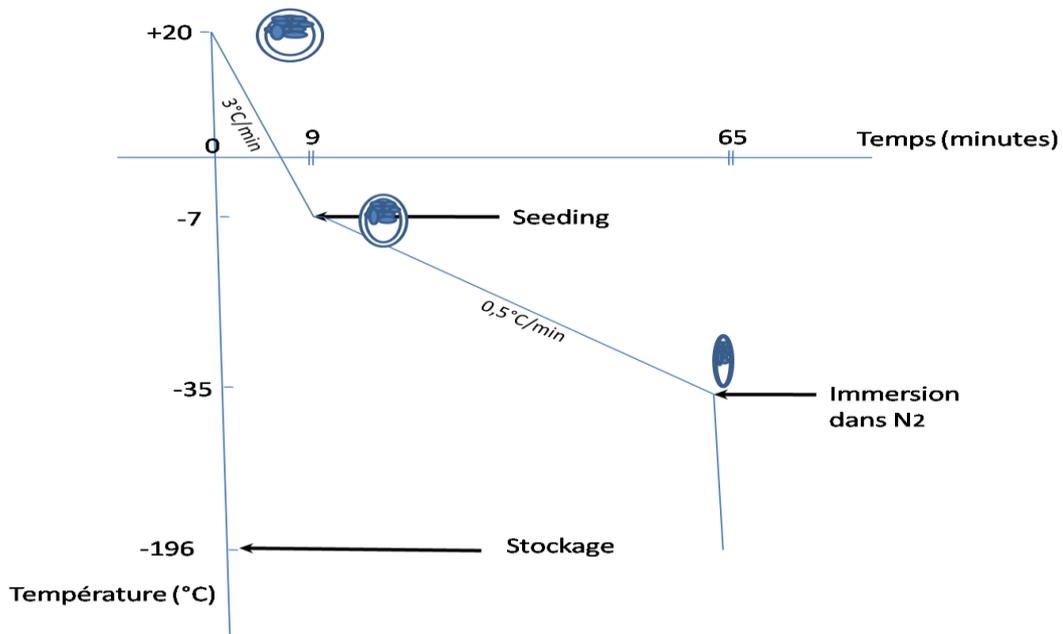


**Figure 31** : Congélation des embryons bovins.

Les embryons destinés à la congélation furent déposés dans le portoir de l'appareil de congélation, puis soumis au protocole dit de congélation lente. Une fois à la température d'immersion (-35°C), les paillettes sont immergées directement dans l'azote liquide.

**Tableau 21:** Protocole de congélation des embryons bovins

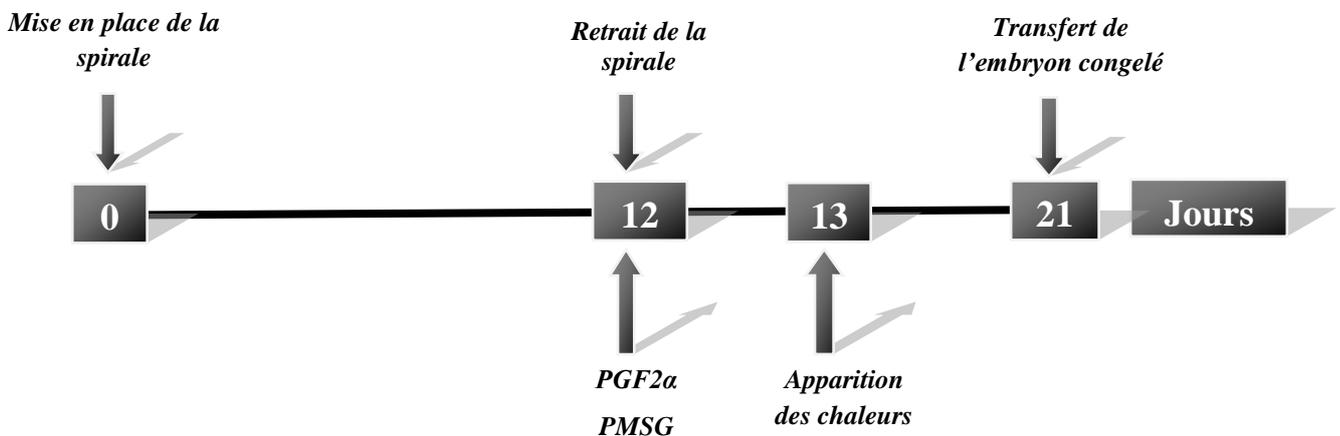
Étapes	Équilibration dans le milieu de congélation	Étape 1 de refroidissement	Étape 2 induction de cristallisation	Étape 3 de refroidissement	Conservation
Températures et vitesse d'évolution de la congélation	5 minutes à 37°C	De +20°C à -7°C, à -3°C/min	Stimulation mécanique à -7°C	De -7°C à -35°C à -0,5°C/min	À -35°C immersion directe dans l'azote liquide
Milieu de congélation = 1,5 mole de l'éthylène glycol + 0,1 mole de sucrose + 4% Bovin Serum Albumin (BSA) + Antibiotiques + D-glucose + vitamines + les facteurs de croissance.					



**Figure 32 :** Courbe de congélation lente des embryons bovins

### II.2.10. Transfert des embryons congelés

Les receveuses ont été synchronisées au moyen d'une spirale vaginale (Figure n°33). Neuf jours après le retrait de cette dernière (7 jours après l'apparition des chaleurs), nous avons décongelé les paillettes de la même façon que pour l'insémination artificielle, c'est-à-dire 3 secondes dans l'air et 40 secondes immergées dans un bain d'eau à 37°C.



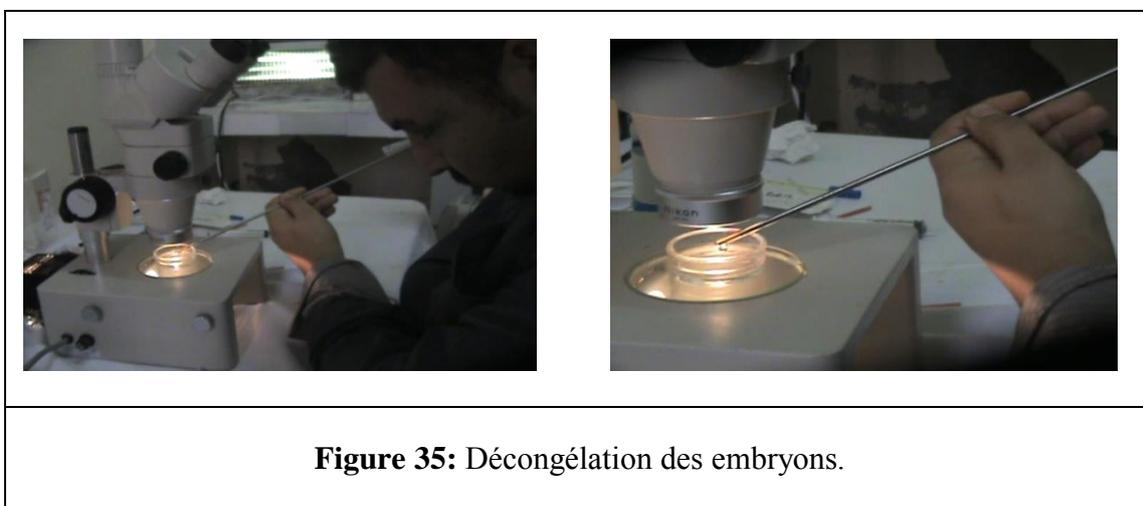
**Figure 33:** Le protocole de préparation des receveuses pour le transfert des embryons congelés

Les embryons décongelés étaient transférés directement, sans évaluation préalable de leur qualité, en montant la paillette contenant l'embryon sur le pistolet du transfert de la même façon que pour l'insémination artificielle (Figure n°34), c'est le *transfert direct*. Par souci d'hygiène, l'utilisation d'une chemise sanitaire, la désinfection et le nettoyage de la vulve sont préconisées avant l'introduction du pistolet.



Au moyen d'une palpation rectale, nous avons déposé l'embryon par voie cervicale dans la corne ipsilatérale de l'ovaire porteur du corps jaune (Figure n°35).

L'évaluation de la qualité de certains embryons décongelés a été réalisée après le versement du contenu de la paillette dans une cupule contenant 3 ml de milieu de manipulation : holding medium (Figure n°35). Seul l'embryon ayant conservé une qualité bonne ou moyenne a été reconditionné et transféré.



---

### **II.2.11. Diagnostic de gestation**

A 21 jours après les chaleurs de transfert des receveuses, un diagnostic de gestation précoce était effectué au moyen de dosage de progestérone sérique (une progestéronémie supérieure à 2 ng/ml est un indicateur d'une gestation présumée), la palpation transrectale et l'échographie étant des techniques de diagnostic qui permettent d'affirmer ou d'infirmer une gestation plus tardivement.

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Résultats

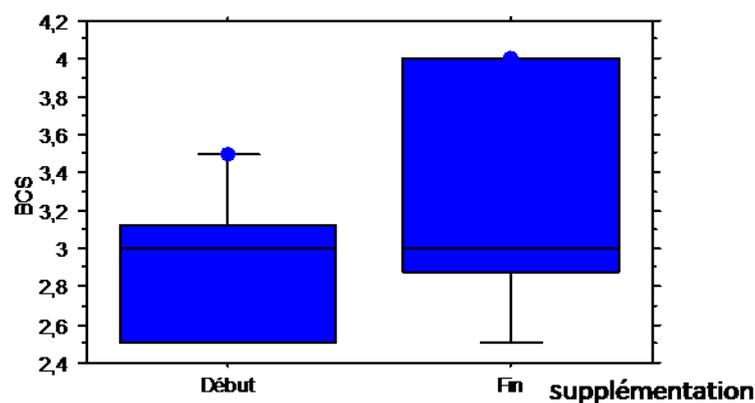
##### III.1.1. Donneuses de race locale

##### III.1.1.1. Évolution de l'état corporel

La préparation (antibiothérapie, déparasitage et vitaminothérapie) et la supplémentation alimentaire des animaux de race locale ont permis un gain de poids de  $47,08 \pm 15,13$  kg en moyenne par vache et une augmentation de  $0,38 \pm 0,35$  en BCS traduisant un meilleur état corporel (Tableau n°22). En effet, 75% des vaches avaient un BCS < 3.1 au début de la supplémentation alors qu'à la fin, 75% avaient un BCS > 2.9 (Figure n°36). Il est important de signaler que toutes les vaches destinées à l'expérimentation au départ ont été incluses dans le programme de production d'embryons.

**Tableau 22:** Évolution du poids et de l'état corporel chez les donneuses de race locale

Donneuses	Poids (kg)			BCS		
	Début de supplémentation	Fin de supplémentation (début de l'expérimentation)	Différence	Début de supplémentation	Fin de supplémentation (début de l'expérimentation)	Différence
1	329	381	52	3	4	1
2	258	300	42	2,5	3	0,5
3	313	351	38	3	3	0
4	372	440	68	3,5	4	0,5
5	289	304	15	3,5	3,5	0
6	220	269	49	2,5	2,5	0
7	361	399	38	2,5	3	0,5
8	319	354	35	3,5	4	0,5
9	287	341	54	3	3,5	0,5
10	215	268	53	2,5	2,5	0
11	240	274	34	2,5	3	0,5
12	211	271	60	2,5	2,5	0
13	260	334	74	3	4	1
Moyennes	282.62	329.69	47.08±15.13	2.88	3.27	0.38±0.35



**Figure 36:** Évolution de BCS des donneuses de race locale pendant la supplémentation

### III.1.1.2. Chaleurs des donneuses

L'observation continue des donneuses a permis de détecter des signes de chaleurs chez toutes les vaches avec un délai moyen de leur apparition de  $37,27 \pm 2,39$ h après la première injection de  $\text{PGF2}\alpha$  (Tableau n°23).

**Tableau 23:** Délais d'apparition des chaleurs chez les donneuses après injection de  $\text{PGF2}\alpha$

Donneuses	Intervalle injection de $\text{PGF2}$ -Apparition des chaleurs
1	43,00
2	39,00
3	36,50
4	34,50
5	34,00
6	37,00
7	36,00
8	38,00
9	39,50
10	38,50
11	37,50
12	37,00
13	34,00
<b>Moyenne</b>	<b><math>37,27 \pm 2,39</math></b>

### III.1.1.3. Réponse au traitement de superovulation

Notre étude s'est réalisée concomitamment avec une autre étude qui consistait à déterminer la réponse de l'ovaire à l'action superovulante de deux doses différentes de FSHp chez la vache locale. Seule l'étape de production d'embryons, suite à la superovulation et insémination, était commune aux deux études, notre travail n'ayant pas pris compte de l'effet dose sur la stimulation ovarienne.

Les résultats du dénombrement des corps jaunes de chaque donneuse par palpation rectale représentent la moyenne des valeurs rapportées par trois manipulateurs. Les chiffres sont décrits dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 24:** Réponses au traitement de superovulation

Donneuses	Dose de FSH	Corps jaunes		
		ovaire gauche	ovaire droit	Total
1	32mg	10	11	21
2	32mg	15	9	24
3	40mg	13	12	25
4	40mg	12	9	21
5	40mg	11	7	18
6	40mg	8	11	19
7	32mg	10	12	22
8	32mg	11	14	25
9	32mg	11	8	19
10	32mg	8	10	18
11	40mg	7	11	18
12	40mg	9	5	14
13	40mg	7	10	17
<b>Total</b>		<b>132</b>	<b>129</b>	<b>261</b>
<b>Moyenne</b>		<b>10,15</b>	<b>9,92</b>	<b>20,08± 3,17</b>

Il est à noter que la donneuse N° 9 a été écartée du groupe programmé pour la collecte. En effet, au moment de l'insémination artificielle, celle-ci a exhibé non seulement un cervix infranchissable au pistolet d'insémination mais aussi une asymétrie nette de ses cornes. Quant aux deux génisses donneuses laparotomisées (1 et 2), nous avons non seulement récolté des embryons mais aussi procédé au comptage des corps jaunes sur chaque ovaire (Figure n°37).



**Figure 37 :** Ovaire d'une génisse avec plusieurs corps jaunes

#### III.1.1.4. Volume de liquide aspiré

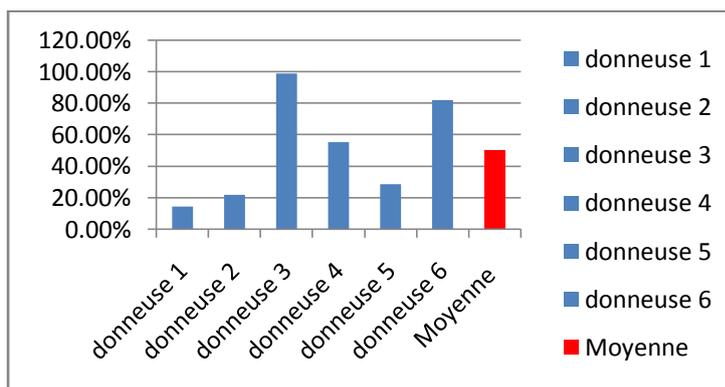
Le tableau ci-dessous rend compte des volumes injectés et aspirés pendant l'opération de collecte. Il est à noter que 02 génisses (1 et 2) ont subi une laparotomie à cause d'un col infranchissable. Cependant, seules les cornes gauches ont été siphonnées, les cornes droites étant inaccessibles. Cette opération n'a pas pu être renouvelée chez les autres donneuses (06) présentant les mêmes difficultés d'accès du col et ce, à cause de la lourdeur de la récolte chirurgicale, d'où leur élimination de la collecte.

**Tableau 25:** Volumes de liquide de PBS injecté et aspiré

Vache	Corne gauche		Corne droite		Total de volume		Taux de volume aspiré		Moyenne de liquide aspiré par corne
	Volume		Volume						
	Injecté	aspiré	injecté	aspiré	injecté	aspiré	CG	CD	
1	250	072	-	-	250	072	28,80%	0,00%	14,40%
2	250	110	-	-	250	110	44,00%	0,00%	22,00%
3	250	247	250	249	500	496	98,80%	99,60%	99,20%
4	250	243	250	134	500	377	57,20%	53,60%	55,40%
5	180	103	-	-	180	103	57,22%	0,00%	28,61%
6	250	250	170	111	420	361	99,20%	65,29%	82,25%
<b>Taux moyen du volume en ml aspiré par les cornes</b>							<b>64,20%</b>	<b>36,42%</b>	<b>50,31%</b>

Les donneuses 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 ne sont pas collectées.

La figure ci-dessous représente les taux moyens des liquides aspirés par corne et la moyenne du total des liquides aspirés.



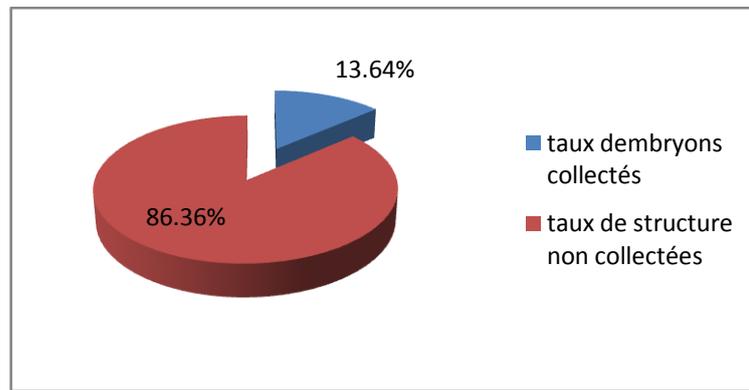
**Figure 38 :** Taux moyens de volume aspiré/corne

### III.1.1.5. Embryons collectés

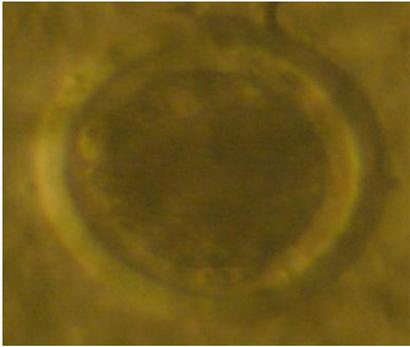
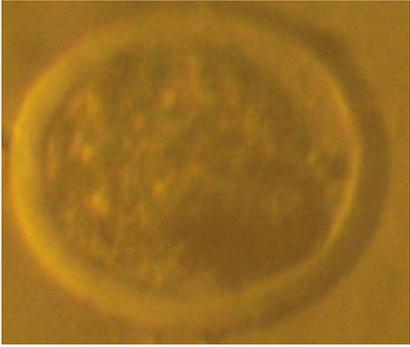
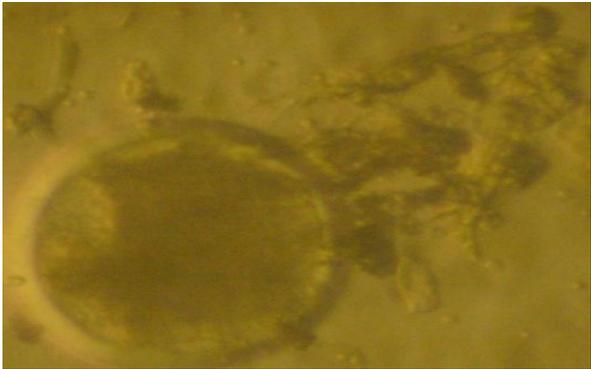
L'examen des liquides collectés a permis de distinguer des embryons à différents stades du développement et des ovocytes non fécondés. La récapitulation des structures collectées est représentée dans le tableau n°26 et la figures n°39 et 40.

**Tableau 26:** Réponses au traitement de superovulation et les structures collectées

Donneuses	Corps jaunes	Structures collectés							
	Total	Embryons	Ovocytes	Zone pellucide vide	Stade de développement de l'embryon	Classe	Embryons transférables	Embryons congelables	Total
1	21	1	2	0	Jeunes blastocystes	1	0	1	1
2	24	5	0	0	4 Morulas et 02 cellules	4	0	0	0
3	25	4	0	1	Jeunes blastocystes	1	1	2	3
4	21	2	2	1	Morula	1	1	1	2
5	18	1	0	0	Blastocyste expansé	1	1	0	1
6	19	4	1	0	2 Morulas, 1 Blastocyste	Morula : 2 et 3 Blastocyste : 1	2	1	3
Total	128	17	5	2	-	-	5	5	10
Nombre d'embryon classe 1					<b>8</b>				
Nombre d'embryon classe 2					<b>1</b>				
Nombre d'embryon classe 3					<b>1</b>				
Taux d'embryons/ovulations					<b>13,28%</b>				
taux d'embryon utilisables					<b>58.88%</b>				
Nombre d'embryon utilisables/vache					<b>1,66</b>				



**Figure 39:** Taux d'embryons collectés par rapport au nombre de corps jaunes

	
<p>A : Ovocyte</p>	<p>B : Morula compact classe 1</p>
	
<p>C : Jeune blastocyste (début de formation de blastocœle) classe 1</p>	<p>D : Zone pellucide vide</p>
	
<p>E : Embryon dégénéré</p>	
<p><b>Figure 40:</b> Différents structures collectées.</p>	

### III.1.1.6. Devenir des embryons collectés

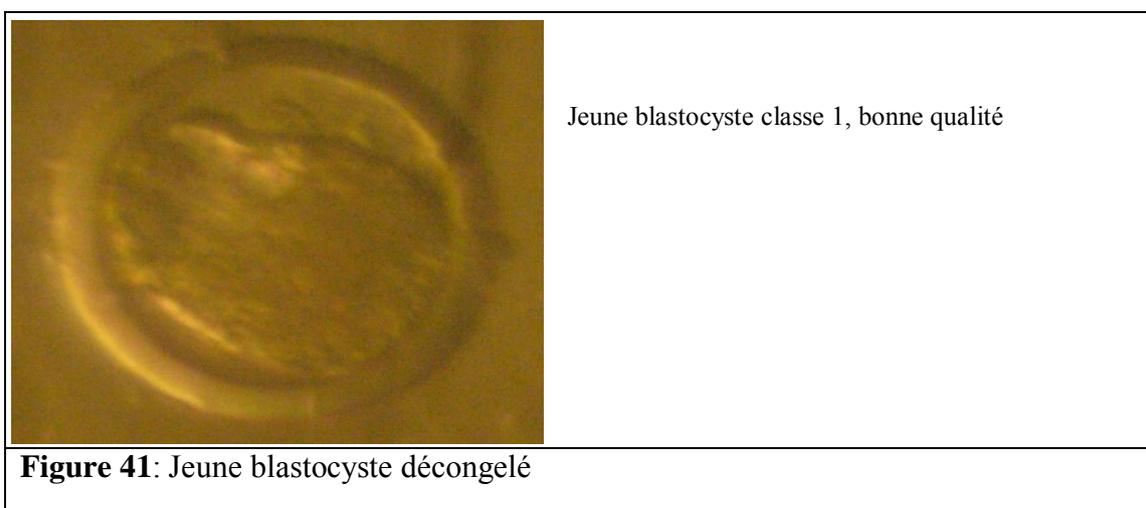
Cinq (5) embryons [3 morulas, 1 morula compact, un jeune blastocyste] ont été congelés par la méthode conventionnelle utilisant l'éthylène glycol.

Durant le processus de congélation, nous avons perdu 2 embryons (2 Morula). La perte d'embryons était due à une coupure d'électricité pour le premier et au coincement de la paillette dans le portoir de l'appareil de congélation à la fin de protocole de congélation pour le deuxième.

### III.1.1.7. Décongélation des embryons

Deux mois après la congélation, 02 embryons étaient décongelés puis transférés chez 02 receveuses sans avoir recours à l'observation microscopique : c'est le transfert direct. Dans le but d'apprécier la qualité de l'embryon, sous la loupe binoculaire, après la décongélation, nous avons versé le contenu de la paillette dans le milieu de manipulation. Enfin, l'embryon était reconditionné puis transféré chez la receveuse ayant reçu, auparavant, un embryon en transfert direct.

L'appréciation visuelle de la qualité de l'embryon décongelé a permis d'observer des blastomères sortant de la masse cellulaire interne et de le positionner en classe 1 de bonne qualité (Figures n°41).



### III.1.1.8. Résultats du transfert

Le diagnostic précoce de gestation via le dosage hormonal et l'échographie est un élément essentiel pour juger de la fiabilité de la méthode de congélation.

Contrairement à la génisse n°1, l'absence de retour en chaleurs chez la génisse n°2 a permis de présumer d'une gestation. Ceci a été corroboré par une progestéronémie > 2ng/ml (Tableau n°27). De plus, au 49<sup>ème</sup> jour post transfert, la palpation rectale a décelé une asymétrie des cornes, la corne droite étant plus développée que celle de gauche. Par ailleurs, un léger développement mammaire était remarqué. Cependant, au 56<sup>ème</sup> jour post transfert, l'échographie a montré un résultat négatif de gestation lequel a été confirmé par un retour en chaleur observé au 60<sup>ème</sup> jour post transfert.

**Tableau 27:** Résultats de transfert des embryons congelés

N° de la génisse	Nombre d'embryons reçus	État de l'embryon	Retour en chaleur avant 21 jours	Dosage de progestérone 21 jours ng/ml	Résultats
1	2	Décongelé	18 <sup>e</sup> jour	0,66	-
2	1	Décongelé	-	<b>8,31</b>	+

### III.1.2. Résultats pour la race améliorée

#### III.1.2.1. Réponses au traitement de superovulation

Le dénombrement des corps jaunes et des follicules, par palpation rectale, au moment de la récolte était le premier critère de la réponse au traitement de superovulation de chaque ovaire (Tableau n°28).

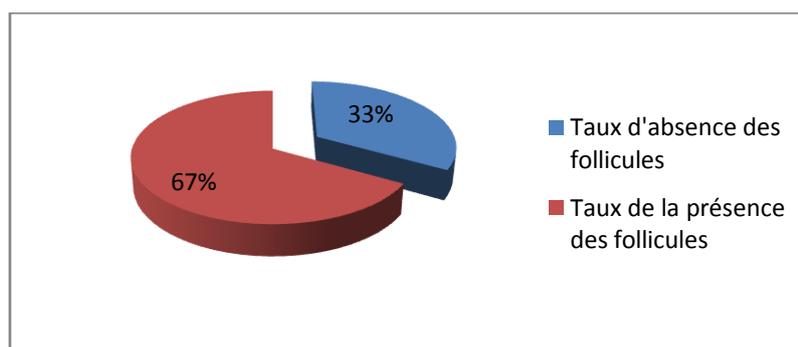
**Tableau 28:** Distribution des différentes structures dans les ovaires issus du traitement de superovulation via la **PMSG**

Génisse	Nombre de corps jaunes		Nombre de Follicules		Total	
	OD	OG	OD	OG	Corps jaunes	Follicules anovulatoire
1	05	03	00	00	08	00
2	05	03	01	00	08	01
3	05	01	02	01	06	03
Moyenne	5	2,33	1	0,33	7,33	1,33

Les taux de réponses des génisses, en termes de follicules anovulatoires, sont représentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

**Tableau 29 :** Taux des génisses ayant des follicules dans leurs ovaires

	Nombre des génisses	Taux des génisses
Présence des follicules	2	67 %
Absence des follicules	1	33 %
<b>Totale</b>	<b>3</b>	<b>100 %</b>



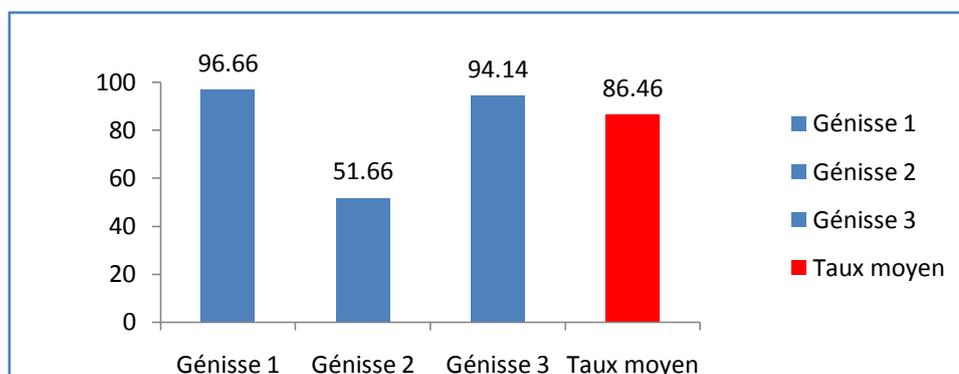
**Figure 42:** Taux de réponse des génisses en fonction du nombre des follicules anovulatoires

### III.1.2.2. Volume des liquides injectés et aspirés durant la collecte des embryons

Le nombre d'embryons collectés dépend des volumes injectés et aspirés. Le tableau et la figure suivants montrent, précisément, les volumes injectés et aspirés pour chaque génisse.

**Tableau 30:** Taux des liquides aspirés

Génisse	Corne droite		Corne gauche		Totale		Taux (%) de liquide aspiré/corne
	injecté	aspiré	injecté	aspiré	injecté	aspiré	
<b>1</b>	250	233	250	250	500	483	96,66
<b>2</b>	-	-	300	155	300	155	51,66
<b>3</b>	350	310	350	349	700	659	94,14
<b>Totale</b>	<b>600</b>	<b>543</b>	<b>900</b>	<b>754</b>	<b>1500</b>	<b>1297</b>	<b>86,46</b>



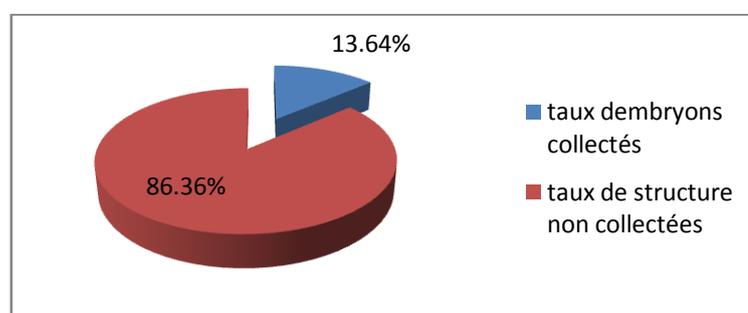
**Figure 43 :** Taux de liquide aspiré pour chaque génisse

### III.1.2.3. Nombre d'embryons collectés

Le nombre des embryons collectés et les taux de collecte sont indiqués dans le tableau n°31 et la figure n°44 :

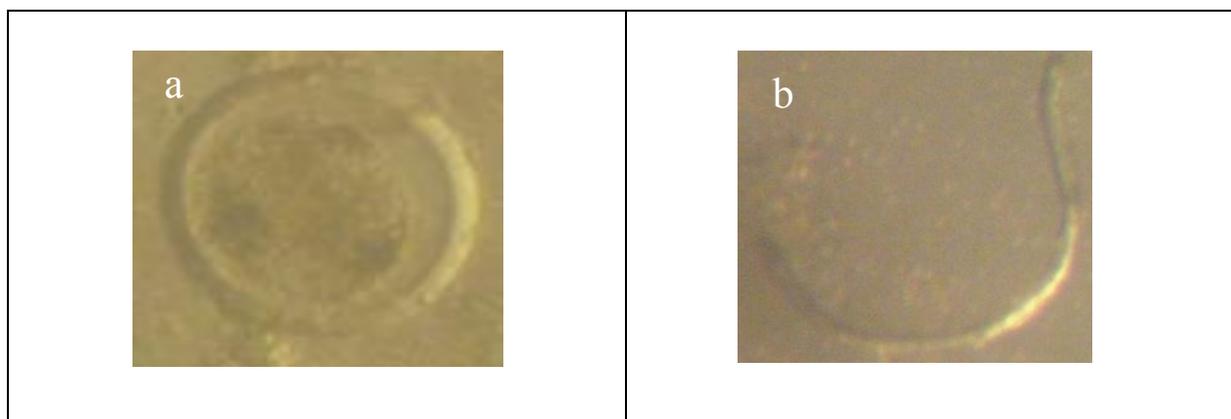
**Tableau 31:** Réponse au traitement de superovulation et les structures collectés

Génisse	Nombre de CJ	Nombre de F	Nombre des embryons	Stade	Nombre d'ovocyte	Qualité	Taux d'embryons collecté
1	8	0	1	Morula	0	Mauvaise	12,50%
2	8	1	1	Morula compact	0	Excellente	12,50%
3	6	3	1	-----	0	Embryon éclaté	16,67%
Totale	22	4	3	-	0	-	13,64%



**Figure 44:** Taux d'embryons collecté par rapport au nombre de corps jaunes

Le Morula d'excellente qualité, issu de la deuxième génisse, était destiné à la congélation. Cependant, l'élimination de 02 embryons issus de la première et la troisième donneuse est due à la mauvaise qualité du premier et à l'éclatement du deuxième (Figure n°45). Notons que l'embryon éclaté montre une pellucide ouverte, une dispersion des cellules.



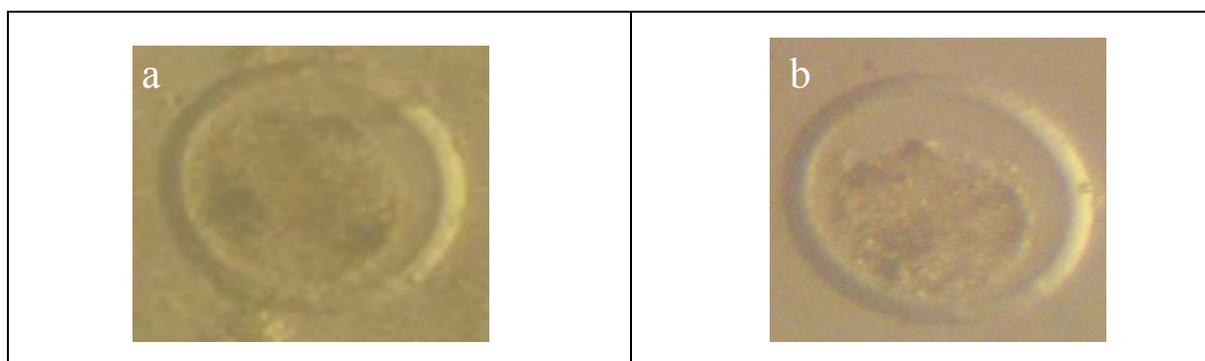
**Figure 45:** Embryons collectés chez la race améliorée

**a :** Morula compact : Zone pellucide intacte: blastocœle, embryon sphérique, texture semblable (absence des cellules détachées), contour des blastomères est homogène.

**b :** Embryon éclaté : Zone pellucide ouverte, des blastomères dispersés.

#### III.1.2.4. Qualité de l'embryon après la décongélation

Un mois après la congélation, l'embryon était réchauffé pour être apprécié sous la loupe binoculaire. La figure suivante démontre que la qualité de l'embryon est diminuée de 02 classes (Figure n°46).



**Figure 46:** Morula compacte avant et après la décongélation

**a :** Morula avant la congélation classe 1.

**b :** Morula décongelée de classe 3, caractérisée par une dégénérescence et un détachement de quelques blastomères autour de la masse cellulaire.

### III.1.2.5. Résultats de transfert de l'embryon congelé

Vingt et un (21) jours après l'apparition des chaleurs chez la receveuse, c'est-à-dire 12 jours après le transfert, le diagnostic par dosage de la progestérone sérique s'est révélé positif (14,83 ng/ml) (Tableau n°32). Cependant, un retour en chaleur était observé au 49<sup>ème</sup> jour post transfert indiquant l'absence de gestation confirmée par palpation rectale à 60<sup>ème</sup> jour post transfert.

**Tableau 32:** Résultats de transfert de l'embryon congelé

N° de la génisse	Race	Age de l'embryon reçu	État de l'embryon	Qualité de l'embryon reçu	Dosage de progestérone 21 jours ng/ml	Résultats
1	Holstein PN	7 jours	Décongelé	Moyenne	<b>14,87</b>	+

## **III.2. Discussion générale**

### **III.2.1. Méthodologie de travail**

#### **III.2.1.1. Choix des donneuses**

Dans la présente étude, nous avons utilisé 13 donneuses de race locale « Brune de l'Atlas » de la station expérimentale de BABA Ali. En fait, notre étude s'est déroulée concomitamment avec une autre, menée dans le cadre d'un Magistère, qui avait pour objectif de comparer 2 doses différentes d'une hormone de superovulation (FSH) chez la race locale. Cependant, le nombre réduit d'embryons collectés était la principale raison de recrutement de trois génisses de races améliorées comme donneuses d'embryons.

#### **III.2.1.2. Choix des receveuses**

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé 3 génisses de races améliorées comme receveuses. Notre choix de cette catégorie de femelle est basé sur une étude qui a montré que le taux de gestation après transfert d'embryons chez des génisses est plus élevé par rapport à celui obtenu chez des vaches (Berg *et al.*, 2010).

#### **III.2.1.3. Superovulation**

Dans notre étude, nous avons utilisé des extraits hypophysaires pour la superovulation et plus précisément la FSHp à 40% qui semble être la plus adéquate pour la superovulation des bovins (Beckers, 1989, Djallel, 2004 ; Sendag *et al.*, 2008). Il est à noter, cependant, que la quantité de FSHp 40% que nous possédions était insuffisante pour superovuler aussi bien les donneuses de race locale que celles de races améliorées. Par conséquent, pour ces dernières, nous avons injecté de la PMSG en utilisant la dose de 2500 UI qui représente la moyenne des doses recommandées situées entre 2000 et 3000 UI (Beckers, 1989).

Le traitement de superovulation peut être effectué, principalement, au début ou au milieu du cycle œstral (D'Occhio *et al.*, 1999) ciblant une des 2 ou 3 vagues folliculaires du cycle (Noseir, 2003). Certains auteurs ont montré que le traitement de superovulation en début de cycle permet de développer un nombre suffisant de follicules, mais avec des taux d'ovulations et d'embryons collectés faibles par rapport à ceux faisant suite au traitement en milieu de cycle (Calder and Rajamhendran (1992). Les inconvénients rencontrés avec le traitement de superovulation en début de cycle pourraient être expliqués par l'insensibilité du

corps jaune en cours de formation à la PGF2 $\alpha$ , une faible sécrétion d'œstrogènes folliculaires qui ne suffit pas pour stimuler la décharge ovulante de LH, l'insensibilité des follicules à la LH et l'atrésie des follicules stimulés (Calder and Rajamhendran, 1992). Par conséquent, nous avons opté pour une superovulation des donneuses au milieu du cycle œstral en ciblant la deuxième vague folliculaire (10<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour du cycle). A plus forte raison que l'efficacité de cette approche a été confirmée dans une autre étude (Fricke *et al.*, 1994).

#### III.2.1.4. Choix de méthode congélation

Deux méthodes de congélation existent : la congélation lente ou classique et la congélation rapide ou vitrification. Si la première méthode est utilisée surtout pour les embryons produits *in vivo* qui tolèrent les variations de température (Sommerfeld *et al.*, 1999) et la simplicité du milieu de congélation contenant un seul cryoprotecteur de faible toxicité (Chian *et al.*, 2010 ; Liebermann *et al.*, 2003), la 2<sup>e</sup> est réservée aux embryons sensibles au protocole de congélation lente, en l'occurrence, ceux produits *in vitro* et ceux riches en gouttelettes lipidiques (embryons porcins) (Martinez *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2006).

Sachant que nos embryons ont été produits *in vivo* et que la vitrification nécessite un personnel qualifié et l'utilisation de plusieurs cryoprotecteurs avec des concentrations élevées pouvant être toxiques pour la cellule (Vajta, 2000), nous avons mis en place le protocole de la congélation lente. Pour cette dernière, la vitesse de refroidissement, qui régit la formation des cristaux de glace (cristallisation) dans le milieu, est la clé principale de la réussite de l'opération de cryopréservation. En effet, au fur et à mesure du refroidissement, des cristaux de glace extracellulaires se forment en augmentant progressivement la concentration des solutés extracellulaires. Ce qui entraîne la déshydratation progressive de l'embryon (Bakhach *et al.*, 2007) par phénomène d'osmose. Il est important de savoir que le processus de déshydratation, lui-même tributaire de la vitesse de refroidissement, doit être optimale et non létale en évitant la formation des cristaux de glace intracellulaires à l'origine des lésions fatales (Bakhach *et al.*, 2007). Par conséquent, la vitesse de refroidissement recommandée pour la survie de l'embryon bovin ne doit pas être inférieure à -1°C/min (Allard, 2004).

Dans notre étude, nous avons appliqué une vitesse de refroidissement décroissante de 0,5 °C/min dont l'efficacité a été prouvée pour la congélation des embryons bovins par l'éthylène glycol (Voelkel *et al.*, 1992).

### III.2.1.5. Choix de cryoprotecteur

Les cryoprotecteurs les plus utilisés dans le milieu de congélation des embryons sont le glycérol, le propylène glycol, le DMSO et l'éthylène glycol (Massip, 2001). En raison de sa faible toxicité (Liebermann *et al.*, 2003), nous avons utilisé l'éthylène glycol. De plus, ce dernier permet le transfert direct d'embryons chez des receveuses suite à leur réchauffement. En effet, les propriétés osmotiques de l'éthylène glycol, caractérisées par sa vitesse rapide de diffusion intra et extracellulaire, permettent une réhydratation de l'embryon (Zhmakin, 2009) sans recours à l'étape supplémentaire de son enlèvement durant la décongélation. D'où la possibilité de le transférer directement chez une receveuse.

Dans notre travail, nous avons, plus précisément, utilisé un milieu de congélation (prêt à l'emploi) contenant à la fois de l'éthylène glycol et du saccharose (Minitube, REF : 19982/1302). En effet, des travaux antérieurs ont montré que l'incorporation de saccharose dans le milieu de congélation protège l'embryon contre les cristaux de glace extracellulaires durant la congélation (cryoprotecteur extracellulaire) (Liebermann *et al.*, 2003), de même, qu'il facilite l'enlèvement du cryoprotecteur intracellulaire par le phénomène d'osmose durant la décongélation (Leibo, 1984 ; Suzuki *et al.*, 1990). De plus, des chercheurs ont comparé les taux de gestation résultants des transferts d'embryons provenant de différents milieux de congélation : Ethylène glycol, Ethylène glycol+Saccharose ; Glycérol. Ils ont conclu que le milieu de congélation contenant l'éthylène glycol+saccharose donne de meilleurs résultats, en termes de gestation, proches de ceux obtenus suite au transfert d'embryons frais (Martinez *et al.*, 2002).

## III.2.2. Résultats

### III.2.2.1. Chaleurs de superovulation

Dans notre étude, 100% des donneuses ont manifesté des chaleurs induites par l'injection de la PGF2 $\alpha$  au milieu du cycle. Ce résultat diffère de ceux enregistrés par Etherington *et al.*, (1986) et Daltan *et al.*, (2000) qui rapportent respectivement 13% et 17% de non retour en chaleurs. Cette différence pourrait être expliquée par le traitement préalable appliqué à nos donneuses (Antibiothérapie, déparasitage et vitaminothérapie), le régime alimentaire adopté (foin et concentré VL-B17), leur état corporel et l'absence de production laitière.

Entre l'injection de la PGF2 $\alpha$  et l'apparition des chaleurs s'écoule un intervalle de temps qui peut être plus ou moins long. Ce dernier est fonction du moment de l'injection durant la phase lutéale. Certains auteurs jugent que cet intervalle sera plus long si l'injection est réalisée au milieu du cycle œstral (11<sup>ème</sup> jour : +72 h) qu'au début (6<sup>ème</sup> jour : 52 h) ou à la fin (16<sup>ème</sup> jour : 68 h) (Etherington *et al.*, 1986 ; de Tanabe and Hann, 1984). Dans notre étude, après avoir injecté la PGF2 $\alpha$  au 12<sup>ème</sup> jour du cycle, nous avons observé une précocité dans l'apparition des chaleurs avec un intervalle de courte durée : 37,27h. Cette précocité pourrait être expliquée par l'effet adjuvant du traitement de superovulation. L'effet de la superovulation sur l'apparition précoce des chaleurs a déjà été rapporté dans une précédente étude. En effet, les auteurs de cette étude suggèrent que la superovulation entraîne une forte imprégnation en œstrogènes, due au développement simultané de plusieurs follicules, qui constituerait le facteur inducteur de la précocité (Daltan *et al.*, 2000).

Notre résultat se rapproche de celui rapporté par Ferroukh *et al.*, (2008) dans une étude comparative à la notre sur la race locale algérienne (39,5h) comme il concorde avec ceux enregistrés par da Costa *et al.*, (2001); Daltan *et al.*, (2000),  $31.1 \pm 1$  h et  $39.4 \pm 7.7$  h respectivement après l'injection de la PGF2 $\alpha$  chez les femelles superovulées.

### **III.2.2.2. Réponse au traitement de superovulation par la PMSG**

Faute de quantités suffisantes de FSHp, nous avons superovulé 3 génisses de races améliorées avec de la PMSG (2500 UI). Ce traitement s'est soldé par la présence de follicules anovulatoires 18% déjà rapportée par Driancourt *et al.*, (1991). En effet, ces derniers ont enregistré 30% des follicules anovulatoires suite à un traitement de superovulation par la PMSG. Ce phénomène serait dû à la demi-vie longue de cette hormone responsable d'une perturbation du climat hormonal caractérisée par une augmentation des concentrations sanguines d'œstrogènes (Greve *et al.*, 1995) et probablement d'inhibine qui inhibe la sécrétion de la FSH (Bever *et al.*, 1989).

Certains auteurs ont décelé une progestéronémie élevée durant les chaleurs des vaches superovulées par la PMSG (Jensen *et al.*, 1982) indiquant la persistance d'un corps jaune malgré l'injection de PGF2 $\alpha$ . Ils ont suggéré que la PMSG a un effet lutéotrope en maintenant le corps jaune tout en le rendant insensible à la PGF2 $\alpha$  (Jensen *et al.*, 1982). Cette progestéronémie élevée serait à l'origine de la diminution des pulses de LH responsable d'un taux faible d'ovulation (Price *et al.*, 1999).

Toutes les modifications suscitées, hormonales surtout, sont responsables d'un taux faible d'ovulation, d'une mauvaise maturation ovocytaire et d'un mauvais développement

embryonnaire (Greve *et al.*, 1995). Elles peuvent expliquer en effet, à la fois, la moyenne d'1 embryon collecté par génisse, et la moyenne de 0,13 embryon par ovulation. da Costa *et al.*, (2001) ont recueilli 1 embryon viable parmi 10 vaches superovulées au moyen de la PMSG (2500UI) sur un cycle maîtrisé par l'implant.

### III.2.2.3. Réponse au traitement de superovulation par la FSHp

Comparativement au groupe superovulé par la PMSG, les donneuses de la race locale ont bien répondues au traitement de superovulation par les extraits hypophysaires (FSH/LH : 40%) avec une moyenne de 20 CJ/vache. Ce résultat est supérieur à celui rapporté par Ferroukh *et al.*, (2008) (7,5 CJ/vache) ayant superovulé des vaches de la race locale par la même préparation de la FSHp (40%) et les résultats de Djallel (2004) (7 CJ/vache de race améliorée) qui a réalisé une étude comparative entre deux préparations différentes de la FSHp (STIMIFUL et PULSET). La supériorité de la réponse ovarienne de nos vaches au traitement hormonal de superovulation pourrait être expliquée par la préparation de nos donneuses d'embryons au moyen d'implants avant le traitement de superovulation. Il est intéressant de noter que la réponse ovarienne enregistrée dans notre étude est caractérisée par l'absence des follicules anovulatoires vraisemblablement due à la courte demi-vie de la FSHp.

En termes de taux d'ovulations et d'embryons collectés transférables, notre étude montre une efficacité nette de la FSHp par rapport à la PMSG. Ce résultat est en accord avec les résultats des travaux antérieurs (da Costa *et al.*, 2001 ; Elsdén *et al.*, 1978 ; Sendag *et al.*, 2008).

Dans notre étude, le taux embryons collectés / nombre d'ovulations (13,28%) et la moyenne des embryons collectés /donneuse (2,83) sont inférieurs à ceux rapportés par Ferroukh *et al.*, (2008) (66,66% et 5 respectivement) ayant travaillé sur des vaches de race locale. Ce faible taux est probablement dû au volume réduit des matrices des donneuses collectées surtout des génisses qui présentaient un col difficile à cathétériser voire, quelques fois, infranchissable expliquant la perte de la moitié du liquide injecté à l'aspiration (**50,31%**).

### III.2.2.4. Décongélation des embryons

Dans notre étude, les 2 embryons produits *in vivo* ont subi un protocole de congélation lente en utilisant le cryoprotecteur le moins toxique, l'éthylène glycol (Vajta et Nagy, 2006 ; Elnahas, 2010) avec une faible concentration : 1,5M (Chian *et al.*, 2010 ; Stachecki, 2004). Après décongélation, l'évaluation des embryons au microscope binoculaire montre une diminution de leur qualité par une dégénérescence avec un détachement des

blastomères (Morula : race améliorée) et une sortie de quelques cellules de la masse cellulaire interne (jeune blastocyste : race locale) tout en restant transférables.

Il est bien connu que du processus de cryoconservation (congélation/décongélation) peut résulter des lésions qui affectent la qualité de l'embryon. Ces lésions peuvent être de 3 types: i) physique (chocs osmotiques) (Tucker *et al.*, 2007), ii) chimique (toxicité de cryoprotecteur) (Karlesson et Toner, 2000) et iii) thermique (liées au refroidissement et au réchauffement). Les 2 premiers types de lésions sont liés, principalement, à l'addition de concentrations élevées de cryoprotecteur durant la congélation (Youssry *et al.*, 2008) ou à son enlèvement durant la décongélation (Courbière *et al.*, 2009). Le 3ème type de lésions quant à lui génère des lésions: a) de refroidissement (+15°C jusqu'à -5°C) (Vajta et Nagy, 2006; Pollard et Leibo, 1994), b) de cristallisation (formation des cristaux de glace) (-5 °C jusqu'à -80 °C) (Vajta et Nagy, 2006) et c) d'immersion et de stockage dans l'azote de liquide (-196°C) (Vajta et Nagy, 2006). Il est intéressant de noter que la lésion thermique la plus rencontrée durant la décongélation est la fracture de la zone pellucide (-150°C à -80°C) (Tucker *et al.*, 2007) et que les embryons produits *in vivo* sont moins sensibles aux chocs thermiques que ceux produits *in vitro* (Pollard and Leibo, 1994).

Afin d'augmenter les chances de réussite de notre opération de cryoconservation, nous avons utilisé des embryons produits *in vivo*, moins sensibles, donc, aux lésions de refroidissement (de +20 °C à -7°C) (Pollard et Leibo, 1994) et l'éthylène glycol comme cryoprotecteur afin d'éviter l'étape de son enlèvement pendant la décongélation (Scherzer *et al.*, 2008) minimisant, ainsi, les lésions physique et chimique. Cependant, l'embryon peut présenter un défaut (une brèche) au niveau de la membrane plasmique servant de porte d'entrée aux cristaux de glace extracellulaires générés par le processus de refroidissement (Vajta and Nagy, 2006) entraînant, ainsi, des lésions mécaniques des cellules (Meryman, 2007). Ceci pourrait expliquer l'abaissement de la qualité de nos embryons décongelés.

### **III.2.2.5. Résultat du transfert d'embryons congelés**

Suite au processus de congélation/décongélation, nous avons procédé au transfert des 04 embryons obtenus chez 03 receveuses de race améliorée. Deux (02) embryons ont été transférés chez une même receveuse, l'un directement après décongélation, l'autre indirectement après évaluation de la qualité. Les 02 embryons restants ont été transférés, séparément, chez 02 receveuses.

Au 18<sup>e</sup> jour post-insémination, un retour en chaleurs a été observé chez la receveuse ayant reçu 2 embryons à la fois. Au 21<sup>e</sup> jour, la progestéronémie s'est révélée faible avec 0,66

ng/ml. Ces résultats montrent l'absence totale de gestation. Quant aux 02 receveuses ayant reçu chacune 1 embryon, la progestéronémie, au 21<sup>e</sup> jour, s'est révélée élevée : 8,31 ng/ml et 14,87 ng/ml, indiquant, probablement, la présence d'une gestation. Pour l'une, le diagnostic de gestation, était douteux par palpation rectale, au 49<sup>e</sup> jr, et négatif par échographie au 56<sup>e</sup> jr. L'absence de gestation a été confirmée par un retour des chaleurs au 60<sup>e</sup> jr. Pour l'autre, un retour en chaleurs a été observé au 49<sup>e</sup> jr suggérant qu'elle était vide. Ceci a été confirmé par palpation rectale au 60<sup>e</sup> jr. Ces résultats sont les signes d'une mortalité embryonnaire tardive. En effet, une étude précédente a montré qu'une progestéronémie élevée (>2ng/ml) à 21 jours post insémination associée à un diagnostic négatif de gestation entre 60 et 90 jours, chez une vache, sont des indicateurs d'un échec de gestation dû à une mortalité embryonnaire tardive (Humblot, 2003).

L'absence ou l'interruption de gestation après le transfert d'embryons peut être due à plusieurs facteurs parmi lesquels la receveuse. Cette dernière est incapable d'assurer le développement efficace d'un embryon si sa progestéronémie est faible (<2 ng/ml). Ce qui se traduit par une mortalité embryonnaire (Niamann *et al.*, 1985). Ceci pourrait, d'ailleurs, expliquer l'échec de gestation enregistré dans notre étude après transfert chez la receveuse ayant présenté une progestéronémie de 0,66 ng/ml. De même que la resynchronisation des vaches au moyen de la spirale vaginale peut diminuer le taux de gestation après l'insémination artificielle (Chenault *et al.*, 2003) probablement du à l'irritation de la muqueuse vaginale (Xu *et al.*, 1997). Dans notre travail, nous avons utilisé des receveuses ayant préalablement subi une première opération de synchronisation dans le cadre d'un transfert d'embryons frais. Nous les avons resynchronisé au moyen d'une spirale vaginale. Ceci pourrait expliquer l'échec de gestation chez nos receveuses à la suite du transfert d'embryons congelés.

L'échec de gestation peut aussi être lié au nombre d'embryons transféré par receveuse. En effet, il a été montré que le transfert de plus d'un embryon par receveuse augmente le taux de mortalité embryonnaire (Berg *et al.*, 2010). Il a été suggéré que la migration des embryons vers la corne contre latérale de l'ovaire contenant un corps jaune et/ou leur implantation l'un à proximité de l'autre conduit à une concurrence sur l'oxygène et les nutriments maternels (Berg *et al.*, 2010 ; Echtenkamp *et al.*, 1990). Dans notre étude, le transfert de 02 embryons chez la même receveuse pourrait être responsable de l'échec de gestation. Enfin, certains auteurs suggèrent que les taux réduits de gestation, lors de transfert d'embryons décongelés, sont liés au faible stimulus lutéotrophique de l'embryon bovin congelé sur le corps jaune par rapport aux embryons frais (Chagas *et al.*, 2002). Ceci est du à

l'insuffisance de synthèse de la protéine INF $\tau$  (Trophoblastine) par l'embryon conduisant à la lutéolyse et, par conséquent, à la mort de l'embryon par défaut de progestérone (Ducos, 2002).

Un autre facteur de taille impliqué dans l'interruption de gestation après le transfert embryonnaire est celui lié aux conditions d'élevage. Ainsi, tout changement dans la ration alimentaire pourrait diminuer sensiblement le taux de gestation (Butler, 1998). Une ration riche en matière azotée (ensilage de mauvaise qualité, l'herbe jeune) augmente le taux des dérivés azotés dans le sang. Ces derniers sont responsables d'échec de gestation par : i) une acidification du milieu utérin défavorable au développement embryonnaire, ii) un effet cytotoxique sur l'embryon (Elord et Butler., 1993), iii) une augmentation de PGF $2\alpha$  suivie d'une lutéolyse (Garcia-bojalil *et al.*, 1998) et ; iv) une diminution de la sécrétion de la progestérone induisant une mortalité embryonnaire (Bulter, 1998). Durant notre étude au sein de la ferme de l'ITELv, les receveuses ont subi de multiples changements alimentaires, par manque de concentré au sein de la station. Ainsi nous avons remarqué une diminution de leur état corporel. Ces modifications affectant les receveuses pourraient plaider en faveur d'une telle absence de gestation.

En résumé, dans notre travail, les facteurs, probablement, incriminés dans l'absence ou l'interruption de gestation sont liés principalement aux receveuses. Ces dernières sont influencées par des facteurs extrinsèques, dont on cite, la nature et le changement brutal de régime alimentaire, la resynchronisation par le PRID, et enfin, l'irritation de la muqueuse vaginale par la mise en place de la spirale vaginale.

#### IV. Conclusion

Après l'injection de PGF2 $\alpha$  durant le protocole de superovulation, la race locale montre précocement les signes des chaleurs confirmant l'étude menée par l'équipe de Ferroukh *et al.*, (2008) qui ont travaillé sur la même race.

Comparativement à la PMSG, la FSHp donne de bons résultats, en termes de nombres d'ovulation et d'embryons utilisables confirmant, ainsi, les études donnant une place de choix à la FSHp comme l'hormone de la superovulation chez les bovins.

La race locale présente un tractus génital dont le cervix, souvent étroit, rend, quelques fois, difficile la collecte d'embryons produits *in vivo* par voie cervicale.

L'évaluation de la qualité d'embryons décongelés montre que la congélation lente peut affecter l'embryon mais sa qualité reste transférable.

L'absence ou l'interruption de gestation chez les receveuses après le transfert des embryons est multifactoriels. Dans notre travail, les facteurs extrinsèques semblent être les plus incriminés.

## V. Recommandations et perspectives

En Algérie, en raison du manque d'études sur le transfert et la cryoconservation d'embryons chez la race locale comme chez les races améliorées, il est indispensable de lancer d'autres projets de recherche qui traitent des biotechnologies de l'embryon, notamment, sa congélation.

Vu l'importance de la réponse ovarienne des vaches locales au traitement de superovulation (20CJ/Vache en moyenne) et la difficulté à récupérer les embryons produits *in vivo* par voie cervicale, il serait intéressant d'utiliser l'OPU (ponction écho-guidée). En effet, cette technique permet d'exploiter efficacement le patrimoine génétique de notre race bovine locale sous forme d'ovocytes. Cependant, il est nécessaire, de développer, au préalable, la production d'embryons *in vitro* comprenant les étapes de maturation, fécondation et développement embryonnaire.

Quant au manque de certains produits et de matériels de transfert et de congélation qui est dû principalement à un défaut de praticabilité de ces techniques sur le terrain, il est recommandé de soutenir financièrement, par les centres de formation (CNIAAG et ITELV), les universités, les laboratoires, les projets de recherche qui s'intéressent aux biotechnologies de la reproduction, notamment la cryoconservation d'embryons. Ce soutien doit être poursuivi jusqu'à l'exécution de ces techniques sur le terrain.

Avant de procéder à la pratique sur le terrain de ces techniques, il faut tout d'abord atteindre, au niveau expérimental, des taux de gestation, après transfert d'embryons, qui correspondent à ceux rapportés dans la littérature. De plus, des formations adéquates doivent être dispensées aux vétérinaires et aux techniciens.

La diffusion médiatique (les journées scientifiques, séminaire et les congrès), joue un rôle important car elle permet de montrer les avantages de ces techniques, conscientisant, ainsi, les éleveurs qui restent les véritables bénéficiaires des vertus des biotechnologies de l'embryon dans les élevages.

La standardisation des protocoles et la commercialisation des milieux de manipulation et de cryoconservation, prêts à l'emploi, ont rendu la technique de congélation lente plus facile. Cette facilité est d'autant plus marquée avec l'utilisation de l'éthylène glycol (cryoprotecteur) qui permet un transfert direct des embryons en évitant l'étape de son enlèvement durant la décongélation.

Dans l'optique de généraliser la congélation d'embryons à l'échelle nationale, l'adoption d'une technique permettant le transfert direct dans les élevages facilitera sa familiarisation.

Le développement et la diversification des protocoles de congélation a pour objectif de créer des banques d'embryons, en plus des banques de spermatozoïdes déjà existantes. Ceci devient nécessaire pour conserver, sous forme d'embryons congelés, les animaux d'élite et le patrimoine génétique des races locales.

# Références bibliographiques

- A** **BOU-HAILA A., TULSAINI D.R.P.** (2000). Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. *Biochemistry and Biophysics* Vol. 379, No. 173–182.
- ADAMS G.P., JAISWAL R., SINGH J., MALHI P.** (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69 , 72–80.
- ARAKAWA T., CARPENTER J.F., KITA Y.A., CROWE J.H.** (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants: an hypothesis. *Cryobiology*. 1990; 27: 401-15. Cité par **SAILLEY F.** (2008): Cryoconservation du cortex ovarien chez la chatte. Effets des paramètres physiques et chimiques au cours de la congélation. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse 07. 147 pages.
- ALLARD A.** (2004). La congélation de l'embryon équin influence des conditions d'incorporation du glycérol. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse n° 83.151 pages.
- ALLRICH R.D.** - (1994) – Symposium : Estrus, New Device, and monitoring – J. Dairy Sci.77, pages.2738 – 274.)
- AMBROSINI G., ANDRISANI A., PORCU E., REBELLATO E., REVELLI A., CASERTA D., COSMI E., MARCI R., MOSCARINI M.** (2006). Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology* 22, 250–262.
- ANDERSON A.R., WSEIKERT M.L., CRAIN J.L.** (2003): Determining the most optimal stage for embryo cryoconservation. *Reproduction biomedicine onlinen* Vol. 8 No. 2 207-211.
- ANDREWS A.H., BLOWEY R.W., BOYD H., EDDY R.G.** (2004). *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle*. Edit. Blackwell Science Ltd. 1218 pages.
- B** **AKHACH J., CASOLI V., GUIMBERTEAU J.C.** (2007). The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary results of our own experiments. *Annales de chirurgie plastique esthétique* 52, 531–547.
- BALL P.J.H., PETERS A.R.** (2004). *Reproduction in cattle*. Edit. Blackwell publishing. 242 pages.
- BARIL G., TRALDI A-L., COGNIÉ Y., LEOEUF B., BECKERS J.F., MERMILLOD P.** (2001). Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 56,299-305.
- BARRY J.F., NICK L., ERICA E.B.** (2004). *Life in the frozen state*. Edit, CRC Press USA. 673 pages.
- BAUST J.G., BAUST J.M.** (2007). *Advances in biopreservation*. CRC press Taylor & Francis Group.411 Pages.
- BAZOT M., NASSAR J., JONARD S., ROCOURT N., Robert Y.** (2004). Ovaire normal, variations physiologiques et pathologies fonctionnelles de l'ovaire. *EMC-Radiologie* 1, 647–664
- BECKERS J.** (1989). folliculogenèse et transplantation embryonnaire chez les ruminants. *Bull. Acad. Med. Bel* 144, 607-620.
- BENDELL J.J., DORINGTON J.H.** (1990). Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rate granulose cells. *Endocrinology* 127, 533-540.

- BERG D.K., VAN LEEUWEN J., BEAUMONT S., BERG M., PFEFFER P.L.** (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 73 250–260.
- BERNARD A., FULLER B.J.** (1996). Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Human Reproduction Update*, Vol. 2, No. 3. 193–207.
- BEVERS M. M., DIELEMAN S. J., VAN TOL H. T. M., BLANKENSTEIN D. M., VAN DEN BROEK J.** (1989). Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *J. Reprod. Fert.* 87, 745-754.
- BLOCK J., BONILLA L., HANSEN P.J.** (2009). Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* 71, 1063–1071.
- BLONDIN P., COENEN K., GUILBAULT L.A., SIRARD M.A.** (1997). In vitro production of bovine embryos : developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47, 1061-1075.
- BORINI A., COTICCHIO G.** (2009). *Preservation of Human Oocytes*. Edit. Informa healthcare. 299 pages.
- BRACKETT B.G.** (1983). A review of bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* Vol. 19 No. 11-15.
- BRACKETT B.G., ZUELKEA K.A.** (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of Bovine embryos. *Theriogenology* 39, 43-64.
- BRASSARD P., MARTINEAU R., TWAGIRAMUNGU H.** (1997). L'insémination à temps fixe : en fin possible. *Symposium sur les bovins laitiers CPAQ 1997* 77-92.
- BUTLER W. R.** (1998). Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle *J Dairy Sci* 81, 2533–2539 .
- C****ALDER M., RAJAMAHENDRAN R.** (1992). follicular growth, ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the estrous cycle. *Theriogenology* 38, 1163-1174.
- CALLESEN H., LIBORIUSSEN T., GREVE T.** (1996). Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science* 42, 21 215-226
- CAMPOS-CHILLÒN L.F., SUH T.K., BARCELO-FIMBRES M., SEIDEL JR.G.E., CARNEVALE E.M.** (2009). Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology* 71, 349–354.
- CAMPOS-CHILLÒN L.F., WALKER D.J., DE LA TORRE-SANCHEZ J.F., SEIDEL JR G.E.** (2006): In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 65,1200–1214.
- CANSECO R.S., GWAZDAUSKAS F.C., TOOLE R.J., RAJAMAHENDRAN R., WHITTIER W.D., VINSON W.E.** (1992). A retrospective study on the effects FSH and prostaglandin on superovulation responses in dairy cattle. *Virginia journal of science* 43, 3 325-332.
- CHAGAS E SILVA J., LOPES DA COSTA L., ROBALO SILVA J.** (2002). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology* 58, 51-59.
- CHAIKIN P. M., LUBENSKY T. C.** (1995). *Principles of condensed matter physics*. Edit. Cambridge university press. 699 pages.

**CHANG C-C., SHAPIRO D.B., BERNAL D.P., WRIGHT G., KORT H.I., NAGY Z.P.** (2008). Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification. Vol 16. No 3. 346-349 Reproductive BioMedicine Online.

**CHENAULT J.R., BOUCHER J.F., DAME K.J., MEYER J.A., WOOD-FOLLIS .** (2003). Intravaginal progesterone inserts to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cow. J. Dairy Sci., 86, 2039-2049. Cité in : caroline poll. (2007) : Mortalité embryonnaire. Ecole nationale supérieure vétérinaire de LYON, Thèse n°77, P 74.

**CHIAN RC.,QUINN P.** (2010). Fertility cryopreservation. Edit.Cambridge university press. 271 pages.

**COTICCHIO G., BONU M.A., BORINI A., FLAMIGNI C.** (2004). Oocyte cryopreservation: a biological perspective . European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 115S S2–S7.

**COURBIÈRE B., BAUDOT A., MAZOYER C., SALLE B., LORNAGE J.** (2009). La vitrification : technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne ? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 37,803–813.

**CROWE M.A.** (2008). Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows. Reprod Dom Anim 43 (Suppl. 5), 20–28.

**D** **A COSTA DA LOPES L., CHAGAS E SILVA J., ROBALO SILVA J.** (2001). Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gnadotrophins in native cattle. Theriogenology 56, 66-77.

**DALTON J. C., NADIR S., BAME J. H., NOFTSINGER M., SAACKE R. G.** (2000). The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. J Anim Sci 78, 2081-2085.

**DANIEL R., BRIGITTE V.** Elements de biologie cellulaire 3<sup>ème</sup> édition. (2004). Edit. doin Editeurs. 428 pages.

**DAY J.G., MCLELLAN M.R .** (1995). cryopreservation and freeze-drying protocols, Edit. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 250 pages.

**DESSOLLE L., DE LAROUZIÈRE V., RAVEL C., BERTHAUT I., ANTOINE J.M., MANDELBAUM J.** (2009). Congélation lente et vitrification des ovocytes humains matures et immatures. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 37, 712–719.

**DIEZ C., HEYMAN Y., LE BOURHIS D., GUYADER-JOLY C., DEGROUARD J., RENARD J.P.** (2001). Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability . Theriogenology 55, 923-936.

**DINNYÉS 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.

**D'OCCHIO M. J., JILLELLA D., LINDSEY B.R.** (1999) : Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. Theriogenology 51, 9-35.

**DOCHI O., YAMAMOTO Y., SAGA H., YOSHLBA N., KANO N., MAEDA J., MIYATA K., YAMAUCHL A., TOMINAGA K., ODA Y., NAKASHIMA T., INOHAE S.** (1998). Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. Theriogenology 49, 1051-1058.

**DOMINIQUE S.** (2001). La reproduction des animaux d'élevage. Edit. Sciences et techniques agricole, France. 217 pages.

- DONNAY I., AUQUIER PH., KAIDI S., CAROLAN C., LONERGAN P., MERMILLOD P., MASSIP A.** (1998). Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Animal Reproduction Science* **52**,93–104.
- DRIANCOURT M.A.** (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm: Animals implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* **55**, 1211-1239.
- DRION P.V., ECTORS, F.J. HANZEN C., HOUTAIN J-Y. LONERGAN P., BECKERS J-F.** (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : Ovulation, corps jaune et lutéolyse. *Le point vétérinaire*. Vol. 28, numéro spécial "Reproduction des ruminants".
- DRION P.V., BECKERS J.-F.** (1996). Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : Folliculogenèse et atresie. *Le point vétérinaire*, vol. 28, numéro spécial « Reproduction des ruminants ».
- DRION P.V., BECKERS J.F., DERKENNE F., HANZEN CH.** (2000). Le développement folliculaire chez la vache: mécanismes hormonaux au cours du cycle et du postpartum. *Annales de Médecine Vétérinaire* **144**, 385-404.
- DROST M., BRAND A., AARTS M.H.** (1976). A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology* VOL. 6 NO. 5 503-507.
- DUBEST C., PUGEAT M.** (2005). Gonadotropic pituitary hormones: physiology and functional test. *EMC-Endocrinologie* **2**, 231–240.
- Ducos A** (2002) Mortalité embryonnaire et anomalies génétiques. Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie, Paris, 30 octobre 2002, pp. 196-207.
- E****CTORS F., BECKERS J.F., ECTORS F.J., DELVAL A., TOUATI K.** (1989). Multiplication des embryons chez les bovins : Possibilités actuelles et futures. *Biotechnologie en sélection animale-IRSIA* 188-211.
- EDQVIST L-E., FORSBERG M.** (1997). *Clinical Reproductive Endocrinology. Clinical biochemistry of domestic animals*, fifth edition. Edit. Academic Press. Chapitre 22 page 589-617.
- EL-DANASOURI I., SELMAN H.** (2001). Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertility and sterility* vol. 76, no. 2, 400-402.
- ELNAHAS A., ALCOLAK E., MARAR E.A, ELNAHAS T., ELNAHAS K., PALAPELAS V., DIEDRICH K., AL-HASANI S.** (2010). Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fertility Society Journal* **15**, 2–9.
- ELORD C.CDUCTIO., BUTLER W.R.** (1993). reduction of fertility and alteration of uterin PH in heifer fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci* **71**, 694-701.
- ELSDEN R. P., NELSON L. D., SEIDEL G. E.** (1978). Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* **9**, 17-26 (Abstract).
- ELSDEN R. P., HASLER J.F.,SEIDEL J.G. E.** (1976): Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* Vol. 6 No. 5 523-532 .
- ENGLAND G.C.W.** (2005). *Fertility and obstetrics in the horse*. Edit. Blackwell publishing (third edition). 300 pages.
- ETHERINGTON W.G., KILMER B.A., JURKE J.E., MONTGOMERY M.E., WILSON D.C.** (1986). pregnancy rates related to stage of estrous cycle at prostaglandin treatment in an embryo transfer recipient herd. *Theriogenology* Vol. 25 No. 6 845-854.

**F**IELDS M.J., SAND R.S., YELICH J.V. (2002). Factors affecting calf crop: biotechnology of reproduction. Edit: CRC Press USA. 301 pages.

**FLESCH F.M.,GADELLA B.M.** (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469 197-235.

**FORDE N., BELTMAN M.E., LONERGAN P., DISKIN M., ROCHE J.F., CROWE M.A.** (2010). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal reproduction science* xxx (2010) xxx–xxx.

**FRANCIOSI F., PERAZZOLI F., LODDE V., MODINA S.C., LUCIANO A.M.** (2008). Developmental competence of gametes reconstructed by germinal vesicle transplantation from fresh and cryopreserved bovine oocytes. *Fertility and Sterility* (article in press), 1-11.

**FRICKE P.M., KIRSCH J.D., REYNOLDS L.P., REDMER D.A.** (1994). studies of FSH-p induced follicular growth in cows. *Theriogenology* 42, 43-53.

**FULLER B., PAYNTER S.** (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online* Vol 9. No 6. 680-691.

**G**ARCIA-BOJALIL C. M., STAPLES C. R., RISCO C. A., SAVIO J. D., THATCHER W. W. (1998). Protein Degradability and Calcium Salts of Long-Chain Fatty Acids in the Diets of Lactating Dairy Cows: Reproductive Responses. *J Dairy Sci* 81, 1385–1395.

**GARDNER D.K., LANE M., WATSON A.J.** (2004). *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo*. Edit, Oxford university press. 394 pages

**GARDNER D.K., WEISSMAN A., HOWLES C.M., SHOHAM Z.** (2001). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques : Laboratory and Clinical Perspectives*. Edit. Martin Dunitz Ltd UK. 761 pages.

**GARDNER D.K., WEISSMAN A., HOWLES C.M., SHOHAM Z.** (2009). *Textbook of assisted reproductive technologies laboratory and clinical perspectives, third edition* Edit. Informa Healthcare UK. 912 pages.

**GÓMEZ E., RODRÍGUEZ A., MUNÓZ M., CAAMANÓ J.N., HIDALGO C.O., MORÁN E., FACAL N., DÍEZ C.** (2008). Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69, 1013–1021.

**GONÇALVES P.B.D., GREGORY R.M.,RODRIGUES J.L.** (1987). The efficiency of two nonsurgical techniques for bovine embryo recovery on days 6 and 7 of the estrous cycle. *Theriogenology* Vol. 28 No. 1 25-32.

**GOODHAND K.L., WATT R.G., STAINES M. E., HUTCHINSON J. S. M., BROADBENT P. J.** (1999). In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. *Theriogenology* 51, 951-961.

**GORDON I.** (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos Second Edition*.: Edit. CABI publishing. 548 pages

**GUIGNOT F.** (2005). Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA, Prod. Anim*, 18 (1), 27-35.

**GUIGNOT F., BOUTTIER A., BARIL G., SALVETTI P., PIGNON P., BECKERS J.F., TOUZÉ J.L., COGNIÉ J., TRALDI A.S., COGNIÉ Y., MERMILLOD P.** (2006). Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology* 66 1004–1011.

**GUIGNOT, F.** (2003). Le point sur la cryoconservation des embryons. Dans *Biotechnologies de la Reproduction* : quoi de neuf, Association pour l'Etude de la Reproduction Animale, Maison-Alfort, France. 77-88. Cité par **ALLARD A.** (2004). La congélation de l'embryon équin influence des conditions d'incorporation du glycérol. Ecole nationale vétérinaire de Lyon. Thèse n° 83.151 pages.

**H****ANSEL W., BLAIR R.M.** (1996). Bovine corpus luteum : A historic overview and implications for future research. *Theriogenology* 45, 1267-1294.

**HANZEN CH., LOURTIE O., DRION P.V.** (2000). Le développement folliculaire chez la vache : Aspects morphologiques et cinétiques. *Annales de médecine vétérinaire* 144, 223-235.

**HAOUZI D., DE VOS J., LOUP V., ASSOU S., GASCA S., REYFTMANN L., KELEIN B., HAMMAMAH S.** (2008). Qualité ovocytaire et embryonnaire : les marqueurs apoptotiques ont-ils leur place dans le potentiel pré-implantatoire. *Génycologie obstétrique et fertilité* 36 730-742.

**HASLER J.F.** (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rate in cattle. *Theriogenology* 56, 1401-1415.

**HASLER J.F.** (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci* 79, 245-264.

**HASLER J.F., MCCAULEY A.D., SCHERMERHORN E.C., FOOTE R.H.** (1983). Superovulatory responses of holstein cows. *Theriogenology* Vol. 19 No. 1 83-99.

**HUANG J.Y., CHUNG J.T., TAN S.L., CHIAN R.C.** (2007). High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. *Reproductive BioMedicine Online* Vol 14. No 4, 464-470.

**HUMBLOT P.** (2003). Diagnostic des mortalités embryonnaires : l'intérêt des dosages hormonaux. *Bulletin des GTV*, 21, 43-47.

**HYTTEL P., FAIR T., CALLESEN H., GREVE T.** (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.

**I****NGLIS S.R., TURNER J.J., HARDING M.M.** (2006). Applications of Type I Antifreeze Proteins: Studies with Model Membranes & Cryoprotectant Properties. *Current Protein and Peptide Science*, 7, 509-522.

**INRA-UNCEIA** (1990): Blastographie. *Elev. Insem.* 235, 39 pages.

**ISACHENKO V., ALABART J.L., DATTENA M., NAWROTH F., CAPPAL P., ISACHENKO E., COCERO M.J., OLIVERA J., ROCHE A., ACCARDI C., KRIVOKHORCHENKO A., FOLCHE J.** (2003). New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 59, 1209-1218.

**K****ADER A.A., CHOI A., ORIEF Y., AGARWAL A.** (2009). Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:99 1477-7827-7-99.

**KAFI M., MCGOWAN M.R.** (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* 48,137- 157.

**KAISI M., MUKAIDA T.** (2004). cryopreservation of animal and human embryo by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* Vol 2. No 2. 164-170.

- KANITZ W., BECKER F., SCHNEIDER F., KANITZ E., LEIDING C., NOHNER H.P., PÖHLAND R.** (2002). Superovulation in cattle: Practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. 18<sup>ème</sup> colloque scientifique. Rolduc, 06-07 septembre 2002.
- KARLSSON J.M., TONER M.** (2000). Chapter 24 : Cryopreservation. Principles of Tissue Engineering Second Edition. Edit. Academic press Pages :293-307.
- KAROW A.M., CRITSER J.K.** (1997). Reproductive tissue banking : scientific principles. Edit, ACADEMIC PRESS, page 472.
- KAROW A.M.** (2001) : Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. 2001. Cité par **SAILLEY F.** (2008). Cryoconservation du cortex ovarien chez la chatte. Effets des paramètres physiques et chimiques au cours de la congélation. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse 07. 147 pages
- KARTBERG A.J., HAMBILIKI F., ARVIDSSON T., STAVREUS-EVERS A., SVALANDER P.** (2008). Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solutions without DMSO. Reproductive BioMedicine Online Vol 17. No 3. 378-384.
- KASAI M.** (1996). Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. Animal Reproduction Science 42, 67-75.
- KATAGIRI S., TAKAHASHI Y., HISHINUMA M.,KANAGAWA H., DOCHI O., TAKAKURA H.** (1991). PMSG profiles in superovulated and anti-pmsg antiserum treated mice and heifers with enzymeimmunoassay. Jpn. J. Vet. Res., 39, 11-21.
- KELLY P., DUFFY P., ROCHE J.F., BOLAND M.P.** (1997). Superovulation in cattle: effect. Of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. Animal Reproduction Science 46, 1-14
- KULESHOVA L, SHAW J, TROUNSON A.** (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology **43**,21–31 (Abstract).
- KWANG T.M., GOO J., KYUNG H.K., WON W.L., HEE J.K., JOUNG J.M., SUNG K.G., BYEONG C.L.** (2008). Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. Animal Reproduction Science 103, 239–248.
- LACERTE G.** – (30 Octobre 2003) - La détection des chaleurs et le moment de l’insémination - Symposium sur les bovins laitiers, Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec - page 13.
- LEEuw A.M.** (1992). Number and viability of embryos collected in vivo or from the excised uteri of slaughtered donor cows. Theriogenology 37:907-913.
- LEGRAND S.F.R.** (2003). Transfert embryonnaire en race charolaise en clientèle : étude des facteurs de réussite liés à la receveuse et à l’embryon. Ecole nationale vétérinaire d’ALFORT. Thèse. 120 pages.
- LEGRAND, E.** (1997). De l'importance de la capsule lors de la congélation de l'embryon de chevaux avec le glycérol. Thèse de doctorat vétérinaire, Université de Nantes, Nantes. Cité par ALLARD A. (2004): La congélation de l’embryon équin influence des conditions d’incorporation du glycérol. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse n° 83.151 pages.
- LEIBO S. P.** (1984). A One-Step Method For Direct Nonsurgical Transfer Of Frozen-Thawed Bovine Embryos. Theriogenology Vol. 21 No. 5 769-790.
- LEIBO S.P.** (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. Theriogenology 69, 37–47.

- LEROY J., SOOM A.V., OPSOMER G., GOOVAERTS I., BOLS P.** (2008). Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II. *Reprod Dom Anim* 43, 623–632.
- LEUNG P.C.K., ADASHI E.Y.** (2004). *The ovary*. Edit. ELSEVIER Academic press, second edition. 701 pages.
- LIEBERMANN J., DIETI J., VANDERZWALMEN P., TUCKER M.J.** (2003). Recent development in human oocyte, embryo and blastocyste vitrification : where are we now? *reproduction Biomedicine online* Vol7.N°06, 623.
- LINDNER G.M., WRIGHT, JR R.W.** (1983). Bovine e mbryo morphology and evaluation. *Theriogenology* VOL. 20 NO. 4 407-416.
- LORNAGE J.** (1994). Congélation et croconservation des embryons humains. Université Claude Bernard Lyon I: Lyon. 1994; 145 pp. Cité par **SAILLEY F.** (2008): Cryoconservation du cortex ovarien chez la chatte. Effets des paramètres physiques et chimiques au cours de la congélation. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse 07. 147 pages.
- M****ACMILLAN K.L., BURKEC.R.** (1996). Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency; *Animal Reproduction Science* 42, 307-320.
- MAGNUSSON V., FEITOSA W.B., GOISSIS M.D., YAMADA C., TAVARES L.M.T., ASSUMPCÃO M.E.O.D., VISINTIN J.A.** (2008). Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Animal Reproduction Science* 106, 265–273.
- MAPLETOFT R.J., STEWARD K.B., ADAMS G.P.** (1994). Superovulation in Perspective. *Theriogenology* 41, 19-24.
- MAPLETOFT R.J., HASLER J.F.** (2005). **Assisted reproductive technologies in cattle** *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24 ,1, 393-403.
- MARIE SOPHIE.** (1981). La congélation de l'embryon de souris : possibilités d'application dans la conservation à long terme de l'embryon bovins. Thèse, 124 pages.
- MARTINEZ A.G., VALCÁRCEL A., DE LAS HERAS M.A., DE MATOS D.G., FURNUS C., BROGLIATTI G.** (2002). Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Animal Reproduction Science* 73, 11–21.
- MARTINAT-BOTTÉ F., BERTHELOT F., PLATA M., MADEC F.** (2006). Cryopreservation and transfer of pig in vivo embryos: state of the art. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34, 754–759.
- MARTINEZ A.G., BROGLIATTI G.M, VALCARCEL A., DE LAS HERAS M.A.** (2002). Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field a trial. *Theriogenology* 58, 963-972.
- MARTINEZ A.G., DE MATOS D.G., FURNUS C.C., BROGLIATTI G.M.** (1998). In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 50:757-767.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO S., BARBOSA V., PÉREZ-CEREZALES S., ROBLES V., HERRÁEZ M.P.** (2009). Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* 58 128–133.
- MAZUR P.** (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970; 168: 939-49. Cité par **SAILLEY F.** (2008): Cryoconservation du cortex ovarien chez la chatte. Effets des paramètres physiques et chimiques au cours de la congélation. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse 07. 147 pages.
- MASSIP A.** (2001). Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod Dom Anim* 36, 49-55.

- MB NOSEIR WAEL.** (2003). Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 50 1-6.
- MENEZO Y.** (1982). Métabolisme et regulation des premiers stades du développement embryonnaire. Embryo transfer and in vitro fertilisation 2<sup>nd</sup> world conference. Annecy, 20, 21-22 septembre, pages 17-25.
- MENEZO Y.** (2004). Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 113S,S28–S32 .
- MERYMAN H.T.** (2007). Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47:935-945.
- MIHM M., BLEACH E.C.** (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle . *Animal Reproduction Science* 78, 217–237.
- MOOR R.M., KRUIP TH.A.M., GREEN D.** (1984). Intraovarian control folliculogenesis: limit to superovulation. *Theriogenology* Vol. 21 No. 1 103-116.
- MOUSSA M., BERSINGER I., DOLIGEZ P., GUIGNOT F., DUCHAMP G., VIDAMENT M., MERMILLOD P., BRUYAS J.-F.** (2005). In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* **64** 1619–1632.
- MUKAIDA T., TAKAHASHI K., KAISI M.** (2002). Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol 6 No 2. 221-226
- NIBART M., HUMBLLOT P.** (1997). Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology* Vol 47, N° 1, 371.
- NIEMANN H., SACHER B., ELSAESSER F.** (1985). pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryo. *Theriogenology* 23, 631-639.
- NORMAN A.W., LITWACK G.** (1997). *Hormones*. Edit. Copyrighted material (second edition). 556 pages.

**O**

**DAGESCU V.M.** (2005). Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. Université Joseph-Fourier – Grenoble. Thèse. 102 pages.

- OZIL J.-P., HEYMAN Y., RENARD J.-P.** (1979). An instrument for transcervical recovery of embryos from heifers. *Theriogenology* VOL. 11 NO. 3 173-183.

**P**

**ALASZ A. T., THUNDATHIL J., DE LA FUENTE J., MAPLETOFT R. J.** (2000). Effect of Reduced Concentrations of Glycerol and Various Macromolecules on the Cryopreservation of Mouse and Cattle Embryos. *Cryobiology* 41, 35–42.

- PALASZ A.T., MAPLETOFT R.J.** (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*, Vol. 14, No. 2, 127-149.
- PATRAT C., SERRES C.** (2009). La capacitation in vivo : influence de l'environnement féminin. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37, 536–539.
- POLGE, C., SMITH, A. U., AND PARKES, A. S.** (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 166. *Nature*, 164, 666 (Abstract).

- POLLARD J.B., LEIBO S.B.** (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41, 101-106.
- PUGH A., TROUNSON A.O., AARTS M.H., MCPHEE S.** (1980). Bovine embryo recovery by filtration of non-surgical flushing. *Theriogenology* VOL. 13 NO. 4 281-285.
- PUGH P.A., TERVIT H.R., NIEMANN H.** (2000). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science* 58, 9–22.
- R****ALL, W. F., AND FAHY, G. M.** (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, 313, 573(Abstract).
- RATHBONE M.J., KINDER J.E., FIKE K., KOJIMA F., CLOPTON D., OGLE C.R. , BUNT C.R.** (2001). Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, 277–320.
- REED B.M.** (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Edit. Springer Science+Business Media, LLC. 513 pages.
- RIOS G.L., MUCCI N.C., KAISER G.G., ALBERIO R.H.** (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 118 19–24.
- ROCHE J.F., MIHN M., DISKIN M.G., IRELAND .J.J.** (1998). A Review of Regulation of Follicle Growth in Cattle. *J Anim Sci* 76, 16-29.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H.** (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68S S138–S146.
- S****AILEY F.** (2008). *Cryoconservation du cortex ovarien chez la chatte. Effets des paramètres physiques et chimiques au cours de la congélation*. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse 07. 147 pages.
- SAUMANDE J.** (1995). La production d’embryons chez les bovins : Quelles voies de recherches pour augmenter l’efficacité de traitements de superovulation ? *INRA Prod. Anim*, 8 (4) 275-283.
- SCHERZER J., FAYRER-HOSKEN RA., RAY L., HURLEY D.J., HEUSNER G.L.** (2008). Advancements in Large Animal Embryo Transfer and Related Biotechnologies. *Reprod Dom Anim* 43, 371–376.
- SEIDEL, G.E.** (1996). Cryopreservation of equine embryos. *Reproductive Technology*. 12. 85-99. Cité par **ALLARD A.** (2004): La congélation de l’embryon équin influence des conditions d’incorporation du glycérol. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse n° 83.151 pages.
- SENDAG S., CETIN Y., ALAN M., HADELER K-G., NIEMANN H.** (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 106, 208–214.
- SLADE, N.P., TAKEDA, T., SQUIRES, E.L., ELSDEN, R.P. ET SEIDEL G.E., JR.,** 1985). A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology*. 24. 45-58. Cité par **ALLARD A.** (2004): La congélation de l’embryon équin influence des conditions d’incorporation du glycérol. Ecole nationale vétérinaire de lyon. Thèse n° 83.151 pages.
- SMITH G.D., SILVA C.E.S.** (2004). Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *reproductive Biomedicine*. Vol 9. No 2. 171-178.

- SOMMERFELD V, NIEMANN H.** (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* **38**, 95-105.
- SPICER L.J., VOGEL L.J., ALLEN D.T.** (2004). Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **227**, 1-7.
- SREENAN J.M.** (1978). Non surgical embryo transfer in the cow. *Theriogenology* Vol.9 No.1. 69-83.
- STACHECKI J., GARRIS J., SABINO S., CAETANO J.P.J., WIEMER K.E., COHEN J.** (2008). A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* Vol **17**. No 3, 360-367.
- STACHECKI J.J., COHEN J.** (2004). An overview of oocyte cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online* : Vol 9, No 2,152-163.
- SUZUKI T., YAMAMOTO M., OOE M., SAKATA A., MATSUOKA M., NISHIKATA Y., OKAMOTO K.** (1990) : effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1, 2-propanediol. *theriogenology* vol. 34 no. 6 1051-1057.

**T**

- ANABE T. Y., HANN R. C.** (1984). Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin f2 $\alpha$  influence of stage of cycle at treatment. *J Anim Sci* **58**, 805-811.
- TAYA K., KANEKO H., TAKEDOMI T., KISHI H., WATANABE G.** (1996). Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. *Animal Reproduction Science* **42**, 563-570 ;
- THIBAUT C., LEVASSEUR M.C.** (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edit. Ellipses edition Marketing S.A. 832 pages.
- THIBIER M., NIBAR M.** (1992). Transfert embryonnaire chez les bovins avec référence particulière à l'interaction embryons-agents pathogènes. *Ann Zootech* **41**, 341-346.
- THIBIER M.** (2001). The annual embryo transfer industry in figures. A report from the IETS Data Retrieval Committee. *Embryo Transfer Newslett.* **19** (4), 16-22.
- TÖPFER-PETERSEN E., PETROUNKINA A.M., EKHLASI-HUNDRIESER M.** (2000): Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science* **60-61**. 653-662.
- TUCKER M., MORTON P., LIEBERMANN J.** (2004): Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **113S** S24-S27.
- TUCKER M.J., LIEBERMANN J.** (2007). *Vitrification in Assisted Reproduction*. Edit, Informa healthcare UK Ltd. 322 pages.
- TULANDI T., GOSDEN R.G.** (2004): *Preservation of Fertility*. Edit. Taylor&Francis Group 272 pages.

**V**

- AJTA G.** (2000): Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* **60-61**. 357-364.
- VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., JACOBSEN H., GREVE T., CALLENSSEN H.** (1998): Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **51**, 53-58.
- VAJTA G., NAGY Z.P.** (2006): Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory. *Reproductive BioMedicine Online* Vol **12** No 6.779-796.

**VAN WAGTENDONK DE LEEUW A.M., DEN DAAS J.H.G., RALL W.F.** (1997). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods : vitrification and one-step dilution verses slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, **48**, 1071-1084 (Abstract).

**VANDERZWALMEN P., ZECH N., GREINDL A.J., ECTORS F., LEJEUNE B.** (2006). Cryopréservation des embryons humains par vitrification. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **34**,760–769.

**VANDERZWALMEN P., ZECH N., LEJEUNE B., WIRTLEITNER B., ZECH M., ECTORS F.** (2010). Vitrification et utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs: ceci justifie-t-il de préférer la congélation lente? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* xxx (2010)xxx–xxx.

**VARGHESE A.C., NAGY Z.P., AGARWAL A.** (2009). Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online* Vol 19. No 1. 126-140.

**VEECK L.L.** (2003). Does the developmental stage at freez impact on clinical results postthaw? *Reproduction biomedicine online* Vol 6. No 3. 367-374.

**VOELKEL S. A., HU Y. X.** (1992). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* Vol. 37 No. 1 23-37.

**VOELKEL S. A., HU Y. X.** (1992) Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed. Embryos to recipient females. *Theriogenology* 37:687-697.

**VUTYAVANICH T., SRESHTHAPUTRA O., MONGKOLCHAIPAK S., WONGTRA-NGAN S., PIROMLERTAMORN W.** (2008). Slow programmable and ultra-rapid freezing of human embryos. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 34, No. 4, 457–463.

**W**

**ALKER D.J., CAMPOS-CHILLON L.F., SEIDEL G.E.** (2006). Vitrification of In Vitro-produced Bovine Embryos by Addition of Ethylene Glycol in One-step. *Reprod Dom Anim* **41**, 467–471.

**WEEMS C.W., WEEMS Y.S., RANDEL R.D.** (2006) .Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal* 171, 206–228.

**Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P.** (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196°C and - 269°C. *Science*, 178, 411-414 (Abstract).

**Willadsen, S. M.** (1977). In: *The Freezing of Mammalian Embryos*, Ciba Foundation Symposium 52, K. Elliott, and J. Whelan, eds. p. 175. Elsevier, Amsterdam (Abstract).

**Wilmot I., Rowson L.E.A.** (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 1973, 92, 686-690 (Abstract).

**WOODS E.J., BENSON J.D., AGCA Y., CRITSER J.K.** (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* **48**,146–156.

**X**

**U Z.Z., BURTON L.J., MACMILLAN K.L.** (1997). reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronisation regimens with PGF<sub>2</sub>α and progesterone. *Theriogenology* 47, 687-701.

**YOUSSRY M;, OZMEN B., ZOHNI K., DIEDRICH K., AL-HASANI S.** (2008). Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Ontine* Vot 16 No 2. 311-320.

**Yu X.L., Deng W., Liu F.J., Li Y.H., Li X.X., Zhang Y.L., Zan L.S.** (2009). Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology* doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.004

**Z**

**HMAKIN A.I.** (2009). *Fundamentals of Cryobiology: Physical Phenomena and Mathematical Models*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 275 pages.

# Annexes

## Lexique des principaux termes utilisés pour la cryoconservation

---

<b>Congélation:</b>	C'est le changement d'état entre les phases liquides et solides d'un corps, ici l'eau.
<b>Cristallisation :</b>	Processus de changement d'état dans un milieu liquide conduisant à la formation de cristaux, par nucléation puis croissance cristalline.
<b>Cryobiologie :</b>	est la science qui étudie les évènements cellulaires qui se produisent à des Températures négatives.
<b>Dévitrication:</b>	Formation de cristaux de glace dans l'état liquide surfondu qui est obtenu au réchauffement, à partir d'un corps totalement ou partiellement amorphe.
<b>Fusion:</b>	Passage de l'état solide à l'état liquide.
<b>Recristallisation :</b>	Phénomène physique qui se manifeste au réchauffement, et au cours duquel des petits cristaux formés se regroupent pour former des cristaux de plus grosse taille.
<b>Seeding:</b>	induction de cristallisation, généralement, par une stimulation mécanique d'un milieu surfusé.
<b>Surfusion:</b>	État d'une substance qui demeure en phase liquide alors que sa température est inférieure à sa température de solidification (congélation dans le cas d'une solution aqueuse). Il apparaît lors du refroidissement d'un liquide si, par exemple, sa viscosité est très importante ou le refroidissement très rapide. C'est un état métastable, c'est-à-dire qu'une petite perturbation peut suffire pour déclencher abruptement la cristallisation.
<b>Vitrification:</b>	C'est un processus de congélation caractérisée par l'absence des cristaux de glace intra et extracellulaire, c'est l'état vitreux. Ceci est résulté d'une vitesse de refroidissement très rapide par l'immersion dans l'azote liquide, d'un milieu dont la viscosité est élevée (une concentration élevée de cryoprotecteurs), ce dernier se solidifie si rapidement que les molécules d'eau n'ont pas le temps de se réarranger en structure cristalline, ce qui induit la formation d'un état amorphe ou vitreux intra- et extracellulaire.

---

## Lieu de l'essai

Institut des techniques d'élevages ou l'ITELv est une station étatique, située dans la plaine de la Mitidja, elle se trouve dans un climat subhumide à frais, dépendant de la commune de Bir Touta –Wilaya de Blida- elle est située sur l'axe routier reliant Baba Ali à Chebli. La station est limitée à l'est par Oued El Harrache, à l'ouest par la voie ferrée Alger-Oran, au nord par la localité des Zouines et au sud par les habitations de la cité Baba Ali.

L'ITELv dispose d'une surface agricole totale de 453,79 ha dont 402,30 ha de surface agricole utile sur lesquelles 32,53 ha sont destinées à l'arboriculture et 19,26 ha aux surfaces bâties, la ferme est spécialisée en élevages monogastriques (aviculture, cuniculture et l'élevage des autruches), des ruminants et des abeilles (apiculture).

Pour cerner le problème de manque d'aliments pendant les périodes sèches ou de rupture de concentré du marché, la ferme cultive des fourrages verts (Luzerne, Bersim, Sorgho, Ray-grass et Orge) assurant ainsi un stock alimentaire sous forme d'ensilage ou de fourrage fané.

En plus des élevages et des cultures fourragères, l'ITELv est un institut de démonstration et il fait aussi des sessions de formations destinées aux éleveurs, aux techniciens, aux étudiants et même aux vétérinaires dans le cadre de la formation continue.



# LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

Docteur HADDOUM Z. Ep. YAICI

Spécialiste en Biologie Clinique

Cité BACHDJARAH 1, Bt 38, Cage 9, appt. 1 et 2, Alger

Tél./Fax : 021 26.36.09 - Agrément 8619

N°: 0154

Enregistré le : 13/02/2011

Nom : LA VACHE

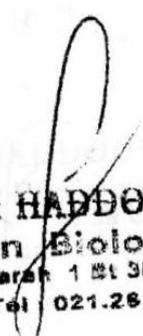
Prénom : 28032

Age : 00 ans

## Résultats d'analyses

Désignations	Résultats	Unités	Normes
<b>PROGESTERONE</b>			
PROGESTERONE .....	0,66	ng / ml	
phase folliculaire .....			0,3 - 1,1
phase luteale .....			1,1 - 21
menopause .....			< 0,3

Observations :

  
Dr YAICI HADDOUM Z.  
Medecin Biologiste  
Cité Bachdjara 1 Bt 38 Cage 09  
ALGER Tél 021.26.36.09

# LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

Docteur HADDOUM Z. Ep. YAICI

Spécialiste en Biologie Clinique  
Cité BACHDJARAH 1, Bt 38, Cage 9, appt. 1 et 2, Alger  
Tél./Fax : 021 26.36.09 - Agrément 8619

N°: 0154  
Enregistré le : 13/02/2011

Nom : LA VACHE  
Prénom : 28031  
Age : 00 ans

## Résultats d'analyses

Désignations	Résultats	Unités	Normes
<b>PROGESTERONE</b>			
PROGESTERONE .....	8.31	ng / ml	
phase folliculaire .....			0.3 - 1.1
phase luteale .....			1.1 - 21
meopause .....			< 03

Observations :

Dr YAICI HADDOUM Z.  
Medecin Biologiste  
Cité Bachdjarah 1 Bt 38 Cage 09  
ALGER Tél : 021.26.36.09

# LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

Docteur HADDOUM Z. Ep. YAICI

Spécialiste en Biologie Clinique

Cité BACHDJARAH 1, Bt 38, Cage 9, appt. 1 et 2, Alger

Tél./Fax : 021 26.36.09 - Agrément 8619

N°: 0161

Enregistré le : 26/01/2011

Nom : LA VACHE

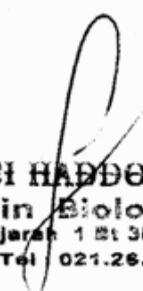
Prénom : 28-016

Age : 00 ans

## Résultats d'analyses

Désignations	Résultats	Unités	Normes
<b>PROGESTERONE</b>			
PROGESTERONE .....	14.83	ng / ml	0.3 - 1.1
phase folliculaire .....			1.1 - 21
phase luteale .....			< 03
meopause .....			

Observations :

  
Dr YAICI HADDOUM Z.  
Médecin Biologiste  
Cité Bachdjara 1 Bt 38 Cage 09  
ALGER Tel 021.26.36.09

