

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid
Ibn Badis Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité :

Génétique et reproduction animale

THEME

***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE
SUR LE TRANSFERT
EMBRYONNAIRE CHEZ
LES BOVINS***

Devant le jury

Président	Mm	BENMAHDI Faiza	Université de Mostaganem
Encadreur	Pr	FASSIH Aicha	Université de Mostaganem
Examineur	Mm	HENNI Nassiba	Université de Mostaganem

Année universitaire : 2020-2021

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragements.

A mes frères..

A ma chère sœur

A mes amies et mes camarades

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Remerciement :

A madame FASSIH

Merci Pour avoir accepté d'encadrer ma thèse et m'avoir guidé tout au long de sa rédaction,

Pour votre disponibilité et votre patience, que vos conseils précis et avisés soient récompensés dans l'aboutissement de ce travail,

Sincères remerciement.

A ma famille :Ceux qui sont à mes côtés toujours, et ceux qui le seront toujours dans mon cœur, merci Pour le soutien inconditionnel et l'amour qu'ils m'ont apportés.

A tous ceux qui ont traversé ma vie pour plus ou moins longtemps mais qui ont contribué à faire de moi ce que je suis et qui continueront à me faire avancer

RESUME :

Le transfert embryonnaire ou transplantation embryonnaire, consiste à collecter sur une femelle vivante, nommée « donneuse », des embryons qui seront ensuite transférés à des femelles receveuses. Les principaux objectifs du transfert embryonnaire sont une meilleure utilisation des femelles à fort potentiel génétique, et une diffusion simplifiée de cette génétique. De plus, la diffusion génétique permise par cette méthode est la plus sécuritaire au niveau sanitaire, ce qui constitue un avantage indéniable.

Actuellement, le transfert embryonnaire dans l'espèce bovine peut être pratiqué aussi bien en station qu'en élevage. Grâce à la technique de transfert dite « cervicale », les praticiens s'affranchissent en effet de toute intervention invasive.

Dans le cadre d'un transfert embryonnaire, donneuses et receveuses doivent être synchronisées dans un premier temps. Puis, un traitement de super ovulation est débuté sur les donneuses, avant qu'une insémination artificielle ne soit réalisée. Les embryons sont collectés sept jours plus tard, puis sont évalués avant d'être lavés. Les embryons peuvent être transférés à l'état frais, c'est-à-dire le jour même de la collecte, lorsque des receveuses sont prêtes, sinon ils peuvent être congelés puis conservés dans de l'azote liquide à -196°C.

L'IETS (International Embryon Transfer Society) donne les consignes à respecter afin de garantir la sécurité sanitaire du transfert. Associée à la facilité de transport d'embryons congelés, cette sécurité permet d'obtenir une diffusion génétique à grande échelle.

ABSTRACT :

Embryo transfer or embryo transplantation consists of collecting embryos from a living female, called a "donor", which will then be transferred to recipient females. The main objectives of embryo transfer are better use of females with high genetic potential, and simplified dissemination of this genetics. In addition, the genetic dissemination allowed by this method is the safest in terms of health, which is an undeniable advantage.

Currently, embryo transfer in the bovine species can be carried out both on-station and in breeding. Thanks to the so-called "cervical" transfer technique, practitioners are in fact free from any invasive intervention.

In an embryo transfer, donors and recipients must first be synchronized. Then, superovulation treatment is started on the donors, before artificial insemination is performed. The embryos are collected seven days later, then evaluated before being washed. Embryos can be transferred fresh, that is, the same day of collection, when recipients are ready, otherwise they can be frozen and then stored in liquid nitrogen at -196 ° C.

The IETS (International Embryo Transfer Society) gives the instructions to be followed in order to guarantee the health security of the transfer. Combined with the ease of transporting frozen embryos, this security allows for large-scale genetic dissemination.

TABLE DES MATIERES

<u>Table des figures</u>	09
<u>Table des tableaux</u>	10
<u>Liste des abreviations</u>	11
<u>Introduction</u>	15
<u>I) Aspects généraux du transfert embryonnaire bovin</u>	18
A) Transplantation embryonnaire et amélioration génétique du troupeau.....	18
B) Diffusion génétique permise par le transfert embryonnaire	19
C) Les défenses immunitaires du veau corrélées à son environnement.....	19
D) Le transfert embryonnaire et autres biotechnologies de reproduction	20
E) Activité de transfert embryonnaire en France	21
1) <u>Qui pratique le transfert embryonnaire en France ?</u>	21
2) <u>Activité en France</u>	21
<u>II) Rappels anatomiques et physiologiques</u>	22
A) Anatomie	22
1) <u>Les ovaires</u>	23
(a) Position des ovaires	23
(b) Structures internes	23
(c) Moyens de fixité.....	25
2) <u>Oviductes ou trompes utérines</u>	25
3) <u>Utérus</u>	26
B) Physiologie	27
1) <u>Le fonctionnement ovarien</u>	28

(a)	Différents stades de follicules	29
(b)	La folliculogenèse	30
(c)	L'ovulation	31
(d)	Le corps jaune	31
(e)	Une activité cyclique	32
(i)	<i>Phase lutéale</i>	33
(ii)	<i>Phase folliculaire</i>	33
2)	<u>Contrôle hormonal</u>	34
(a)	Les différentes hormones	34
(i)	<i>Les hormones hypothalamo-hypophysaires</i>	34
-	FSH.....	34
-	LH.....	34
-	GnRH.....	34
(ii)	<i>Les hormones stéroïdiennes</i>	35
-	<i>Œstrogènes</i>	35
-	<i>Progestérone</i>	35
(iii)	<i>Les prostaglandines</i>	35
(b)	Les régulations hormonales dans le cycle	36
(i)	<i>Lors de la phase lutéale</i>	36
(ii)	<i>Lors de la phase folliculaire</i>	38
3)	<u>Fécondation et développement embryonnaire précoce</u>	39
III)	<u>Les protocoles hormonaux nécessaires au transfert embryonnaire</u>	39
A)	Synchronisation des donneuses et des receveuses	40
1)	<u>Les protocoles de synchronisation standards</u>	41
(a)	Les traitements à base d'œstradiol	41
(b)	Les protocoles à base de GnRH	41
(c)	Les protocoles à base de progestérone	42
B)	Superovulation de la femelle donneuse	42
1)	<u>Quand mettre en place un protocole de superovulation</u>	43
2)	<u>Les protocoles de superovulation</u>	43
(a)	Utilisation de l'« equine Chorionic Gonadotropin » (eCG)	43
(b)	Utilisation de la « Follicle Stimulating Hormone » (FSH)	44
(i)	<i>Le protocole standard</i>	44

(ii)	<i>Les alternatives possibles au protocole standard</i>	44
–	<i>Une administration quotidienne de FSH</i>	44
–	<i>L'utilisation d'une solution de FSH pure</i>	44
–	<i>Une diminution de la fréquence d'administration de FSH</i>	45
3)	<u>Les protocoles d'optimisation à la superovulation</u>	45
(a)	Utilisation de progestérone.....	45
(b)	Utilisation de FSH.....	46
(c)	Utilisation d'eCG	46
(d)	Ablation manuelle des follicules	47
4)	<u>Variabilité des réponses des donneuses à la superovulation</u>	47
C)	Un exemple de protocole utilisé en pratique	48
1)	<u>Première étape : synchronisation des cycles sexuels</u>	48
2)	<u>Seconde étape : la superstimulation de la femelle donneuse</u>	50
IV)	<u>Transfert Embryonnaire : Production d'embryons <i>in vivo</i></u>	51
A)	Sélection des donneuses	51
1)	<u>Effets de l'âge</u>	51
(a)	Primipare ou multipare	51
(b)	Age de la multipare	52
2)	<u>Répétabilité des collectes</u>	52
3)	<u>Existe-t-il un effet famille ?</u>	53
4)	<u>Cas des femelles ayant présenté des doubles ovulations</u>	53
B)	Sélection des receveuses	53
C)	Une conduite d'élevage particulière ?	53
1)	<u>Contrôle de l'aptitude des femelles à réaliser un transfert embryonnaire</u>	54
(a)	Chez les femelles donneuses	54
(i)	<i>Contrôle du statut énergétique</i>	55
–	<i>La note d'état corporel</i>	55
–	<i>Acides gras non estérifiés et β-hydroxybutyrate</i>	55
–	<i>Glycémie et insulïnémie</i>	56
–	<i>Taux de matière utile</i>	56
–	<i>Cholestérolémie</i>	57
(ii)	<i>Contrôle de l'azotémie</i>	58
(b)	Note d'état corporel et statut nutritionnel des femelles receveuses	59

2)	<u>Effets du stress</u>	57
3)	<u>Absence de traitement</u>	58
4)	<u>Une saison plus propice ?</u>	58
D)	L'insémination de la femelle donneuse	58
1)	<u>Quand pratiquer l'insémination ?</u>	58
2)	<u>Cas de l'insémination artificielle avec une semence sexée</u>	59
E)	Collecte des embryons	59
1)	<u>Récupération des embryons</u>	59
(a)	Collecte des embryons par lavage des cornes utérines.....	59
(b)	Utilisation de molécules utérotoniques associées à un second lavage utérin.....	62
(c)	Utilisation d'un second lavage utérin.....	63
(d)	Influence de la durée des différentes étapes d'une collecte sur la réussite de la transplantation embryonnaire.....	63
2)	<u>Sélection des embryons viables : critères IETS</u>	64
3)	<u>Les bains</u>	67
4)	<u>Sexage possible des embryons viables</u>	68
F)	Le transfert d'embryons frais	69
G)	La congélation des embryons	70
1)	<u>Notion de cryoprotecteur</u>	71
2)	<u>La décongélation des embryons congelés</u>	72
3)	<u>A propos des embryons sexés</u>	73
4)	<u>Une potentielle alternative : la vitrification</u>	73
H)	Les suites sur la femelle donneuse	74
I)	Les suites sur les receveuses	74
<u>V)</u>	<u>Risques sanitaires</u>	75
A)	L'embryon : une entité propre	79
B)	Les types de risque	79
C)	Les agents pathogènes à risque	81
1)	<u>Recommandations actuelles (Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties, 2015)</u>	81
(a)	Catégorie 1.....	81
(b)	Catégorie 2.....	82
(c)	Catégorie 3.....	82

(d) Catégorie 4	83
2) <u>Risques liés à la semence</u>	83
(a) Quels risques ?	83
(b) Mesures préventives	84
3) <u>Risques liés à la femelle donneuse</u>	84
(a) Quels risques ?	84
(b) Mesures préventives	85
4) <u>Risques liés à la collecte et au stockage des embryons</u>	86
(a) Quels risques ?	86
(b) Conditions applicables à la collecte et au stockage des embryons.....	86
(c) Conditions applicables au stockage et au transport des embryons.....	87
(d) Gestion de la contamination bactérienne des conteneurs d'azote liquide	87
D) La prophylaxie sanitaire du transfert embryonnaire.....	88
1) <u>La phase <i>in vitro</i>, point clé de la sécurité sanitaire</u>	89
2) <u>Le traitement à base de trypsine</u>	91
E) Le concept de l'agrément officiel des équipes de transfert embryonnaire.....	91
F) Les conditions concernant le laboratoire de manipulation.....	92
G) Démonstration de la sécurité sanitaire	92
Conclusion	95
Bibliographie.....	96

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les principales biotechnologies de l'embryon (d'après INRA 1998)	22
Figure 2 : Le tractus génital femelle (S. SAWAYA, 2011)	26
Figure 3 : Coupe transversale schématisée d'un ovaire de vache (S. SAWAYA, 2011).....	28
Figure 4 : Vue latérale d'un ovaire et d'une trompe utérine de vache (S. SAWAYA, 2011, d'après E. CHATELAIN)	29
Figure 5 : Suspension de l'utérus par le ligament large (S. SAWAYA, 2011)	30
Figure 6 : Conformation externe d'un utérus de vache (S. SAWAYA, 2011)	31
Figure 7 : Schéma des différents stades folliculaires de l'ovaire chez la vache (d'après H E. KONIG et H.G. LIEBICH, 2004)	33
Figure 8 : Corps jaune sur un ovaire de vache (S. SAWAYA, 2011, d'après R. BARONE)...	35
Figure 9 : Chronologie d'un cycle sexuel chez la femelle	36
Figure 10 : Actions hormonales lors de la phase lutéale	40
Figure 11 : Les vagues folliculaires chez la vache et leur contrôle hormonal (Guide de la fertilité bovine, CEVA).....	41
Figure 12 : Actions hormonales lors de la phase folliculaire	42
Figure 13 : Protocole hormonal sur la femelle donneuse	53
Figure 14 : Protocole hormonal sur la femelle receveuse	54
Figure 15 : Protocole de superovulation sur la femelle donneuse.....	54
Figure 16 : Système d'aspiration et d'injection du liquide de collecte (photo de S. DUBOIS)	68
Figure 17 : Sonde 3 voies en place sur l'animal (photo de S. DUBOIS).....	69
Figure 18 : Filtre récupérant les embryons lors du passage du liquide de collecte (photo de S. DUBOIS).....	70
Figure 19 : Système numérique de classification des étapes du développement embryonnaire	73
Figure 20 : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 1	74
Figure 21 : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 2	74
Figure 22 : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 3	74
Figure 23 : Les différents risques sanitaires	84
Figure 24 : Système de pipettes jetables de 20 µL	93
Figure 25 : Les bains de lavage des embryons	94

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Données d'activités de transfert embryonnaire <i>in vivo</i> en France de 2000 à 2015 (d'après les colloques de l'AETE).....	25
Tableau 2 : Comparaison des productions d'embryons entre les génisses ayant reçu de la PMSG (= eCG) et les génisses n'en ayant pas reçu.	50
Tableau 3 : Quelques présentations commerciales hormonales	52
Tableau 4 : Nombres moyens d'embryons (totaux et viables) selon le TP et l'intervalle vêlage-collecte des embryons (MANCIAUX L. et al., 2003).....	61
Tableau 5 : Résultats des collectes d'embryons selon le taux d'urée dans le lait, avec deux régimes différents (KOMMISRUDE. et al., 2002)	62
Tableau 6 : Comparaison de la progestéronémie, de la qualité des corps jaunes et du nombre d'embryons sélectionnés pour un transfert entre le groupe des génisses ayant reçu du propylène glycol (Propylen glycol) et le groupe des génisses n'en ayant pas reçu (Untreated) au jour 7 après la détection des chaleurs.	64
Tableau 7 : Comparaison de la progestéronémie, de la qualité des corps jaunes au jour 7 après le début des chaleurs, et des taux de gestation au jour 60 après le transfert d'un embryon congelé, entre le groupe des génisses ayant reçu du propylène glycol (Propylen glycol) et le groupe des génisses n'en ayant pas reçu (Untreated).....	64
Tableau 8 : Résultats des taux de récupération des embryons après un ou deux lavages de récupération	71

LISTE DES ABREVIATIONS

- °C : degré Celsius
- **μL** : microlitre
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **AINS** : Antiinflammatoire Non Stéroïdien
- **BHV** : Bovine Herpes Virus
- **BSA** : Bovine Serum Albumin
- **BVD** : Bovine Viral Diarrhea
- **DPBS** : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
- **eCG** : equine Chorionic Gonadotropin
- **ESB** : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- **FCO** : Fièvre Catarrhale Ovine
- **FIV** : Fécondation *In Vitro*
- **FSH** : Follicle Stimulating Hormone
- **g** : grammes
- **GnRH** : Gonadotropin Releasing Hormone
- **IA** : Insémination Artificielle
- **IBR** : Infectious Bovine Rhinotracheitis
- **IETS** : International Embryo Transfer Society
- **IGF-1** : Insulin-like Growth Factor 1
- **INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique
- **J** : Jour
- **JOCE** : Journal Officiel des Communautés Européennes
- **LH** : Luteinizing Hormone
- **M** : Molaire
- **mg** : milligrammes
- **mL** : millilitres
- **NEC** : Note d'Etat Corporelle
- **OPU** : Ovum Pick Up
- **PBS** : Phosphate Buffered Saline
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PGF_{2α}** : Prostaglandin F 2 alpha
- **PMSG** : Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin
- **SAM** : Sélection Assistée par Marqueurs
- **SO** : Superovulation
- **TE** : Transfert Embryonnaire
- **UFC** : Unité Formant Colonie
- **UI** : Unité Internationale
- **UNCEIA** : Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale
- **ZP** : Zone Pellucide

***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE TRANSFERT
EMBRYONNAIRE CHEZ
LES BOVINS***

Chapitre I

Partie bibliographique

Introduction

Introduction

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

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

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

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

Le transfert embryonnaire est aussi utilisé aujourd'hui dans les schémas de sélection, ce qui donne la possibilité d'augmenter et d'accélérer la diffusion génétique des meilleures femelles, au même titre que l'insémination artificielle permet d'accélérer la diffusion génétique des meilleurs taureaux répondant à certains critères. Le transfert embryonnaire a été utilisé pour la première fois dans les schémas de sélection au début des années 1980. C'est à cette période qu'ont été développés de nouveaux protocoles pour la congélation des embryons produits *in vivo*, ainsi que la mise au point de méthodes de sexage des embryons. Ces protocoles ont

grandement contribué à l'essor du transfert embryonnaire dans l'espèce bovine, et ont étoffé l'offre de service (PONSART C. et al., 2006).

L'objectif de ce travail est dans un premier temps de présenter les objectifs du transfert embryonnaire bovin ainsi que son utilisation en France. Dans un second temps, des rappels sur le développement embryonnaire précoce bovin et sur le cycle sexuel chez la vache seront présentés. Ensuite, les différents protocoles hormonaux nécessaires à la mise en place d'un transfert embryonnaire seront présentés. Cette partie de l'exposé sera agrémenté d'une expérience personnelle avec des vétérinaires exerçant le transfert embryonnaire dans l'Ouest de la France. La partie suivante présentera comment sélectionner des femelles donneuses et receveuses, les conduites d'élevage pour optimiser le transfert embryonnaire puis les différentes étapes d'un schéma de transfert embryonnaire. Pour terminer, l'évaluation des risques sanitaires de cette biotechnologie de la reproduction sera exposée.

D) Aspects généraux du transfert embryonnaire bovin

Au début des années 1980, alors que l'insémination artificielle (IA) terminait son intégration aux programmes de sélection, le transfert embryonnaire (TE) n'atteignait pas ce niveau d'utilisation malgré les progrès réalisés. C'est pourquoi les chercheurs proposaient déjà divers intérêts au TE au moins à moyen terme (MENISSIER F., 1983). En effet, cette technique peut :

- Contribuer à la diffusion du matériel génétique.
- Etre un outil des programmes collectifs de sélection.
- Permettre une utilisation optimale du matériel génétique femelle.

A) Transplantation embryonnaire et amélioration génétique du troupeau

Au sein d'un troupeau, la sélection consiste à identifier et à trier les individus capables d'améliorer la valeur génétique de ce dernier. Il en est de même au sein d'une race. Dans un schéma classique de conduite de troupeau, la capacité de reproduction des femelles, qui est d'environ 4 à 5 veaux par vache durant leur carrière, limite le progrès génétique. Le TE permet une utilisation plus intense des femelles avec un fort potentiel génétique par la multiplication de leur descendance, car la vache peut ainsi produire plus de 100 veaux durant sa carrière (PINARD P., 1981).

Ainsi, différentes filières ont été améliorées dans le temps grâce au TE :

- Sélection des femelles d'élite grâce aux performances de leur descendance.
- Sélection des femelles de remplacement du troupeau.
- Sélection des mères à taureaux.
- Augmentation du nombre de descendants (filles et fils) de mères à taureaux.

Le coût du TE est plus élevé que le coût de l'IA, c'est pourquoi ces opérations sont réservées essentiellement à des animaux de grande valeur génétique et notamment aux mères à taureaux et aux futures mères à taureaux. En effet, le TE permet d'obtenir avec une grande probabilité un mâle par opération de collecte et par transfert, d'avoir plus de descendants des meilleures femelles et de créer des noyaux de sélection de haut niveau génétique qui fourniront les futurs taureaux. De plus, pour certains éleveurs sélectionneurs, le TE permet de mieux valoriser le capital génétique de leurs animaux en vendant des embryons (MALAFOSSE A., 1997).

A l'échelle d'un continent tel que l'Europe, il a été reconnu, très tôt, que le TE était l'outil de choix dans la gestion de la génétique en permettant la naissance de mâles avec une forte valeur génétique. Ces mâles à fort potentiel génétique peuvent être utilisés comme pères à taureaux. Ainsi les meilleurs taureaux peuvent être utilisés sur les meilleures femelles en protocole de TE afin d'augmenter la progéniture des meilleurs croisements. Ceci est surtout vrai pour le troupeau laitier en Europe. Entre 1989 et 2005, le transfert d'embryons de très hautes valeurs génétiques est devenu le cœur de tous les programmes génétiques et ceci explique également pourquoi en Europe beaucoup d'équipes de TE sont en lien avec les centres d'IA ou avec les compagnies en charge de conduire le développement des programmes génétiques (THIBIER M., 2014).

B) Diffusion génétique permise par le transfert embryonnaire

Le TE est un excellent moyen de multiplication et de diffusion rapides d'un matériel génétique rare (MENISSIER F., 1983). Ceci est encore plus vrai aujourd'hui avec la possibilité de congélation des embryons qui facilite grandement leur transport. En effet, il est moins contraignant et plus rapide de transporter des embryons conditionnés dans des paillettes au sein de conteneurs d'azote liquide, plutôt que de transporter des animaux sur pieds. De plus, il est apparu que le TE est le moyen le plus sûr au plan sanitaire (THIBIER M. et GUERIN B., 1993). C'est pourquoi il peut être utilisé aisément pour l'exportation et l'importation de matériel génétique à condition de respecter certaines règles. Ainsi, il est possible d'importer des embryons de pays éloignés en réduisant considérablement les coûts de transport que l'on aurait eu en important des reproducteurs sur pieds. Cela permet également de s'affranchir de contraintes sanitaires comme l'interdiction d'importer des reproducteurs de certains pays, par exemple des Etats-Unis vers l'Europe (MALAFOSSE A., 1997).

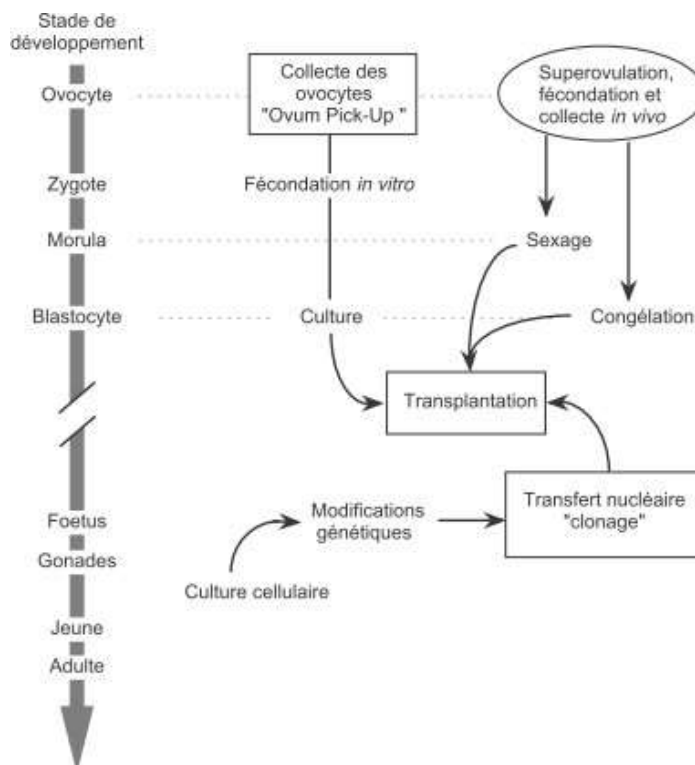
C) Les défenses immunitaires du veau corrélées à son environnement

Le TE a aussi été utilisé pour la multiplication d'une race donnée à distance, dans un nouvel environnement. Cette utilisation a été aidée par des risques sanitaires minimes concernant le transport des embryons (PASQUIER P., 1988). Lors de vente d'animaux vivants,

leur arrivée dans un nouvel environnement aboutit, en général, à l'apparition de maladies car leurs défenses immunitaires ne sont pas en phase avec le microbisme local. C'est pourquoi des embryons implantés dans des femelles receveuses déjà présentes dans l'exploitation donneront des veaux mieux adaptés à cet environnement grâce à l'apport des anticorps maternels via la prise colostrale (SERRE M., 1999).

D) Le transfert embryonnaire et autres biotechnologies de reproduction

Les interventions sur les embryons bovins comme pour les autres mammifères se font durant la période précédant leur sortie de la zone pellucide, soit pendant 9 à 10 jours après la fécondation chez la vache. Ainsi, différentes biotechnologies de l'embryon bovin ont été développées (Figure 1). Ces techniques se sont développées autour de trois technologies principales qui sont : la transplantation embryonnaire, associant la production et la collecte d'embryons *in vivo* et intégrant maintenant le plus souvent les possibilités offertes par leur congélation ou leur sexage par micromanipulation ; le prélèvement *in vivo* d'ovocytes par ponction folliculaire (OPU) suivi de leur maturation, leur fécondation *in vitro* (FIV) puis la culture des embryons ; enfin le clonage qui ouvre la voie à la multiplication de génotypes identiques (COLLEAU J. J. et al., 1998).



INRA Productions Animales, janvier 1998

Figure 1 : Les principales biotechnologies de l'embryon (d'après INRA 1998)

E) Activité de transfert embryonnaire en France

1) Qui pratique le transfert embryonnaire en France ?

En France, ce sont surtout des équipes travaillant pour les centres d'insémination qui pratiquent le TE. Par exemple, plusieurs sociétés proposent ce service, telles que France EMBRYON, EVOLUTION, UMOTEST, MIDATEST ou encore ELIACOOP.

Très peu de vétérinaires pratiquent le TE, car c'est une activité chronophage qui demande une demi-journée voire une journée complète pour un chantier. Néanmoins, quelques équipes existent. Dans l'Ouest de la France, la Société Civile Professionnelle ESCOUFLAIRE-POL-ETIMOFF (aussi appelée EmbryoVet), est ainsi composée de quatre vétérinaires spécialisés dans le transfert embryonnaire bovin ainsi que dans le suivi de reproduction. Ce sont des vétérinaires particuliers car ils ne pratiquent aucune médecine ou chirurgie, et leur clientèle s'étend sur tout l'Ouest de la France, du Nord de la Bretagne jusqu'au Nord de Bordeaux. Ils ont une clientèle composée en grande partie d'éleveurs de vaches Prim'Holstein mais aussi de Blondes d'Aquitaine, très peu de Charolaises.

2) Activité en France

En France, le TE débute avant les années 1980 avec quelques centaines de transferts qui sont réalisés essentiellement en station. Les généticiens voient rapidement dans cette technique un outil très intéressant pour la diffusion du matériel génétique, l'augmentation des performances au niveau de troupeaux individuels et comme un vecteur d'augmentation du progrès génétique dans les schémas de sélection. D'ailleurs, à ses débuts, elle était considérée comme une technique d'appoint dans ces schémas. Mais elle s'est progressivement imposée par rapport à l'insémination artificielle classique, au moins dans tous les pays et pour les races pour lesquelles des programmes de sélection importants sont conduits. En France, plus de 80% des taureaux entrant en station de testage sont issus de TE (PONSART C. et al., 2006).

Le plus fort développement du TE en France est connu entre 1985 et 1990, grâce à la technique d'implantation de l'embryon dite « cervicale », avec un pic à 35 000 embryons transférés en 1990. Bien que le TE connaisse un développement dans d'autres pays européens, la France reste le leader du continent dans ce domaine. En 1992 et 1993, le TE connaît une forte baisse d'activité dans tous les pays européens, expliquée par le renforcement du dispositif de maîtrise de la production laitière adopté en 1992. Après une reprise de l'activité à partir de 1994, une nouvelle baisse est observée après 2000 (moins 30% entre 1999 et 2002), cette fois-ci due aux crises de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et de la fièvre aphteuse. Depuis 2002, l'activité est stable avec néanmoins une diminution annuelle de 3% enregistrée entre 2003 et 2005 (PONSART C. et al., 2006).

Au sein de l'Europe, la France est le premier pays en nombre de TE effectués et d'embryons produits *in vivo*, devant l'Allemagne, l'Italie et les Pays-Bas. Sur les 15 dernières années, le nombre d'embryons récoltés est stable en France ainsi que le pourcentage d'embryons viables (et donc transférables dans une receveuse). On remarque que le nombre d'embryons congelés implantés augmente au fil des années proportionnellement au nombre d'embryons frais implantés (Tableau 1).

Année	Nombre de donneuses	Nombre d'embryons collectés	Nombre d'embryons viables	Implantations d'embryons frais	Implantations d'embryons congelés	Nombre de veaux nés de TE
2000	6716	62538	36263 (58%)	17836	15647	4053
2001	6880	62840	37071 (59%)	17786	15136	3546 (pour 6008 Transferts)
2002	6797	66031	37725 (57,1%)	17562	15158	X
2003	5665	64925	37433 (57,6%)	18415	15076	5122
2004	5520	53421	30841 (57,7%)	14518	14896	3883 (pour 7142 transferts)
2005	5988	55253	31452 (56,9%)	15007	13460	8162
2006	5915	56607	32899 (58,1%)	14938	13504	6740
2007	5753	54733	31282 (57,2%)	21033	12654	2480
2008	5856	55356	31841 (57,5%)	13539	13765	3877
2009	6030	52827	30442 (57,7%)	14747	14471	15000
2010	5714	50680	29585 (58,3%)	14252	14592	15620
2011	6414	56044	32985 (58,8%)	14778	15416	*
2012	5665	50660	29966 (59,1%)	14669	14563	*
2013	7205	68426	38244 (55,9%)	17833	16684	*
2014	6859	66403	37811 (56,9%)	18657	18300	*

*Données indisponibles

*Tableau 1 : Données d'activités de transfert embryonnaire in vivo en France de 2000 à 2015
(d'après les colloques de l'AETE)*

II) Rappels anatomiques et physiologiques

A) Anatomie

Le rôle de l'appareil reproducteur femelle est plus complexe que celui du mâle car il ne se limite pas à la production de gamètes femelles et à leur cheminement (MONTMEAS L., 2013). En effet, c'est dans le tractus génital femelle qu'ont lieu :

- Le dépôt du sperme.
- La rencontre entre les gamètes mâles et femelles aboutissant à la fécondation.
- Le développement de l'œuf obtenu pour donner un nouvel être vivant.

Chez la femelle, cet appareil comprend (Figure 2) :

- Deux ovaires ayant une double fonction, l'élaboration des gamètes et la synthèse d'hormones femelles.
- Des voies génitales : l'oviducte, lieu de la fécondation ; l'utérus, l'organe de la gestation et, le vagin et la vulve, les organes d'accouplement.

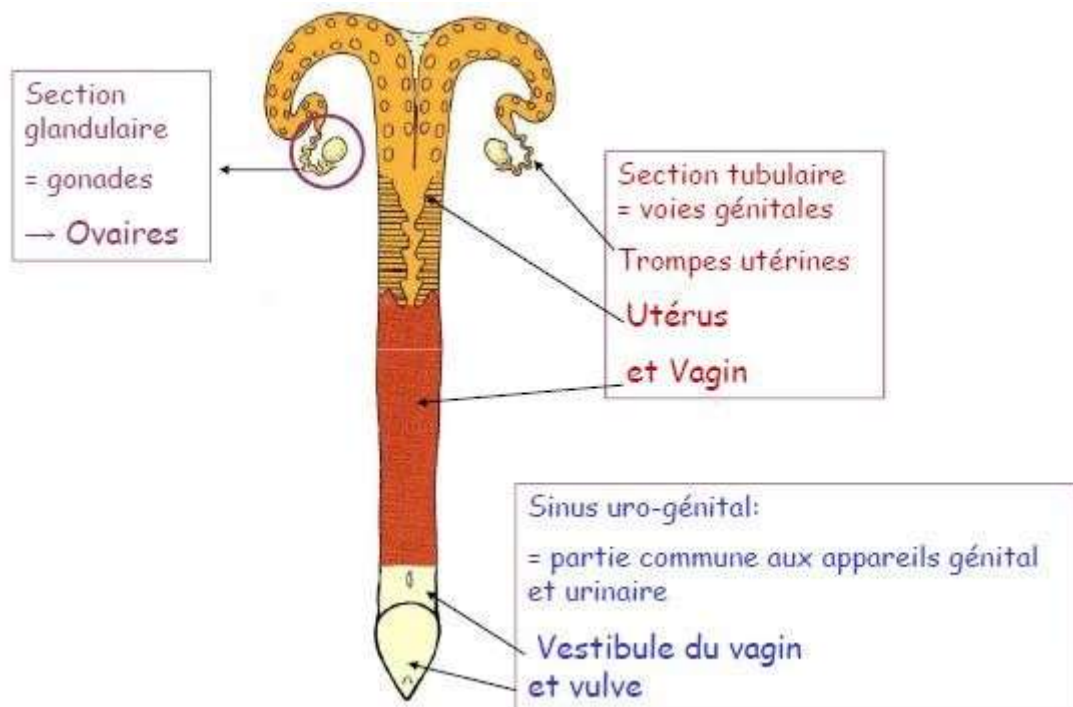


Figure 2 : Le tractus génital femelle (S. SAWAYA, 2011)

1) Les ovaires

(a) Position des ovaires

Les deux ovaires sont situés dans la cavité abdominale, à l'arrière immédiat des reins chez les ruminants. De forme ovoïde et aplatie d'un côté à l'autre (comme une amande), les ovaires sont plus petits et moins lourds que les testicules. Chaque ovaire est appendu au ligament large qui, à son niveau, se dédouble pour former une bourse ovarique (MONTMEAS L., 2013). En règle générale, l'ovaire droit est de deux à trois grammes plus lourd que l'ovaire gauche et la maturation folliculaire y est statistiquement plus fréquente. En moyenne la longueur est de 35-40 mm, la hauteur de 20-25 mm et l'épaisseur de 15-20 mm, pour un poids moyen de 10-20 grammes (BARONE R., 1978).

Le développement des cornes utérines et leur conformation particulière ramènent les ovaires très près de l'entrée du bassin. Autrement dit, ils sont à environ 40 cm du périnée, 30 cm du plafond de la cavité abdomino-pelvienne et 10-12 cm du plan médian à hauteur de la deuxième vertèbre sacrale non loin du bord du pubis. C'est pourquoi la palpation et l'échographie transrectale des ovaires sont plutôt aisées avec un peu d'entraînement.

L'ovaire gauche est en rapport avec le cul-de-sac dorsal du rumen et l'ovaire droit avec l'apex du cæcum et le jéjunum.

(b) Structures internes

La surface de l'ovaire est bosselée par les follicules et les corps jaunes. L'ovaire est revêtu d'un épithélium superficiel qui est doublé à sa face profonde par une densification du stroma qualifiée d'albuginée. Le stroma est un tissu conjonctif dans lequel on reconnaît deux couches :

- La médulla (centrale), ou zone vasculaire, qui s'étend depuis le hile au centre de l'ovaire et qui contient les vaisseaux et les nerfs
- Le cortex (périphérique), ou zone parenchymateuse, qui contient les organites ovariens tels que les follicules et les formations dérivées.

(c) Moyens de fixité

Chaque ovaire est suspendu à la voûte lombaire par son mésovarium dont le bord crânial est différencié en ligament suspenseur. L'extrémité caudale de l'ovaire est reliée au ligament large par le ligament propre de l'ovaire, et l'extrémité crâniale au pavillon de la trompe utérine

par le ligament tubo-ovarique. Le bord mésovarique de l'ovaire (attache du mésovarium), qui est donc dorsal, connaît une dépression appelée hile où pénètrent les vaisseaux et les nerfs.

La trompe utérine passe latéralement à l'ovaire portée par le mésosalpinx qui est issu du mésovarium. Ainsi, le mésovarium est divisé en deux portions : le mésovarium proximal (dorsalement à l'insertion du mésosalpinx) et le mésovarium distal (ventralement à l'insertion du mésosalpinx). Le mésovarium distal et le mésosalpinx déterminent alors une poche ouverte, la bourse ovarique dans laquelle se place l'ovaire (Figure 3).

L'ensemble constitue le ligament large qui porte tout le tractus génital (BARONE R., 2001).

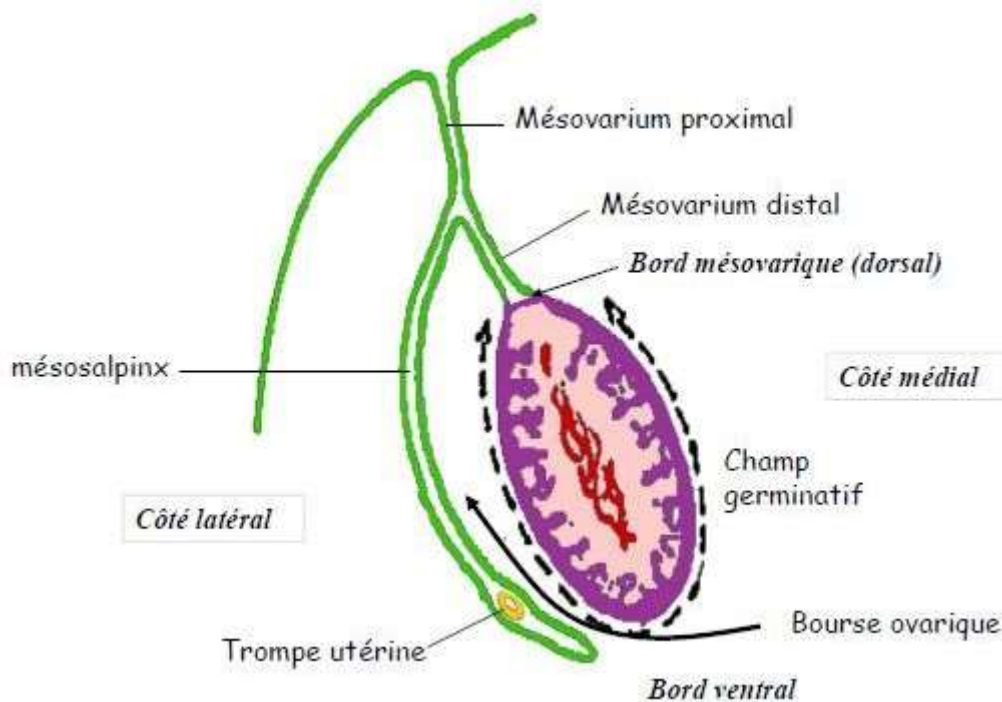


Figure 3 : Coupe transversale schématique d'un ovaire de vache (S. SAWAYA, 2011)

2) Oviductes ou trompes utérines

A chaque ovaire correspond une trompe utérine, ou salpinx, qui constitue la partie initiale des voies génitales femelles. C'est un conduit étroit et flexueux qui reçoit les ovocytes libérés par l'ovaire, dans lequel a lieu la fécondation, et qui assure le transfert de l'œuf fécondé en cours de clivage puis de multiplication jusqu'à l'utérus (BARONE R., 2001). Chaque trompe utérine mesure 20-25 cm de long pour 2-3 mm de diamètre, elle passe latéralement à l'ovaire portée par son mésosalpinx.

Leur portion initiale est évasée pour former le pavillon ou *infundibulum* de la trompe, indépendant de l'ovaire mais attaché à celui-ci par le ligament tubo-ovarique (MONTMEAS L., 2013). A ce niveau, la paroi du conduit est aplatie et forme des franges fines qui entourent l'ostium abdominal de la trompe. Ces franges sont libres sauf une qui forme le ligament tubo-

ovarique en s'attachant à l'extrémité crâniale de l'ovaire (Figure 4). Dès l'ovulation, l'ovule pénètre dans la trompe par cet ostium abdominal qui regarde toujours l'ovaire.

Faisant suite au pavillon de la trompe, la trompe présente deux autres zones importantes :

- L'ampoule qui est un renflement de la trompe et est le lieu de la fécondation
- L'isthme qui est un fort rétrécissement situé à la terminaison de la trompe utérine

Mais chez la vache, ampoule et isthme sont très peu différenciés et la jonction utéro-tubaire se fait progressivement.

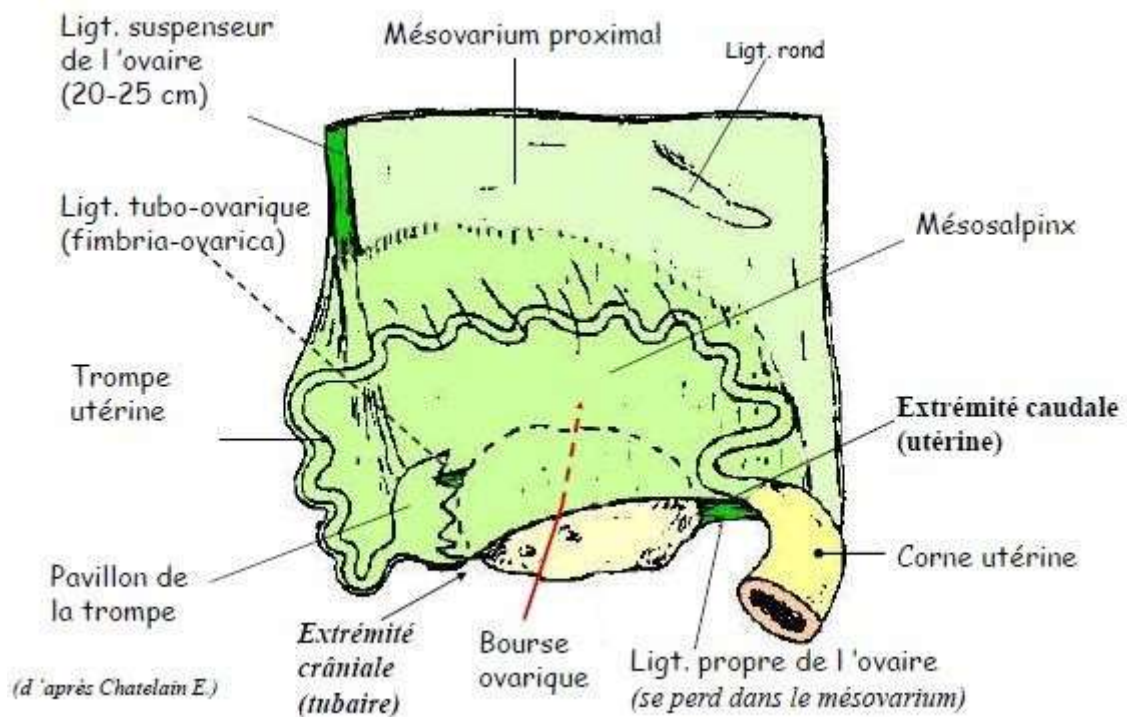


Figure 4 : Vue latéral d'un ovaire et d'une trompe utérine de vache (S. SAWAYA, 2011, d'après E. CHATELAIN)

3) Utérus

L'utérus, aussi appelé communément matrice, est l'organe de la gestation (BARONE R., 2001). Pourvu d'une muqueuse riche en glande et d'une musculuse puissante il est appendu de chaque côté à la région lombaire par un fort méso, le ligament large (Figure 5). Il reçoit le ou les œufs fécondés dont la segmentation a déjà commencé dans la trompe utérine.

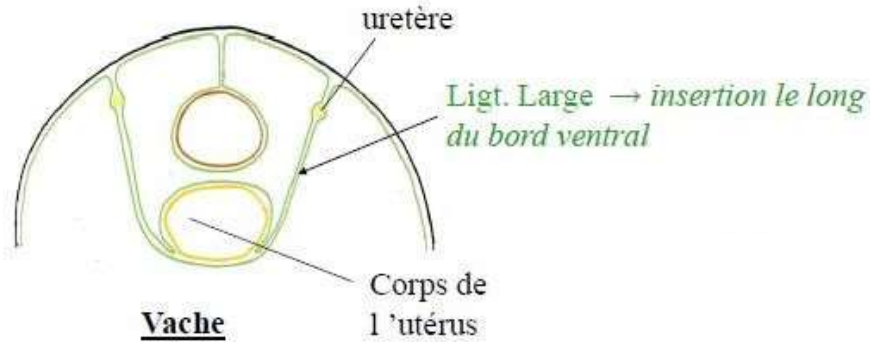


Figure 5 : Suspension de l'utérus par le ligament large (S. SAWAYA, 2011)

L'utérus de la vache est un utérus *bipartitus*, comme les autres ruminants, unifié sur une courte partie caudale : le corps de l'utérus (Figure 6). Ce dernier possède une communication simple et médiane avec le vagin et se prolonge crânialement par deux très longues cornes d'environ 40 cm chacune et qui forment alors la partie majeure de l'organe (JACOB T., 2012). Chaque corne utérine possède deux bords :

- Le bord mésométrial, concave, qui donne insertion au ligament large
- Et le bord libre, convexe, qui est libre de toute attache.
- Les cornes utérines ont une disposition particulière en cornes de bélier, c'est-à-dire qu'elles sont dirigées vers l'extérieur, d'abord vers le bas pour remonter ensuite latéralement au niveau du corps utérin. Les bases des cornes s'adossent l'une à l'autre sous une enveloppe séreuse et conjonctive commune où elles restent accolées sur une certaine longueur. Anatomie particulière des ruminants, les cornes sont reliées crânialement à leur accollement par deux ligaments intercornuaux, un ventral et l'autre dorsal (JACOB T., 2012).

Le col de l'utérus est une structure cylindrique et épaisse, beaucoup plus longue que le corps utérin (environ 10 cm).

Le corps et le col utérins sont situés dans la filière pelvienne entre le rectum dorsalement et la vessie ventralement, alors que les cornes reliées aux ovaires peuvent être dans la cavité pelvienne ou dans la cavité abdominale (JACOB T., 2012).

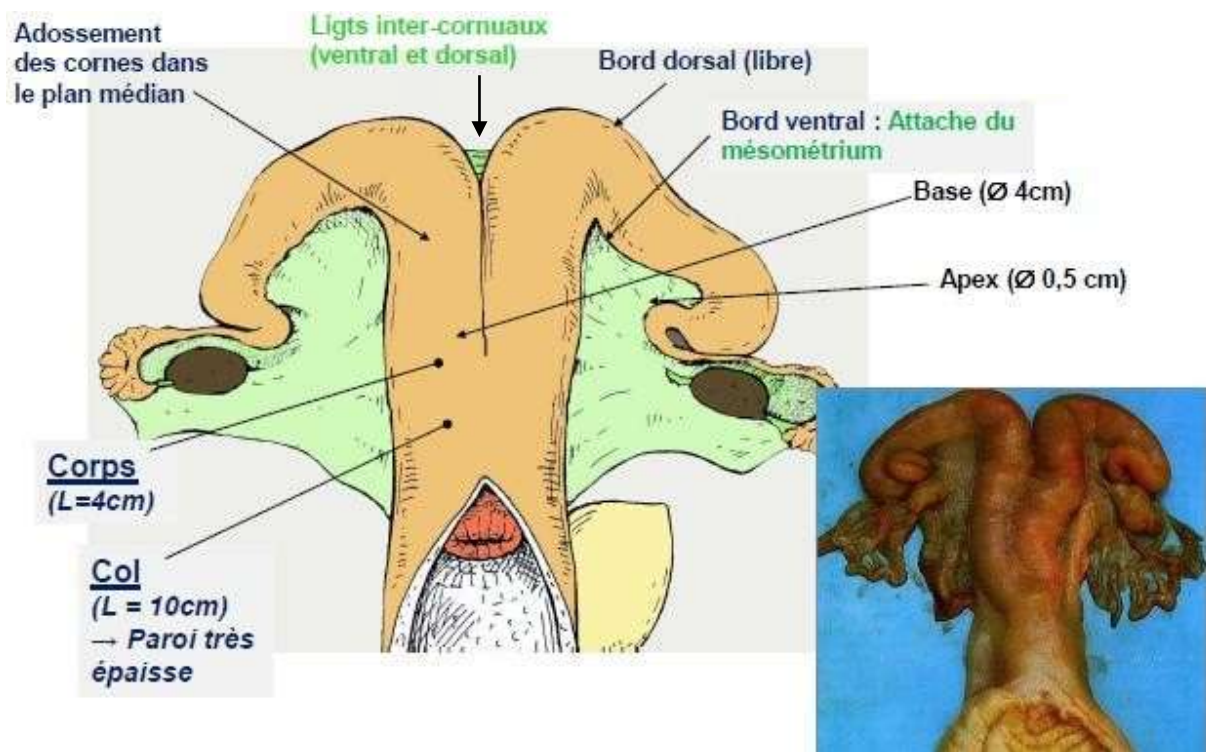


Figure 6 : Conformation externe d'un utérus de vache (S. SAWAYA, 2011)

Les multiples fonctions de l'appareil reproducteur femelle sont contrôlées par les gonades. Les ovaires présentent des variations périodiques de structure et d'activité qui déterminent des modifications simultanées de tout l'appareil génital. Il en résulte un caractère cyclique très remarquable des phénomènes sexuels (BARONE R., 2001).

B) Physiologie

La femelle bovine non gestante possède une activité sexuelle cyclique à partir de sa puberté (6-12 mois) qui se traduit par une succession d'événements se reproduisant à intervalles réguliers selon un rythme propre aux bovins (MONTMEAS L., 2013).

La vache, comme les autres ruminants domestiques, est polyœstrienne et ses cycles œstraux se répètent en principe toute l'année. Chez la vache, un cycle normal dure en moyenne entre 18 et 24 jours. Un cycle est composé de deux phases : la phase lutéale (14 à 18 jours) et la phase folliculaire (4 à 6 jours) (CROWE M. A., 2011).

1) Le fonctionnement ovarien

La zone corticale de chaque ovaire contient des structures cellulaires, appelées follicules, qui se trouvent à différents stades d'évolution chez l'adulte.

(a) Différents stades de follicules

Des plus petits au plus gros, on trouve (Figure 7) : les follicules primordiaux, les follicules primaires, secondaires, tertiaires et les follicules De Graaf (MONTMEAS L., 2013).

Les follicules primordiaux sont de très faible dimension (20 μm), et chaque follicule primordial est constitué d'un ovocyte primaire bloqué en première division méiotique. Ils sont très nombreux dans la période néonatale et la majorité d'entre eux dégénère par la suite (BARONE R., 2001).

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

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

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

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

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

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

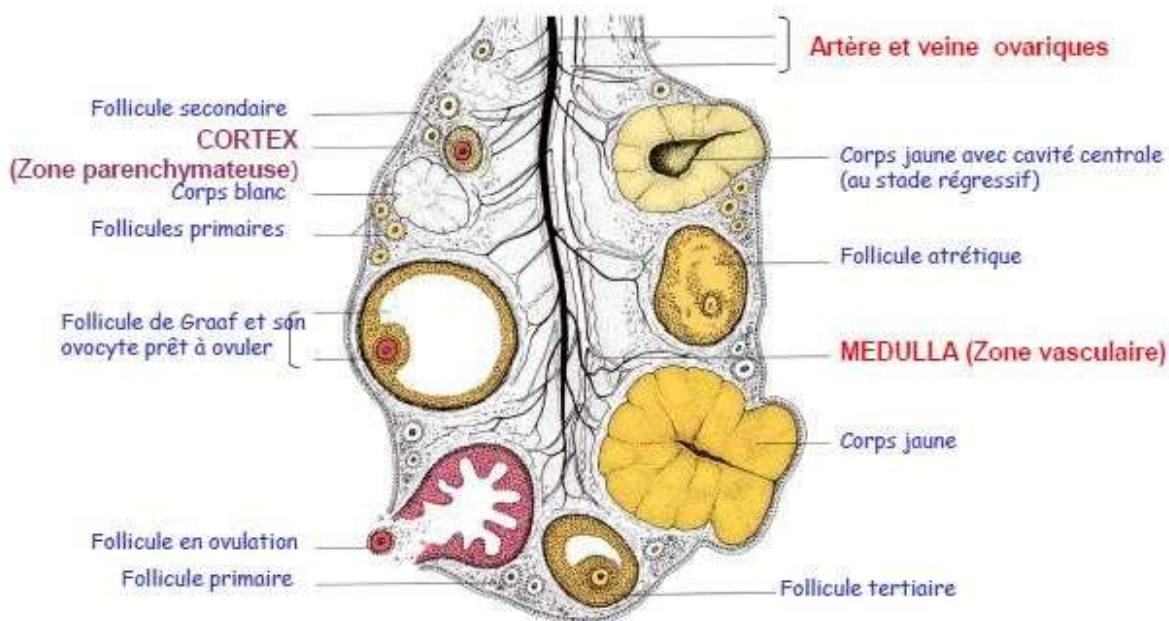


Figure 7 : Schéma des différents stades folliculaires de l'ovaire chez la vache (d'après H E. KONIG et H.G. LIEBICH, 2004)

(b) La folliculogénèse

Dans le cortex ovarien, il existe une réserve de follicules primordiaux, primaires et secondaires. La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule, depuis le moment où il sort de la réserve jusqu'à sa rupture (MONTMEAS L., 2013). La sortie de la réserve dure plusieurs mois. En effet, la croissance folliculaire s'effectue en 175 jours environ, dont environ une semaine pour la croissance terminale préovulatoire. Cette croissance folliculaire préovulatoire comprend trois étapes : recrutement, sélection et dominance.

Concernant le développement terminal, on parle de « vagues folliculaires » car le développement des follicules se fait par vagues. Chez la vache, il y en a en moyenne 3 par cycle. La première vague folliculaire commence le jour 1 du cycle, c'est-à-dire le lendemain de l'ovulation. Les vagues suivantes commencent à des moments du cycle variés selon les individus, sachant que plus le cycle est long chez une femelle plus le nombre de vagues est important (STEVENSON J. F., 2007).

Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules tertiaires antraux de diamètre égal ou supérieur à 2 mm, c'est l'étape de recrutement. Durant cette étape, la croissance des follicules est dépendante de la FSH. Puis, au-delà d'un diamètre de 8 mm environ, un follicule est sélectionné parmi les follicules recrutés. Ce follicule acquiert des récepteurs à la LH et peut continuer sa croissance tandis que les autres follicules recrutés s'atréfient. Il s'agit de la phase de sélection. Enfin, ce follicule finit sa croissance sous l'influence de la LH et finit par atteindre une taille d'environ 15 mm. C'est la phase de

dominance. Dans le cas où un corps jaune est présent, le follicule dominant s'atrophie et une nouvelle vague démarre. Si un corps jaune n'est pas présent, le follicule dominant peut alors terminer sa croissance et ovuler (LAIZEAU, 2003).

Si 3 vagues sont observées, elles débutent en général aux 2^{ème}, 9^{ème} et 16^{ème} jours du cycle. Si 2 vagues sont observées, elles débutent en général aux 2^{ème} et 11^{ème} jour du cycle, ce qui explique la variation de longueur des cycles parfois observée (LAIZEAU, 2003).

(c) L'ovulation

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

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

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

(d) Le corps jaune

Le corps jaune s'observe donc à l'emplacement du follicule de De Graaf ayant ovulé. Il est constitué de cellules lutéiniques qui sont colorées par un pigment orangé, la lutéine. Ces cellules lutéiniques dérivent des cellules de la granulosa et de la thèque interne, et sont des cellules sécrétrices de progestérone. Le corps jaune a une forme sphérique ou ovoïde chez la vache, avec un diamètre de 20 à 25 mm (Figure 8) (MONTMEAS L., 2013).

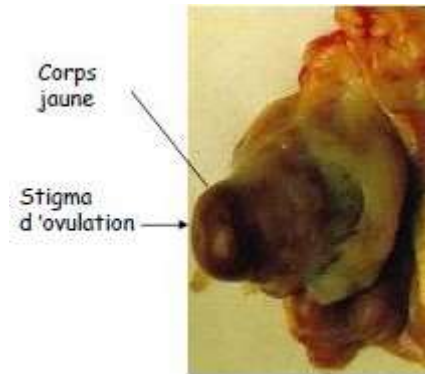


Figure 8 : Corps jaune sur un ovaire de vache (S. SAWAYA, 2011, d'après R. BARONE)

Le corps jaune devient fonctionnel 1 à 2 jours après l'ovulation (MONTMEAS L., 2013). Son poids et sa sécrétion de progestérone augmentent rapidement jusqu'au 4^{ème} jour du cycle, puis restent constants jusqu'au 16^{ème} jour (CROWE M. A., 2011). A la fin de cette phase, le corps jaune peut connaître deux destins différents :

- S'il n'y a pas eu fécondation, il n'y a alors pas de gestation et le corps jaune régresse. C'est ce que l'on appelle la lutéolyse qui a lieu au 17^{ème} jour du cycle (MONTMEAS L., 2013). Cette lutéolyse est induite par la principale hormone lutéolytique, la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), sécrétée par l'utérus. Bien que de taille réduite et non fonctionnel, le corps jaune reste présent dans l'ovaire (CROWE M. A., 2011).
- S'il y a eu fécondation, et qu'il y a une gestation, le corps jaune évolue en corps jaune $PGF_{2\alpha}$ par l'utérus, et donc la lutéolyse. La reconnaissance maternelle chez la vache a lieu entre le 15^{ème} et le 17^{ème} jour du cycle (MONTMEAS L., 2013).

(e) Une activité cyclique

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

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

(i) *Phase lutéale*

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

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

(ii) *Phase folliculaire*

Cette phase pré-ovulatoire débute à la lutéolyse et dure 4 jours. C'est durant cette période qu'a lieu la croissance terminale d'un ou plusieurs follicules de De Graaf destinés à ovuler (MONTMEAS L., 2013).

Pendant que le corps jaune régresse, on parle de pro-œstrus pendant 3 jours. Le 4^{ème} et dernier jour de cette phase folliculaire correspond à l'œstrus, période durant laquelle la femelle est réceptive sexuellement (BALL P. J. H. and PETERS A. R., 2004). L'œstrus aboutit alors à l'ovulation qui marque le début d'un nouveau cycle sexuel (Figure 9).

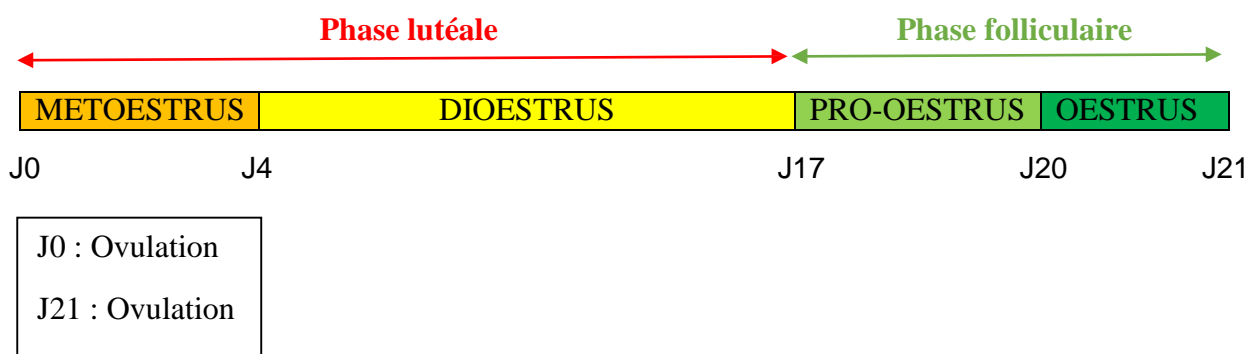


Figure 9 : Chronologie d'un cycle sexuel chez la femelle

2) Contrôle hormonal

(a) Les différentes hormones

(i) *Les hormones hypothalamo-hypophysaires*

Les hormones hypophysaires qui nous intéressent ici sont la LH (*luteinizing hormone*) et la FSH (*follicle stimulating hormone*). Ce sont deux hormones protidiques sécrétées par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. On parle de gonadotropines car elles vont agir directement sur les ovaires. Comme leur nom l'indique, la FSH est une hormone folliculostimulante alors que la LH est une hormone lutéinisante (MONTMEAS L., 2013).

L'hormone hypothalamique est quant à elle la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Comme son nom l'indique, elle stimule le relargage des hormones gonadotropes.

◆ FSH

Chez la femelle, la FSH est la principale hormone qui stimule la croissance des follicules lors des cycles ovariens (CROWE M. A., 2011). Ses deux autres rôles sont aussi de préparer l'action de la LH et de stimuler la synthèse des œstrogènes par les follicules (MONTMEAS L., 2013).

◆ LH

La LH a une action commune avec la FSH qui est la maturation finale des follicules. Surtout, la LH est connue pour être l'hormone provoquant l'ovulation, et induisant alors la formation du corps jaune et la synthèse de progestérone (MONTMEAS L., 2013).

◆ GnRH

La GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) est sécrétée de manière pulsatile par les neurones de l'hypothalamus dans le système vasculaire porte. Elle est ainsi transportée jusqu'à l'antéhypophyse où elle stimule la sécrétion des gonadotropines (la LH et la FSH) (CROWE M. A., 2011).

(ii) Les hormones stéroïdiennes

Chez la femelle, les deux principales hormones stéroïdiennes que l'on trouve sont les œstrogènes et la progestérone. Ce sont des hormones lipidiques, fabriquées à partir d'un précurseur commun qui est le cholestérol. Elles sont sécrétées par les ovaires, mais aussi par le placenta et les glandes surrénales (MONTMEAS L., 2013).

◆ *Œstrogènes*

Etymologiquement, le mot « œstrogène » signifie « qui engendre l'œstrus ». Ce sont des hormones sécrétées par les follicules de l'ovaire et qui ont pour rôle majeur de provoquer les chaleurs chez la femelle (MONTMEAS L., 2013).

De plus, les œstrogènes ont aussi une action sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. En effet, à forte dose ils exercent un rétrocontrôle positif sur la production de GnRH, LH et FSH, alors qu'ils ont un rétrocontrôle négatif sur ces mêmes hormones à faible dose (MONTMEAS L., 2013).

◆ *Progestérone*

De son côté, « progestérone » signifie « qui permet la gestation ». Elle est sécrétée par le corps jaune de l'ovaire, et comme son nom l'indique, elle permet le maintien de la gestation.

Tout comme les œstrogènes, la progestérone a également un rôle sur le complexe hypothalamo-hypophysaire en inhibant la sécrétion de GnRH, de LH et de FSH (MONTMEAS L., 2013).

(iii) Les prostaglandines

C'est un groupe d'hormones lipidiques dont la plus importante pour la reproduction est la $PGF_2\alpha$. Cette hormone a plusieurs rôles en reproduction, dont le principal est le déclenchement de la régression du corps jaune. Ce rôle de lutéolyse est assuré par l'utérus qui produit la $PGF_2\alpha$ (MONTMEAS L., 2013).

(b) Les régulations hormonales dans le cycle

Comme nous l'avons vu précédemment, le cycle ovarien se décompose en deux phases. La phase lutéale qui dure 17 jours, et la phase folliculaire qui dure 4 jours.

(i) Lors de la phase lutéale

Prenons comme point de départ l'ovulation pour décrire les phénomènes hormonaux cycliques, point de départ que nous nommerons J0.

Sous l'action de la LH, qui a provoqué l'ovulation, le corps jaune se forme et devient fonctionnel en sécrétant de la progestérone à J2. Ainsi la progestéronémie augmente jusqu'à atteindre un plateau. Le taux de progestérone est alors élevé tout le long de la phase lutéale.

Durant les 17 jours de la phase lutéale, la progestérone exerce un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire (Figure 10) limitant la production de GnRH et donc les sécrétions de LH et de FSH. Cette faible pulsatilité de la LH empêche l'ovulation des follicules dominants des premières vagues folliculaires.

De plus, la progestérone agit également au niveau de l'utérus, en le préparant à une éventuelle gestation (Figure 10). Pour cela, elle induit un repos utérin en inhibant les contractions du myomètre et stimule le développement et la vascularisation de l'endomètre.

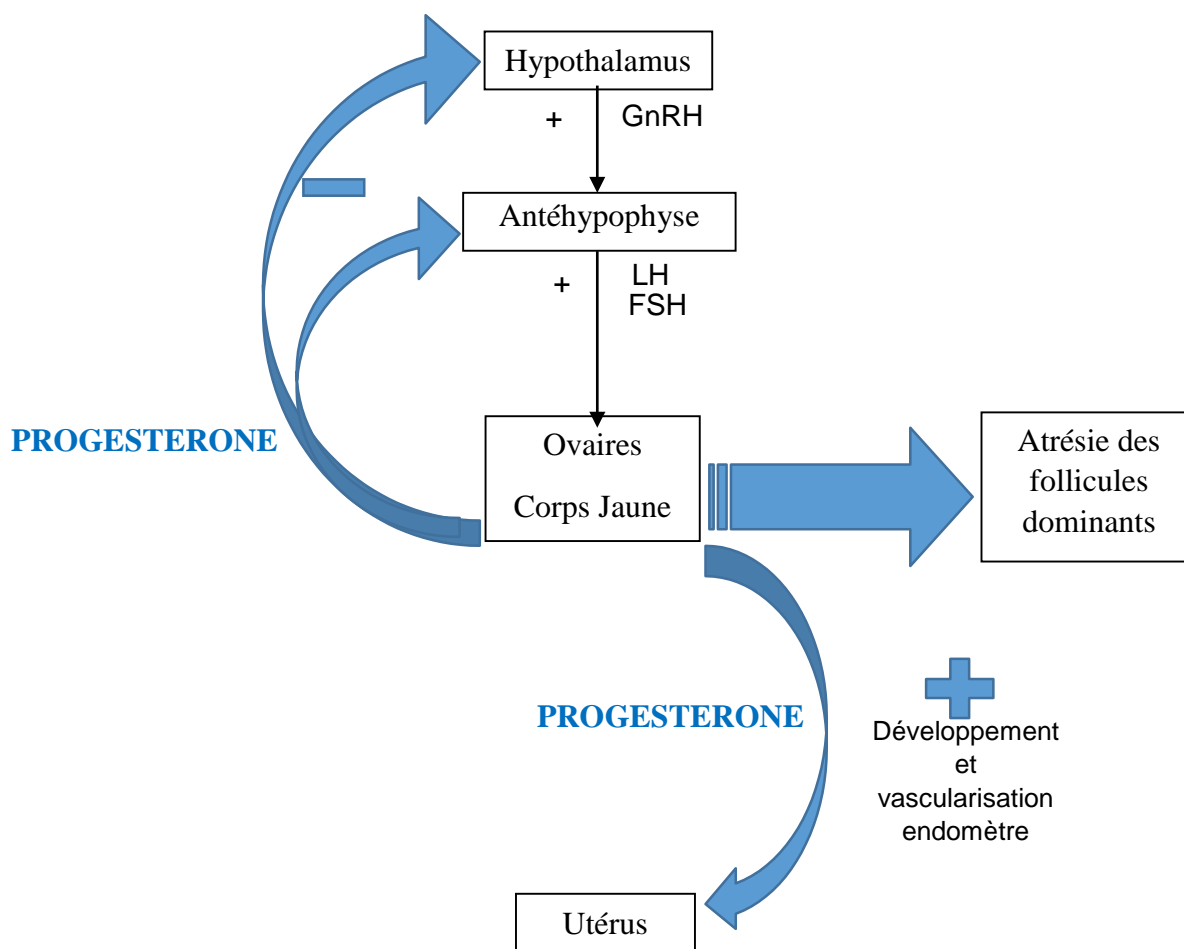


Figure 10 : Actions hormonales lors de la phase lutéale

Durant la phase lutéale ont lieu les premières vagues folliculaires (Figure 11). En effet, juste après l'ovulation, le taux de FSH augmente et stimule l'apparition d'une nouvelle vague. L'ovulation du follicule dominant engendre une forte diminution du taux d'œstrogènes, ce qui aboutit à une diminution importante du rétrocontrôle négatif exercé sur la FSH. Cette augmentation de la FSH initie la phase de recrutement. Durant cette phase, la croissance terminale d'une cohorte de follicules gonadodépendants est sous dépendance de la FSH. On constate l'émergence tous les sept à neuf jours d'une cohorte de follicules sous l'action de cette hormone (MONNIAUX D., 2012). La FSH se fixe sur les récepteurs de la granulosa, stimule la formation d'œstrogènes et induit la formation de récepteurs à la LH. L'augmentation du taux d'œstradiol associée à une augmentation du taux d'inhibine, va limiter la synthèse et la libération de la FSH. Cette diminution de la libération de la FSH va être à l'origine de la phase suivante (DEZAUX P., 2001).

A partir de cette phase (la sélection), la croissance du follicule devient dépendante de la LH. En effet, quand un follicule a acquis suffisamment de récepteurs à LH pour lui permettre de subsister à faible taux de FSH, il sécrète de grandes quantités d'œstrogènes et continue à croître en raison de l'augmentation de sa propre sensibilité à la FSH et à la production de facteurs de croissance locaux, l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1). Pour les follicules non sélectionnés, la sécrétion réduite de FSH ne permet plus la croissance (DEZAUX P., 2001).

Enfin, lors de la phase de dominance, le follicule sélectionné échappe à l'atréxie initiale, alors que les autres follicules voient leur croissance arrêtée. Ainsi, le follicule dominant continue de croître. Cette croissance peut aboutir à :

- L'atréxie si on se trouve durant la phase lutéale
- L'ovulation si on se trouve durant la phase folliculaire (CROWE M. A., 2011).

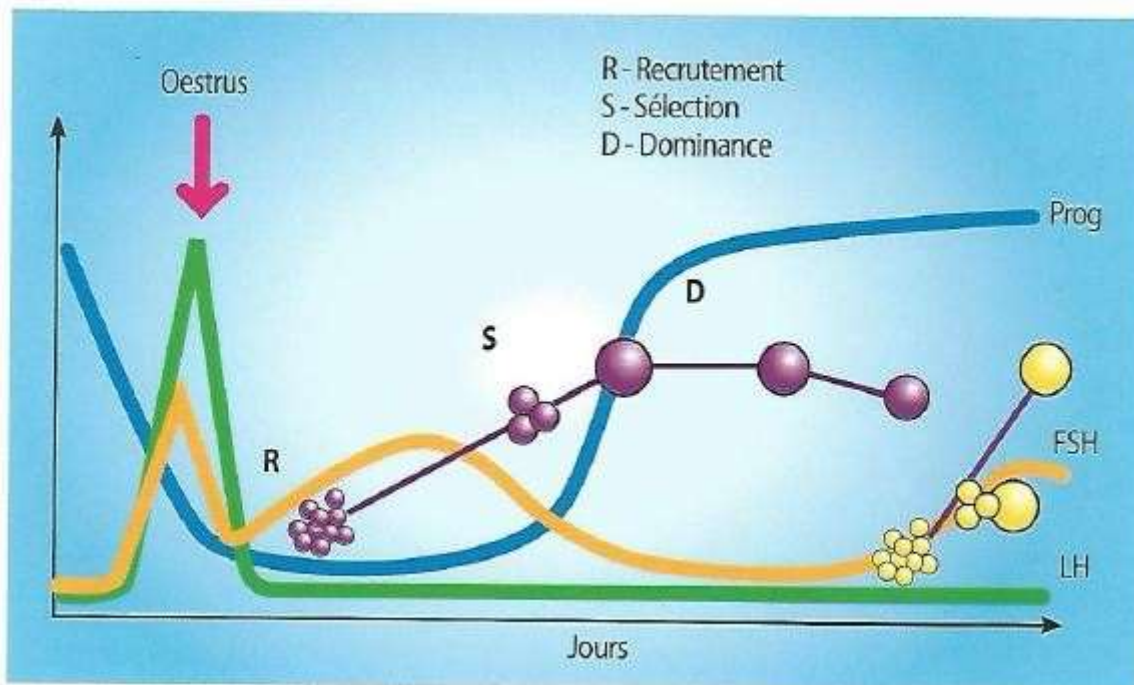
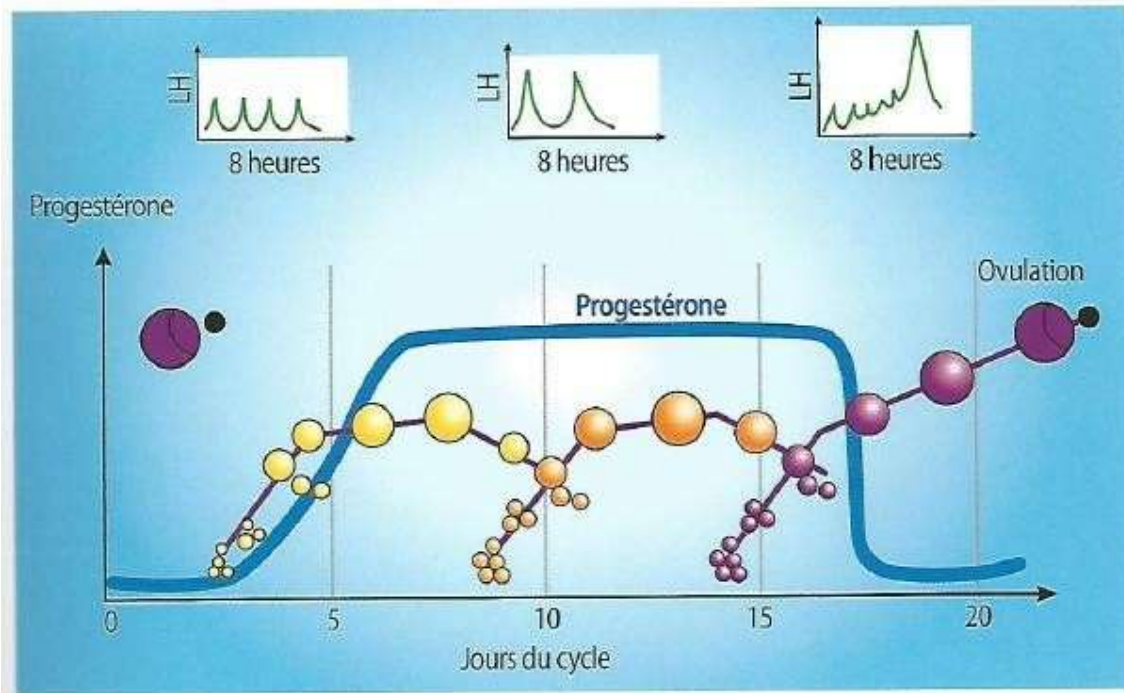


Figure 11 : Les vagues folliculaires chez la vache et leur contrôle hormonal (Guide de la fertilité bovine, CEVA)

(ii) Lors de la phase folliculaire

A J17, en l'absence de fécondation, et donc de signal embryonnaire, l'utérus produit la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Cette hormone induit la lutéolyse et donc une chute du taux de progestérone. C'est le début de la phase folliculaire.

Le rétrocontrôle négatif de la progestérone sur le complexe hypothalamo-hypophysaire est levé et la sécrétion de FSH et de LH augmente progressivement.

Le follicule dominant de la dernière vague folliculaire voit son développement stimulé par les hormones hypophysaires, et se met à produire des œstrogènes en quantité croissante. Les œstrogènes induisent le comportement d'œstrus à J21.

Lorsque le taux d'œstrogènes atteint un seuil, ils exercent un rétrocontrôle positif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. Cette stimulation de l'hypothalamus engendre une production massive de GnRH qui va agir au niveau de l'antéhypophyse. Sous cet effet, l'antéhypophyse réagit avec une production massive de FSH et LH, et le pic de LH induit l'ovulation à J21 (Figure 12).

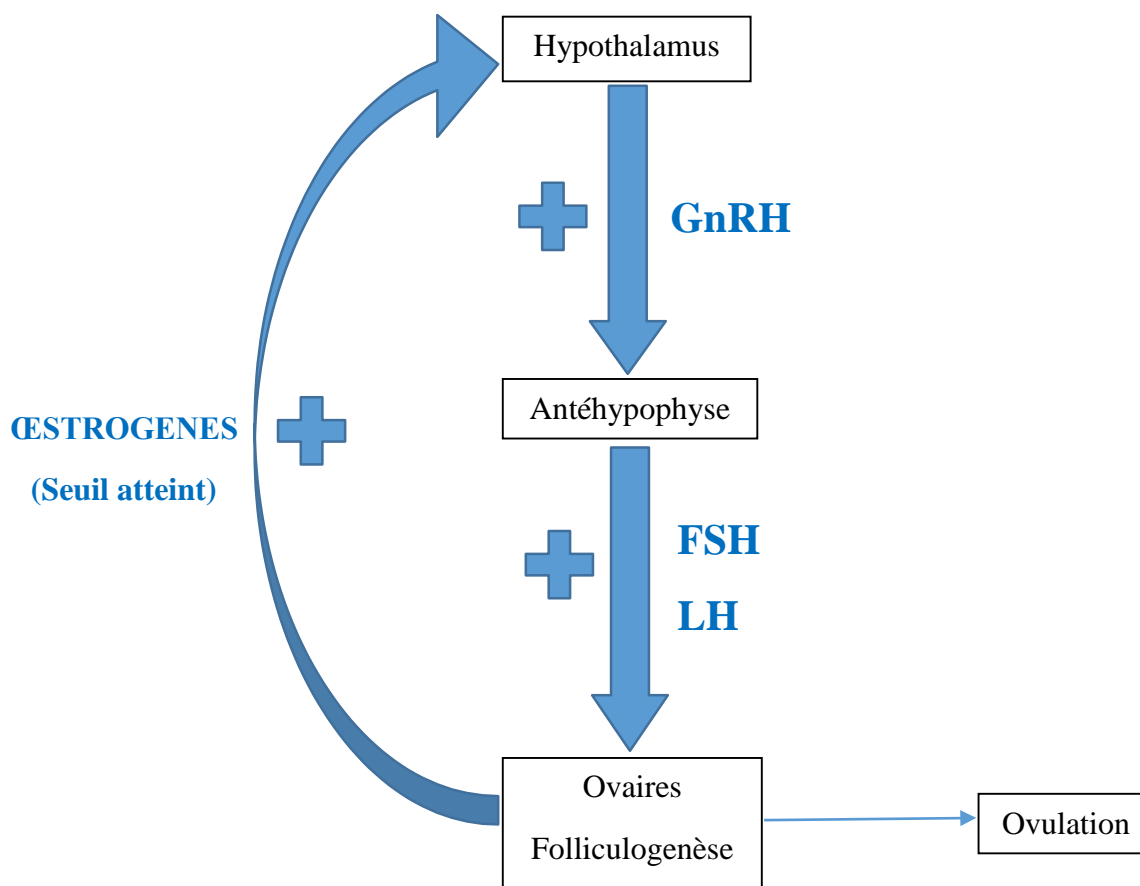


Figure 12 : Actions hormonales lors de la phase folliculaire

3) Fécondation et développement embryonnaire précoce

Comme nous l'avons vu précédemment, après l'ovulation, l'ovocyte est récupéré par la trompe utérine via l'ostium abdominal. Grâce aux mouvements des cils, l'ovocyte est amené jusqu'à l'ampoule tubaire où a lieu la fécondation. Le spermatozoïde pénètre l'ovocyte dans les deux heures suivant l'ovulation.

Cette pénétration déclenche l'expulsion par l'ovocyte du second globule polaire, la reprise de la mitose cellulaire. Les deux premiers blastomères se forment ainsi une trentaine d'heures après la fécondation, puis la seconde division cellulaire a lieu 10 à 12 heures plus tard.

Depuis la fécondation, la taille de l'embryon ne change pas (70-140 microns), du fait de la présence de la zone pellucide. Cette structure supplémentaire a un double rôle ; elle maintient les blastomères ensemble et leur assure aussi un milieu périvitellin adéquat grâce à un rôle de filtration (HANZEN C. et al., 1999).

Les divisions cellulaires suivantes sont asynchrones et aboutissent à deux populations cellulaires. Une population de petite taille qui va donner naissance au bouton embryonnaire (divisions précoces), et une autre de grande taille qui est à l'origine du trophoblaste ou trophoblaste. Les études de Hackett *et al.* (1993) montrent qu'au 4^{ème} jour suivant l'insémination 72% des embryons, quelle que soit leur qualité, sont au stade 8 cellules, au 5^{ème} jour 78% sont au stade 16 cellules et au 6^{ème} jour 81% sont au stade plus de 16 cellules. Ces divisions cellulaires aboutissent à la formation d'une morula, soit un stade 32-64 cellules, qui va être l'objet de la compaction qui est le plus souvent observé 5 à 6 jours après la fécondation. Cette étape de compaction est suivie de la formation d'une cavité blastocœlique (blastocœle) et donc du blastocyste (HANZEN C. et al., 1999).

Ce qui est intéressant, c'est d'observer qu'après sa formation, le blastocyste comprend rapidement une centaine de cellules et que sa taille grandit par accumulation de liquides (il atteint 400-700 microns au 9^{ème} jour). Il en résulte un amincissement de la membrane pellucide qui est à l'origine de sa rupture. L'éclosion, c'est-à-dire la sortie du blastocyste hors de sa pellucide, a lieu vers les 9^{ème}-10^{ème} jours post-fécondation. Cette éclosion ne résulte pas d'une lyse enzymatique, mais de la formation d'un point de perforation. Ce processus a une durée moyenne de 12 heures (HANZEN C. et al., 1999).

Ensuite, le phénomène d'implantation de l'embryon, a lieu en moyenne vers le 20^{ème}-30^{ème} jour de gestation grâce à un processus d'adhésion entre les structures embryonnaires et maternelles (HANZEN C. et al., 1999).

III) Les protocoles hormonaux nécessaires au transfert embryonnaire

Rappelons qu'au cours de chaque cycle un nombre important de follicules commence à se développer, mais qu'un seul est suffisamment mature pour permettre la libération d'un

ovocyte fécondable. Le traitement de superovulation a pour objectif d'utiliser les ovocytes issus des follicules qui auraient dû s'atrophier, afin d'augmenter le nombre d'ovocytes fécondables. Parallèlement, un protocole de synchronisation est mis en place sur les futures receveuses pour que donneuses et receveuses manifestent l'œstrus en même temps.

C'est pourquoi un transfert embryonnaire consiste en un ensemble de protocoles qui se décomposent en deux étapes. La première étape consiste en la synchronisation des cycles sexuels des femelles donneuses et des femelles receveuses. La seconde étape est la superstimulation des ovaires de la femelle donneuse et son insémination.

Pour rappel, le TE consiste à faire produire des embryons à une femelle donneuse, de les collecter puis de les transférer à des femelles receveuses à l'état frais ou congelés. Lorsque les embryons sont transférés à l'état frais, il est indispensable que les femelles, donneuses et receveuses, soient synchrones au niveau de leur cycle pour augmenter la réussite du TE et la probabilité d'une gestation.

A) Synchronisation des donneuses et des receveuses

La connaissance du déroulement du cycle sexuel et du rôle de chaque hormone a abouti à une principale application pharmacologique : la synchronisation des chaleurs de plusieurs femelles. Cette synchronisation induit une maîtrise totale du cycle d'une femelle ce qui permet de l'inséminer en s'affranchissant de la détection des chaleurs. Ces protocoles synchronisent la croissance des follicules, la régression du corps jaune et l'ovulation, permettant ainsi de réaliser l'insémination artificielle à un temps prédéterminé. Cela se traduit par une performance reproductive améliorée car tous les animaux sont inséminés, qu'ils manifestent l'œstrus ou non. En plus de la synchronisation des cycles, l'hormonothérapie peut être utilisée comme traitement des animaux en anœstrus ou en repeat breeding. Les traitements qui synchronisent les croissances folliculaires sont classés en trois groupes : les protocoles à base d'œstradiol, les protocoles à base de GnRH et les protocoles à base de progestérone (COLAZO M. G. and MAPLETOFT R. J., 2014).

Il est indispensable de synchroniser donneuses et receveuses dans le cadre de la réussite en TE, mais un mince degré de non-synchronisation entre donneuses et receveuses n'affecte pas les résultats de gestation (PONSART C. et al., 2000).

1) Les protocoles de synchronisation standards

(a) Les traitements à base d'œstradiol

La combinaison de l'œstradiol et de la progestérone supprime les pulses de LH et de FSH et donc la croissance des différents follicules. L'œstradiol, seul (lorsque la progestéronémie est basse), stimule la sécrétion de LH, donc l'ovulation, et/ou la lutéinisation des follicules ovariens. Une fois que l'œstradiol est métabolisé, les pulses de FSH redémarre et une nouvelle vague folliculaire émerge. Le protocole consiste donc en la mise en place d'un dispositif libérant de la progestérone et l'administration d'œstradiol (pour synchroniser les vagues d'émergence folliculaire) à J0, et en une injection de PGF_{2α} au moment du retrait de l'implant de progestérone à J7 pour assurer la lutéolyse d'un potentiel corps jaune naturel. Une faible dose d'œstradiol est administrée 24h après le retrait de l'implant pour induire un pic de LH 16-18h après l'injection et l'ovulation 24 à 36h après le pic de LH. Ainsi l'IA est prédéterminée et s'effectue 48 à 56 heures après cette injection d'œstradiol (COLAZO M. G. and MAPLETOFT R. J., 2014). L'œstradiol est une hormone dont l'utilisation dans les filières de productions animales destinées à l'alimentation humaine est interdite dans tous les pays de l'Union Européenne. Aux Etats-Unis et au Canada, elle est soumise à une forte réglementation, et n'est autorisée que dans les filières d'engraissement (CHEVALIER P., 2012). C'est pourquoi il existe d'autres protocoles de synchronisation qui n'utilisent pas d'œstradiol.

(b) Les protocoles à base de GnRH

En 1995, une nouvelle méthode de synchronisation des ovulations voit le jour, c'est un protocole à base de GnRH et de PGF_{2α} (PURSLEY J. R. et al., 1995). Ce protocole est aussi appelé G-P-G ou encore Ovsynch.

Ce protocole consiste en une première injection de GnRH. Si un follicule dominant de plus de 10 mm est présent, cette injection provoque son ovulation via le pic de LH induit, puis une nouvelle vague folliculaire fait son apparition dans les deux jours suivant l'injection. Ensuite l'animal reçoit une injection de prostaglandines PGF_{2α} 6 à 7 jours plus tard, ce qui permet la lutéolyse de tout corps jaune présent. Ainsi, lorsque l'animal reçoit une seconde injection de GnRH 36 à 48h plus tard, on est certain qu'un follicule dominant est présent et que cette injection induira son ovulation. L'insémination est donc réalisée en aveugle 16 à 20h après la seconde injection de GnRH. Ce protocole Ovsynch est surtout utilisé en laitier car les animaux sont quotidiennement manipulés, ce qui est différent en élevage allaitant. Il existe donc une alternative, qui s'appelle le protocole Cosynch. La différence réside dans le fait que la seconde injection de GnRH et l'IA sont réalisés simultanément. L'éleveur n'ayant donc pas une quatrième contention à réaliser (COLAZO M. G. and MAPLETOFT R. J., 2014).

Un protocole de « pré-synchronisation » peut être utilisé pour améliorer la réponse aux protocoles Ovsynch ou Cosynch. Le plus communément utilisé consiste en une pré-synchronisation à l'aide d'injections de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Cette pré-synchronisation permet de s'assurer que les animaux sont entre J5 et J12 du cycle œstral au départ du protocole G-P-G. Cette période est en effet optimale pour la première injection de GnRH. Ce protocole consiste en 2 injections de $\text{PGF}_{2\alpha}$ à 14 jours d'intervalle, puis la première injection de GnRH a lieu 12 à 14 jours après la seconde $\text{PGF}_{2\alpha}$, à un moment où la probabilité de présence d'un follicule sensible au pic de LH est augmentée (COLAZO M. G. and MAPLETOFT R. J., 2014). Un protocole Ovsynch est alors enchaîné comme vu précédemment.

(c) Les protocoles à base de progestérone

Les dispositifs libérant de la progestérone miment la présence d'un corps jaune, ce qui inhibe l'ovulation par le blocage des pulses de LH et également l'œstrus.

Ainsi, en supprimant les pulses de LH, la progestérone induit une croissance réduite du follicule dominant. Cependant, la progestérone n'inhibe pas la sécrétion de FSH, c'est pourquoi les vagues folliculaires continuent d'émerger en présence d'un corps jaune fonctionnel. Par exemple, pour le PRID (Progesterone-impregnated Intravaginal Device) qui est autorisé dans de nombreux pays dont la France, les consignes sont de le laisser en place 6 à 7 jours. Ce dispositif est mis en place à un moment inconnu du cycle, c'est pourquoi la présence d'un corps jaune naturel sécrétant de la progestérone est possible. Afin de lyser ce corps jaune naturel, une injection de $\text{PGF}_{2\alpha}$ est réalisée la veille ou au moment du retrait du PRID. Ainsi, chez toutes les femelles à qui le PRID a été retiré simultanément, l'œstrus débute 48h plus tard (COLAZO M. G. and MAPLETOFT R. J., 2014).

B) Superovulation de la femelle donneuse

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

1) Quand mettre en place un protocole de superovulation

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

2) Les protocoles de superovulation

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

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

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

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

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

(i) *Le protocole standard*

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

(ii) *Les alternatives possibles au protocole standard*

◆ *Une administration quotidienne de FSH*

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

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

◆ *L'utilisation d'une solution de FSH pure*

Une comparaison a été faite entre deux groupes de génisses Simmental. Un groupe contrôle recevait 8 injections de Stimufol® sur 4 jours (protocole traditionnel). Dans le second groupe, 5 injections de Stimufol® étaient remplacées par 5 injections de solution pure en FSH. Les résultats montraient qu'il n'y avait pas de différences entre les deux groupes deux jours après l'IA concernant le nombre de follicules ovulés et le développement embryonnaire précoce. Mais sept jours après l'IA le nombre de blastocystes était plus faible dans le groupe

ayant reçu de la FSH pure comparé au groupe contrôle. Ces résultats semblaient donc indiquer que l'utilisation de FSH pure pour la superovulation était moins favorable au développement embryonnaire précoce entre J2 et J7 (HAVLICEK V. et al., 2013).

L'utilisation de FSH pure n'est donc pas la meilleure alternative et ne peut remplacer les produits commerciaux tels que le Stimufol®.

◆ *Une diminution de la fréquence d'administration de FSH*

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

3) Les protocoles d'optimisation à la superovulation

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

(a) Utilisation de progestérone

Une méthode d'optimisation consiste en la pose d'un implant auriculaire de progestérone un à trois jours avant le commencement du protocole standard de SO. Les résultats indiquent que cette méthode est bénéfique car elle permet d'augmenter le taux de conception (76,2% contre 61,9%) et d'augmenter également le nombre d'embryons viables (3,7 contre 1,7)

(MENARD D. P. et al., 2000). Une autre équipe de chercheurs français a également montré les effets bénéfiques d'un ajout de progestérone au protocole de SO, sur une durée légèrement plus longue. En effet, une supplémentation de 5 jours en progestérone débutant deux jours avant la première injection de FSH permettrait d'augmenter la production d'embryons en réponse à la SO. Ils ont aussi montré que la production embryonnaire est fortement affectée par des facteurs individuels, comme la parité, le rang de la collecte, et par l'origine génétique de la donneuse qui semble influencer principalement la réponse à la superstimulation (GOVIGNON A. et al., 2000).

(b) Utilisation de FSH

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

(c) Utilisation d'eCG

Une étude préliminaire a cherché à savoir si l'ajout d'eCG avant le protocole de SO avait un effet quelconque sur la production embryonnaire de génisses. C'est au moment du retrait de l'implant de progestérone, servant à synchroniser les œstrus, qu'est injecté 300 UI d'eCG dans un groupe, et une solution saline dans le groupe contrôle, avant de poursuivre le schéma classique de SO. Les embryons sont collectés sept jours après l'IA, par lavage de l'utérus, et l'influence du traitement est évalué sur le nombre moyen total d'embryons (TOT), le nombre moyen d'embryons transférables (TRA), le nombre moyen d'embryons de qualité 1 (GR1), le nombre moyen d'embryons dégénérés (DG) et le nombre moyen d'ovocytes non fertilisés (UFO). Les résultats sont présentés dans le tableau 2, N étant le nombre de génisses par groupe.

	N	TOT	TRA	GR 1	DG	UFO
PMSG	34	8.18 ± 1.77	7.82 ± 0.59	5.08 ± 0.55 ^a	0.91 ± 0.25	1.46 ± 0.43
Control	41	8.82 ± 1.71	6.77 ± 0.59	3.35 ± 0.50 ^b	1.35 ± 0.23	2.29 ± 0.40

Tableau 2 : Comparaison des productions d'embryons entre les génisses ayant reçu de la PMSG (= eCG) et les génisses n'en ayant pas reçu.

(PMSG : Groupe de génisses ayant reçu de l'eCG, Control : Groupe de génisses n'ayant pas reçu d'eCG, N : Nombre d'individus par groupe, TOT : Nombre moyen total d'embryons, TRA : Nombre moyen d'embryons transférables, GR1 : Nombre moyen d'embryons de qualité 1, DG : Nombre moyen d'embryons dégénérés, UFO : Nombre moyen d'ovocytes non fertilisés)

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

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

(d) Ablation manuelle des follicules

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

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

4) Variabilité des réponses des donneuses à la superovulation

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

- Différences dans la préparation des gonadotropines.
- Différences de lots des produits commerciaux.
- Différences de doses utilisées.
- Différences dans la durée du traitement.

- Différences dans le moment de la mise en place du protocole par rapport au cycle de la femelle.
- Des utilisations d'hormones supplémentaires, comme la pré-synchronisation.

D'autres facteurs de variabilité sont également à considérer. Ce sont les facteurs inhérents à l'animal et son environnement (MAPLETOFT R. et al., 2002).

C) Un exemple de protocole utilisé en pratique

Dans cette partie, sera exposé un protocole utilisé par les vétérinaires de la Société Civile Professionnelle ESCOUFLAIRE-POL-EFIMOFF (EmbryoVet), pratiquant dans l'Ouest de la France. Tout d'abord, une présentation des produits commerciaux utilisés est proposée dans le Tableau 3.

Nom commercial	Principe actif	Equivalent hormonal
PRID [®] Delta	Progestérone	Progestérone
RECEPTAL [®]	Buséreline	GnRH
ESTRUMATE [®]	Cloprosténol	PGF _{2α}
SYNCRO-PART [®]	eCG (equine Chorionic Gonadotropin)	FSH (LH)
STIMUFOL [®]	FSH et LH porcines	FSH et LH

Tableau 3 : Quelques présentations commerciales hormonales

Ces praticiens préviennent les éleveurs qu'une opération de TE obéit à deux contraintes :

- Il faut anticiper et contacter les vétérinaires deux mois avant la date souhaitée
- Il faut intervenir sur des donneuses et des receveuses en bonne santé.

Une fois que l'éleveur les a contactés, le vétérinaire rédige une ordonnance avec les dates et interventions à prévoir, ordonnance qu'il suffit de suivre pour l'éleveur (Annexe 1). Le protocole complet nécessite des interventions pendant 3 à 5 semaines afin d'ajuster le traitement de superovulation à la période la plus favorable du cycle.

1) Première étape : synchronisation des cycles sexuels

Tout d'abord, des chaleurs de référence doivent être observées pour confirmer que la future donneuse est cyclée. Cet œstrus de référence peut être naturel, ou induit par un traitement hormonal.

Pour cycler un animal de manière chimique, un dispositif libérant de la progestérone est mis en place, comme le PRID[®] Delta (dispositif intravaginal). Ce dispositif à base de progestérone mime une phase lutéale. Comme ce dispositif est mis en place à un moment inconnu dans le cycle, la présence d'un corps jaune naturel sécrétant aussi de la progestérone est possible. C'est pourquoi une injection d'ESTRUMATE[®] (PGF_{2α}) est réalisée la veille du retrait du PRID[®] Delta, afin de lyser ce corps jaune.

Le PRID[®] Delta est retiré neuf jours après sa mise en place, provoquant une chute de la progestéronémie et donc une levée d'inhibition de la sécrétion de FSH et LH. La veille du retrait, en même temps que l'injection d'ESTRUMATE[®], une administration d'eCG peut être réalisée afin de stimuler la maturation du follicule dominant.

Deux jours après le retrait du PRID[®] Delta, une injection de RECEPTAL[®] (équivalent de la GnRH) est réalisée 5-6 heures après l'acceptation des premiers chevauchements et 12 heures plus tard afin de faire ovuler l'animal. Ainsi, un corps jaune naturel se met en place, et les vétérinaires vérifient sa présence dix jours après l'injection de RECEPTAL[®]. Ainsi, les chaleurs observées constituent les chaleurs de référence de la femelle donneuse (Figure 13).

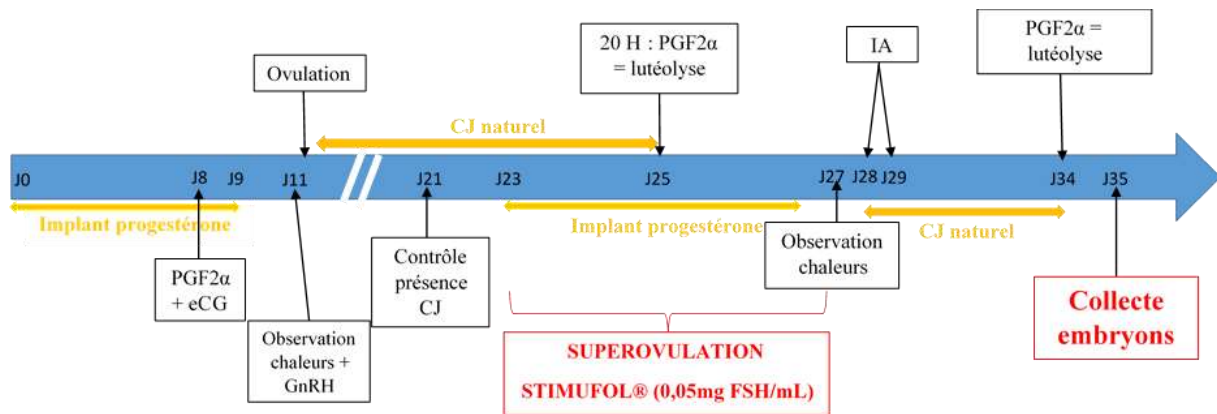


Figure 13 : Protocole hormonal sur la femelle donneuse

(CJ : Corps Jaune, IA : Insémination Artificielle, J8 : Jour 8, PGF_{2α} : Prostaglandine F_{2α}, eCG : equine Chorionic Gonadotropin, GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone, FSH : Follicle Stimulating Hormone)

Parallèlement, le lendemain du retrait du PRID[®] Delta sur la donneuse, les receveuses reçoivent une injection d'ESTRUMATE[®], sauf celles vues en chaleurs dans les cinq jours précédents. Ainsi toutes les receveuses sont en phase lutéale sept jours plus tard, quand un dispositif libérant de la progestérone leur sera mis en place (Figure 14).

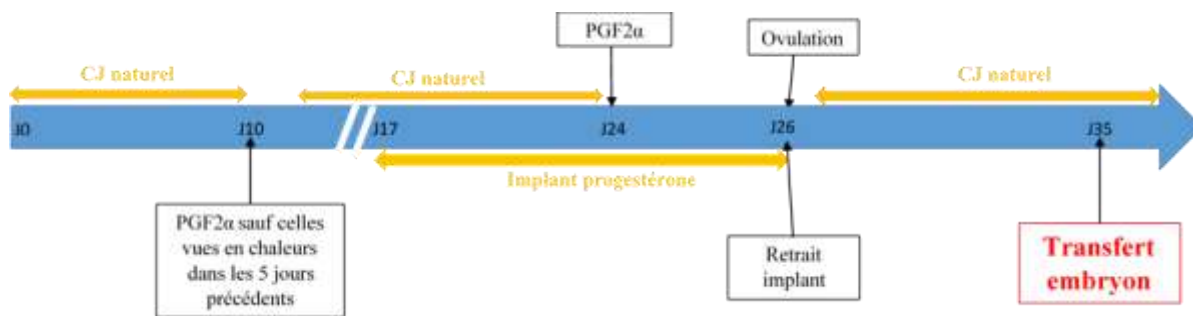
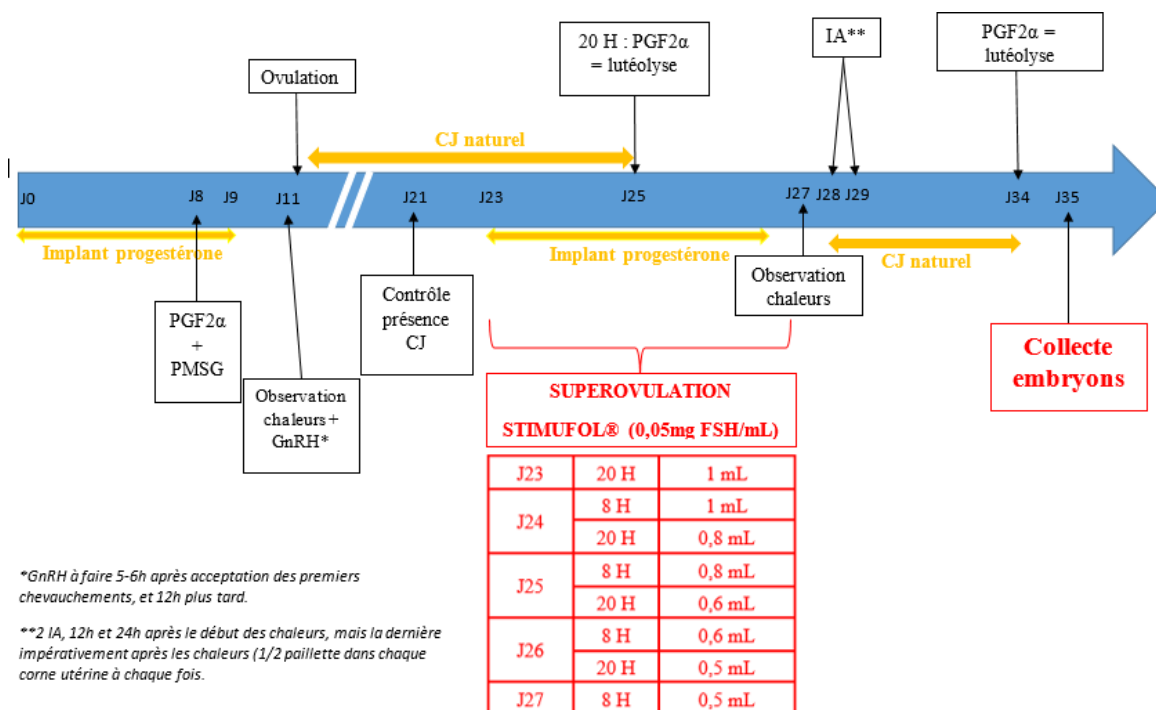


Figure 14 : Protocole hormonal sur la femelle receveuse

2) Seconde étape : la superstimulation de la femelle donneuse

Douze jours après l'injection de RECEPTAL® sur les donneuses, un nouveau PRID® Delta est mis en place le matin, avant que le traitement de superovulation ne débute le soir. Ce traitement est réalisé avec 8 injections de STIMUFOL® (0,05 mg/mL de FSH + LH). Les huit injections de STIMUFOL® sont réalisées à 12 heures d'intervalle, donc en 4 jours, à doses décroissantes. Ainsi, la FSH stimule la folliculogénèse et la maturation de plusieurs follicules De Graaf, sans ovulation car la progestéronémie est maintenue élevée grâce au PRID® Delta (Figure 15).



*GnRH à faire 5-6h après acceptation des premiers chevauchements, et 12h plus tard.

**2 IA, 12h et 24h après le début des chaleurs, mais la dernière impérativement après les chaleurs (1/2 paillette dans chaque corne utérine à chaque fois).

Figure 15 : Protocole de superovulation sur la femelle donneuse

Pendant ce temps-là, les receveuses sont toujours sous l'effet du PRID® Delta. Ainsi, donneuse et receveuses sont toutes sous imprégnation progestéronique et donc synchronisées (Figures 14 et 15).

La veille de la dernière injection de FSH sur la donneuse, les dispositifs PRID® Delta sont retirés chez la donneuse et les receveuses. Ce retrait est effectué le matin pour les receveuses et le soir pour la donneuse.

C'est pourquoi donneuse et receveuses auront des chaleurs synchronisées, et que l'insémination artificielle sur la donneuse se fera 12 heures et 24 heures après le début des chaleurs (une demie paillette dans chaque corne à chaque fois), mais la deuxième IA impérativement après la fin des chaleurs. Puis sept jours plus tard, la collecte d'embryons pourra avoir lieu. Une fois les embryons collectés, il est possible de les transférer aux receveuses jugées aptes, ou bien de les congeler pour un transfert ultérieur.

IV) Transfert Embryonnaire : Production d'embryons *in vivo*

A) Sélection des donneuses

1) Effets de l'âge

(a) Primipare ou multipare

Des études ont été menées sur cet effet, dont une en particulier dans l'espèce caprine réalisée par une équipe sud-africaine. Cette équipe a cherché à savoir s'il y avait une influence de l'âge sur la réponse au protocole de superovulation, chez la chèvre de race Bœr. Ils ont comparé deux groupes d'animaux, un groupe de chèvres jeunes primipares (1 à 2 ans) et un groupe de multipares (3 à 4 ans), subissant le même protocole de SO. Ils ont montré que le nombre moyen de corps jaunes, de structures et d'embryons récoltés étaient significativement supérieurs chez les multipares. Alors qu'il n'y avait pas de différence entre les deux groupes pour le taux de fertilisation, les nombres moyens d'ovocytes non fécondés et d'embryons dégénérés, il n'en était pas de même pour le nombre moyen d'embryons transférables qui était plus important chez les multipares (LEHLGENYA K. C. et al., 2008). Peut-être pouvons-nous extrapoler cette conclusion à l'espèce bovine.

Sur le plan pratique, et d'après une discussion avec des vétérinaires de la société Embryovet, les vaches ont fait leurs preuves en matière de production et de morphologie, comparées aux génisses. En effet, les sélections s'effectuent en testant les descendance des animaux. Donc au sein d'un troupeau, il est préférable de collecter la femelle qui a déjà prouvé sa valeur génétique grâce à sa descendance (COLLEAU J. J., 1985). Mais il est à noter qu'une

génisse peut être collectée dès qu'elle est bien cyclée, en général entre 10 et 14 mois. C'est sans danger pour sa vie future, c'est-à-dire pour sa croissance, sa mamelle et sa reproduction ultérieure à condition que les règles de base de l'alimentation soient respectées.

Des recherches ont également été menées sur l'effet que pouvait avoir l'administration d'une dose totale de 22 UI de FSH sur des génisses pré-pubères de 7 mois. Pendant 14 jours, tous les follicules visibles à l'échographie transrectale ont été aspirés par Ovum Pick Up (OPU), puis pendant 3 jours des injections toutes les 12h de FSH à doses décroissantes ont été réalisées. Avant les injections de FSH, la population de follicules consistait en une majorité de petits follicules (inférieurs à 4 mm), une minorité de follicules moyens (4-10 mm) et juste quelques follicules de grande taille (supérieurs à 10 mm). Huit jours après les injections de FSH, une augmentation de 43% du nombre total de follicules était observée avec une population majoritairement représentée par des follicules de taille moyenne, une minorité de petits follicules et plusieurs grands follicules. Pour ce qui est des effets hormonaux, sur les 14 génisses, 3 ont montré une augmentation du taux de progestérone quelques jours après la FSH, mais aucune n'a montré de signes de production d'œstrogènes. Il a donc été conclu que l'administration de FSH sur des génisses pré-pubères augmentait le nombre et le diamètre des follicules, influençait la production de progestérone mais pas celle d'œstrogènes (DE ROOVER R. et al., 2001). C'est pourquoi la question d'un intérêt de réaliser des injections de FSH préalables à un protocole de SO chez des génisses se pose. En effet, elles paraissent contre-indiquées chez une femelle n'ayant pas encore eu de chaleurs de référence, sinon l'œstrus ne sera que faiblement exprimé et sera non-observé par l'éleveur.

(b) Age de la multipare

Une étude a été menée afin de voir si l'âge avancé de l'animal pouvait avoir un effet sur la capacité à produire des embryons. Ce travail a été conduit dans une ferme expérimentale au Brésil, sur 4 vaches de race Holstein et 4 vaches de race 5/8 Girolando, toutes avec un âge compris entre 10 et 14 ans. Au total, une Holstein et deux Girolando n'ont pas répondu au traitement de SO. Les trois autres Holstein ont produit 5 embryons viables au total, 3 complexes cumulo-ovocytaires dégénérés et 22 ovocytes non-fécondés. Les deux autres Girolando ont produit 2 embryons viables au total, 3 complexes cumulo-ovocytaires dégénérés et 4 ovocytes non-fécondés. Il a alors été conclu que les vaches âgées de plus de 10 ans produisent un nombre d'embryons viables plus faible (SANTOS FILHO A. S. et al., 2010).

2) Répétabilité des collectes

On peut se demander à quelle fréquence une même femelle peut être collectée. Pour avoir un début de réponse, un groupe de 20 génisses de race Holstein-Friesian ont été intégrées dans un programme de collecte d'embryons. Douze d'entre elles ont été collectées une fois par

mois sur 4 mois, avec à chaque fois un protocole de SO, et les résultats de chaque collecte ont été comparés. Il en ressortait que le nombre total d'embryons de grade I-II n'était pas significativement différent entre les collectes, que le nombre total d'embryons dégénérés et d'ovocytes non fertilisés décroissait de manière significative après la deuxième collecte, et que le nombre de corps jaunes décroissait lui aussi au fur et à mesure des collectes. On peut en conclure que quatre collectes consécutives en quatre mois est réalisable (LINDEBERG H. et al., 2005).

3) Existe-t-il un effet famille ?

Il est connu que le nombre d'embryons obtenu après une SO peut montrer une large variation selon les femelles donneuses. Cela peut en partie être expliqué par une différence dans l'organisation et dans le protocole de récolte des embryons, mais les résultats peuvent aussi être influencés par les caractéristiques spécifiques de l'animal. C'est pourquoi une étude a cherché à savoir s'il pouvait y avoir un effet famille sur la production d'embryons lors de superovulations. Une étude rétrospective a alors été menée entre 1994 et 2011 sur les collectes réalisées par le groupe CRV (Pays-Bas). Pour investiguer l'effet famille, ils ont étudié quatre taureaux dont au moins 3 filles avaient subi 10 collectes d'embryons au minimum. Les différences entre ces 4 taureaux étaient énormes. En effet, pour le taureau le moins prolifique, ses filles donnaient en moyenne 1,9 embryons par collecte, alors que pour le plus prolifique, ses filles en donnaient 14,1 par collecte. Il a donc été prouvé qu'il existe un effet famille important sur la production d'embryons lors de protocoles de SO (NOORDMAN J. W. J. et al., 2011).

Ces résultats peuvent avoir une application pratique pour la logistique des programmes d'élevage. En effet, il n'y aurait pas de corrélation entre le nombre d'embryons obtenus *in vivo* par collecte et celui obtenu par production d'embryons *in vitro* (résultats non montrés). Ceci pourrait être expliqué par le fait que, lors d'une fécondation *in vitro*, on s'affranchit de la probabilité qu'aucun spermatozoïde n'atteigne l'ovocyte. C'est pourquoi il pourrait être préférable d'intégrer les filles provenant de familles faibles productrices directement dans un programme de production d'embryons *in vitro* et non dans un programme de TE, afin d'obtenir plus d'embryons (NOORDMAN J. W. J. et al., 2011).

4) Cas des femelles ayant présenté des doubles ovulations

Concernant la SO des donneuses, une question se pose : les femelles ayant une prédisposition aux doubles ovulations sont-elles de meilleures candidates à la SO ? En effet, les doubles ovulations sont un phénomène croissant dans les troupeaux laitiers et sont probablement associées à une haute production laitière, même si cette hypothèse reste controversée selon les auteurs. Un groupe d'étude a alors comparé des résultats entre des vaches

de race Holstein avec deux corps jaunes et des animaux de même race ayant un seul corps jaune. Les animaux avec deux corps jaunes au début de la superstimulation étaient majoritairement des animaux en quatrième ou cinquième lactation (52%) et ont été collectés plus tard dans leur lactation (284 ± 152 jours après vêlage) par rapport aux animaux avec un seul corps jaune (250 ± 150 jours après vêlage). En termes de nombre de structures collectées, d'embryons viables et de taux de gestation, les animaux à corps jaune unique ont eu les meilleures réponses à la SO. Ces résultats indiquent que les donneuses avec deux corps jaunes sont moins adaptées à la SO et ne devraient pas être choisies (DETTERRER J. et al., 2009).

B) Sélection des receveuses

Un moyen de choisir les meilleures receveuses est l'examen clinique de l'animal avec une palpation transrectale de l'appareil génital et surtout des ovaires. De nos jours, à l'aide d'un échographe et de manière très rapide, il est possible de visualiser les ovaires et de se faciliter la tâche de sélection des receveuses. Des chercheurs polonais ont réalisé une étude en deux étapes ; première étape, ils ont classé les receveuses en différents groupes selon les structures présentes sur les ovaires palpés manuellement. Ils les classaient en bonnes receveuses, receveuses douteuses, receveuses insuffisantes, mauvaises receveuses et des non classées. La seconde étape consistait à échographier toutes les receveuses et de les reclasser de la même façon selon la taille du corps jaune lorsqu'il était présent. Après échographie, 26,6% des receveuses douteuses à la main étaient reclassées en bonnes receveuses après échographie, ce qui veut dire que sans échographe ils auraient pu passer à côté de ces bonnes receveuses. Donc pratiquer un simple examen clinique est une méthode plus restrictive pour choisir les bonnes receveuses que l'examen à l'aide d'un échographe qui permet de visualiser les structures ovariennes (JASKOWSKI JM et al., 2014).

C) Une conduite d'élevage particulière ?

1) Contrôle de l'aptitude des femelles à réaliser un transfert embryonnaire

(a) Chez les femelles donneuses

Sur les 30 dernières années, l'augmentation de la production laitière individuelle a été accompagnée d'une baisse de la fertilité des femelles hautes productrices. Le statut nutritionnel est indubitablement un des éléments majeurs influençant la fertilité, surtout le statut de la balance énergétique sur la période de péripartum. Quand l'apport énergétique dans la ration est insuffisant, les animaux mobilisent l'énergie dans leurs tissus pour la production laitière. Des vaches laitières hautes productrices peuvent avoir une balance énergétique négative pendant 20

semaines post-partum. Ceci est associé à un intervalle vêlage-première ovulation allongé, une grande proportion de cycles anormaux et une diminution de la réussite à l'insémination. La balance énergétique négative se traduit par des augmentations des concentrations sanguines en acides gras non estérifiés (AGNE) et en β -hydroxybutyrate (BHB). Ces taux représentent la mobilisation des tissus et sont directement ou indirectement associées à la fertilité. En plus de l'augmentation de ces taux, le déficit énergétique se traduit aussi par une glycémie et une insulémie diminuées. Or le glucose et l'insuline influencent directement la fonction de reproduction avec des actions sur le cerveau, les ovaires et le tractus génital (WATHES D. C. et al., 2004). C'est pourquoi avant de mettre en place un protocole de SO sur une femelle, il peut être utile d'en évaluer le statut énergétique afin d'estimer sa réponse.

(i) *Contrôle du statut énergétique*

◆ *La note d'état corporel*

Beaucoup d'éleveurs souhaitant pratiquer un transfert embryonnaire dans leur élevage ne savent pas toujours comment choisir les meilleures donneuses. Ils peuvent donc demander aux équipes comment choisir un animal donneur d'embryons. Comme élément de réponse, il est possible de leur dire de contrôler la note d'état corporel (NEC) au vêlage et trois semaines plus tard.

En effet, la NEC est importante à évaluer autour du vêlage car elle permet de prédire, en partie, une reprise de cyclicité retardée ou non. Une NEC trop élevée ou trop basse avant le vêlage peut être délétère, la NEC idéale au vêlage étant de 3,5 (WATHES D. C. et al., 2004).

De plus, il faut aussi estimer la NEC après le vêlage afin de voir s'il y a une perte d'état et la quantifier. En effet, il a été démontré que les vaches avec la plus grosse perte d'état entre le vêlage et dix semaines post-partum ont le plus grand nombre d'embryons dégénérés et les taux d'embryons viables les plus bas. Ainsi, il est conseillé de réaliser un contrôle de la NEC trois semaines après le vêlage sur les animaux à forte production laitière. Ce contrôle permettra d'estimer l'efficacité d'un traitement de SO sur ces animaux. La perte de points de NEC ne doit pas dépasser 1,5 (CARVALHO P. D. et al., 2012).

◆ *Acides gras non estérifiés et β -hydroxybutyrate*

La lactation peut avoir un effet sur la production d'embryons et plus précisément sur le développement embryonnaire précoce. Une étude a comparé deux groupes de vaches de race Holstein : un groupe composé de bêtes tariées immédiatement après le vêlage, et un groupe de bêtes productrices de lait après le vêlage. A 60 jours post-partum, les femelles ont été synchronisées dans les deux groupes, et deux jours plus tard, des embryons au stade 2-4 cellules

leurs ont été transférés dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune. Cinq jours après, les embryons ont été récupérés par lavage des cornes utérines, et les embryons au stade blastocyste ont été enregistrés. Afin de caractériser le statut métabolique de chaque femelle, des prises de sang étaient réalisées deux fois par semaine, de 15 jours avant le vêlage à 100 jours postpartum, pour mesurer les AGNE et le taux de BHB. Les concentrations en AGNE et BHB étaient plus élevées dans le groupe des femelles en lactation par rapport au groupe des femelles tarées. Concernant les embryons, les nombres collectés étaient semblables entre les deux groupes, mais les femelles tarées montraient des blastocystes plus développés. En conclusion, la reproduction des femelles en production est compromise par rapport aux femelles tarées. En effet, les femelles en début de lactation présentent un déficit énergétique comparées aux femelles tarées (MAILLO V. et al., 2011).

Pour s'affranchir du risque d'une faible réponse d'une femelle en lactation à une SO, il peut être utile de contrôler le taux d'AGNE sanguin dans les 3 à 10 semaines post-partum. En effet, ils sont négativement corrélés avec le taux d'embryons viables et positivement avec le taux d'embryons dégénérés. Ainsi, on peut conseiller un contrôle du taux d'AGNE aux environs des trois semaines post-partum, en tolérant un seuil maximum de 0,5 mmol/L. Ce contrôle peut être un moyen de prédire l'efficacité d'un traitement de SO sur les animaux à forte production laitière (CARVALHO P. D. et al., 2012).

◆ *Glycémie et insulïnémie*

Dans l'étude de MAILLO V. *et al* (2003) décrite dans le paragraphe précédent, la glycémie et l'insulïnémie ont également été mesurées sur les femelles des deux groupes. Les concentrations sanguines en glucose et en insuline étaient plus faibles dans le groupe des vaches en lactation par rapport au groupe des vaches tarées. Donc les vaches tarées qui montrent des blastocystes plus développés ont des glycémies et insulïnémies supérieures aux vaches en lactation (MAILLO V. et al., 2011).

On en conclut que le déficit énergétique peut être objectivé par une étude de la NEC, des AGNE sanguins, des BHB sanguins, de la glycémie et de l'insulïnémie, ensemble ou séparément.

◆ *Taux de matière utile*

Regarder les taux de matière utile dans le lait avant de débiter un protocole de SO sur une femelle en lactation peut donner des informations. En effet, il peut exister un lien notamment entre ces taux et la réponse de la femelle au protocole. Une étude a été réalisée sur des vaches de race Montbéliarde étant entre leur deuxième et leur septième lactation. Ces vaches étaient toutes à moins de 150 jours post-partum. Ces animaux ont été stimulés avec un protocole de SO avec une dose totale de 500 µg de FSH. Les embryons ont été collectés au

septième jour après l'insémination artificielle, et ont été décomptés en nombre total et nombre viable. Il a été reporté que le taux protéique (TP) était en lien avec la supplémentation en énergie, alors que le taux butyreux (TB) était influencé par le type d'alimentation et décroissait avec une quantité importante de concentrés. Il a été émis comme hypothèse que les donneuses avec un haut TP avant la collecte, et/ou avec des TP et TB proches, étaient plus susceptibles d'avoir été nourries avec une ration à haute valeur énergétique qui stimulerait alors la production d'embryons (Tableau 4). Ce lien existant entre les statuts énergétiques et la production embryonnaire permettrait de prédire la réponse d'une donneuse à un traitement de SO en évaluant les taux de matière utile dans le lait qu'elle produit (MANCIAUX L. et al., 2003).

Le dernier taux protéique (TP) avant la collecte des embryons est en lien avec le nombre d'embryons produits par la femelle donneuse. Ainsi, un TP élevé (> 32 g/kg) lors du dernier contrôle laitier avant la collecte peut indiquer à l'éleveur et au technicien pratiquant le TE que le nombre d'embryons produits sera élevé.

Calving to collection interval (days)	Protein content at last control				TOTAL	
	≤ 32 g/kg		>32 g/kg		TOT	VIA
	TOT	VIA	TOT	VIA		
≤ 90	9.0±6.1	5.3±4.3	12.2±7.1	7.9±5.4	9.9±6.5 ^a	6.0±4.8 ^c
> 90	8.5±4.3	5.0±4.2	8.9±7.6	5.8±6.3	8.7±5.8 ^b	5.3±5.1 ^d
TOTAL	8.8±5.4 ^a	5.1±4.2 ^c	10.3±7.6 ^b	6.6±6.0 ^d	a vs b, c vs d, P<0,05	

Tableau 4 : Nombres moyens d'embryons (totaux et viables) selon le TP et l'intervalle vêlage-collecte des embryons (MANCIAUX L. et al., 2003)

(Calving to collection interval (days) : Intervalle vêlage-collecte des embryons (en jours), Protein content at last control : Taux protéique au dernier contrôle, TOT : Nombre d'embryons, VIA : Nombre d'embryons viables)

◆ Cholestérolémie

Une étude a montré qu'une cholestérolémie importante avait un effet négatif sur la production embryonnaire, mais que, contrairement à beaucoup d'études, les animaux qui produisaient le moins de lait étaient ceux qui produisaient le moins d'embryons transférables et d'ovocytes non-fertilisés. Cette faible production lactée associée à une concentration en triglycérides sanguins élevée semblait indiquer la présence d'un déficit énergétique chez ces animaux. Tant que les femelles gardent une production laitière élevée, cela semble indiquer l'absence de déficit énergétique, donc elles peuvent produire un grand nombre d'embryons transférables. Selon l'auteur, les concentrations plasmatiques en AGNE et en BHB donnent plus d'informations que la cholestérolémie sur le statut énergétique de l'animal (LAIZEAU J. S. et al., 2001).

(ii) *Contrôle de l'azotémie*

L'impact de l'urémie sur la production d'embryons a également été évalué. Une étude a été réalisée sur deux groupes de vaches Norvégiennes qui en étaient à leur dixième lactation, avec deux régimes différents. Pour les deux groupes le régime de base était identique, et pour un groupe il y avait un supplément d'urée dans la ration de manière à ce que l'urémie soit au moins de 3 mmol/l durant le premier mois de lactation. Pendant deux mois et demi chaque groupe recevait son alimentation, puis un protocole de SO et de collecte d'embryons a été mis en place. Après les collectes, les deux groupes ont reçu une alimentation standard pendant un mois et demi, avant d'inverser leur ration et de nouveau mettre en place un protocole de SO et de collecte en suivant le même schéma que précédemment. Après une analyse statistique, il a été montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les groupes sur le nombre total d'embryons et le nombre d'embryons viables (Tableau 5), malgré une différence du taux d'urée dans le lait (KOMMISRUDE. et al., 2002).

	Group 1		Group 2	
	Period 1	Period 2	Period 1	Period 2
Flushings, N	4*	4*	4**	5
Total no of embryos, X	9	11	10.3	15.4
No good quality embryos, X	2.3	9	7	13
Milk urea mmol/l. (mean±SD)	4.57 ± 0.72	7.81 ± 0.97	8.92 ± 0.54	3.61 ± 0.71

* One cow in Group 1 was excluded

** One cow in Group 2 was in anestrus at time for superovulation in period 1

Tableau 5 : Résultats des collectes d'embryons selon le taux d'urée dans le lait, avec deux régimes différents (KOMMISRUDE. et al., 2002)

(Flushings : Nombre de collectes, Total no of embryos : Nombre total d'embryons, No good quality embryos : Nombre d'embryons de mauvaise qualité, Milk urea mmol/l : Taux d'urée dans le lait en mmol/l)

On peut en conclure qu'il n'est pas nécessaire d'apporter de l'urée par la ration car l'urée n'influence que très peu la production d'embryons par une femelle donneuse.

Cependant, on peut remarquer que cela ne fait pas consensus. Pour d'autres auteurs, l'urémie serait associée à une baisse de la fertilité de la femelle. Des concentrations sanguines élevées en urée seraient en effet souvent associées à une ammoniémie élevée qui peut avoir des effets toxiques directs sur les ovocytes ou les très jeunes embryons (WATHES D. C. et al., 2004).

On peut alors en conclure qu'il n'existe pas de recette miracle pour préparer une femelle à être une donneuse d'embryons, mais il existe plusieurs paramètres à contrôler qui permettent d'objectiver le statut énergétique de l'animal. Il faut ainsi respecter les principes de base de l'alimentation et porter en particulier son attention sur l'apport énergétique de la ration qui doit être suffisant. L'apport en azote de la ration doit également être contrôlé. Enfin, et bien que cela

n'ait pas été abordé dans cette partie, il convient de surveiller l'apport en fibres pour stimuler la rumination ainsi que les apports minéro-vitaminiques.

(b) Note d'état corporel et statut nutritionnel des femelles receveuses

En ce qui concerne les receveuses, outre la présence d'un corps jaune, leur statut alimentaire doit leur permettre d'assurer une gestation. En effet, un régime alimentaire bien adapté permet d'utiliser une grande partie des receveuses présentées, alors que toutes les receveuses peuvent être inaptes si l'alimentation est déséquilibrée.

En Finlande, une étude a montré que les receveuses avec une NEC inférieure à trois le jour du transfert de l'embryon ne peuvent être choisies, au risque de voir le taux de gestation diminuer. C'est pourquoi, dans ce pays, les vétérinaires des équipes de transfert embryonnaire recommande une NEC de 3-4 sur les receveuses laitières le jour du transfert embryonnaire (LINDEBERG H. et al., 2008).

Le statut nutritionnel de la receveuse est un facteur important influençant les taux de gestation après un transfert embryonnaire. L'administration orale de propylène glycol, un précurseur de la néoglucogénèse, augmente le pourcentage molaire de propionate ruminal qui sera transformé en pyruvate et éventuellement en glucose dans le foie. Lors d'une étude, des génisses étaient synchronisées grâce à deux injections de $\text{PGF}_{2\alpha}$ à 11 jours d'intervalle, puis étaient séparées en deux groupes. Un groupe recevant 250 mL de propylène glycol tous les jours pendant 20 jours dès la première injection de $\text{PGF}_{2\alpha}$, et un groupe ne recevant pas de propylène glycol. Le jour 0 correspondait à la détection du début des chaleurs. Les concentrations en progestérone (P4) étaient mesurées au 7 jours plus tard et le corps jaune était évalué de 1 (excellent) à 3 (rejeté) sur les receveuses. Il a été montré que la qualité du corps jaune était positivement corrélée au taux de P4, et que cette relation était plus marquée dans le groupe des receveuses sans propylène glycol (Tableau 6). L'administration de propylène glycol augmentait non seulement la concentration en P4, quelle que soit la qualité du corps jaune (données non publiées), mais aussi la qualité du corps jaune. On en conclut alors que l'administration de propylène glycol mène à une utilisation optimisée des receveuses.

Treatment	N	P4	CL	N selected for ET (%)
Propylene glycol	75	5.87±0.36 ^x	1.46±0.08 ^x	52 (69) ^x
Untreated	74	4.47±0.35 ^y	2.11±0.10 ^y	28 (38) ^y

Tableau 6 : Comparaison de la progestéronémie, de la qualité des corps jaunes et du nombres d'embryons sélectionnés pour un transfert entre le groupe des génisses ayant reçu du propylène glycol (Propylen glycol) et le groupe des génisses n'en ayant pas reçu (Untreated) au jour 7 après la détection des chaleurs.

(N : Nombre d'individus dans les groupes, P4 : Progestéronémie (ng/ml), CL : Qualité du corps jaune, N selected for ET : Nombre de génisses sélectionnées comme receveuses pour un transfert)

L'étude montrait aussi que les taux de gestation et la qualité du corps jaune étaient positivement corrélés chez les receveuses ayant eu du propylène glycol (Tableau 7). Les génisses ayant reçu du propylène glycol avaient des taux de gestation supérieurs à ceux des génisses n'ayant pas reçu de propylène glycol. Cette augmentation des taux de gestation pour les génisses ayant reçu du propylène glycol pouvait être en partie expliquée par une augmentation de la qualité de leur corps jaune (HIDALGO C. O. et al., 2002).

Treatment	N	P4	CL	PR (%)
Propylene glycol	52	6.16±0.41	1.27±0.06	65±6.6 ^a
Untreated	28	5.76±0.51	1.10±0.06	46±9.6 ^b

Tableau 7 : Comparaison de la progestéronémie, de la qualité des corps jaunes au jour 7 après le début des chaleurs, et des taux de gestation au jour 60 après le transfert d'un embryon congelé, entre le groupe des génisses ayant reçu du propylène glycol (Propylen glycol) et le groupe des génisses n'en ayant pas reçu (Untreated).

(Progestéronémie (P4 en ng/ml) et qualité du corps jaune (CL) au jour 7 après le début des chaleurs, et taux de gestation (PR) au jour 60 sur les génisses ayant reçu un embryon congelé)

Ainsi, l'apport quotidien de propylène glycol pendant 20 jours avant l'implantation d'un embryon permet d'augmenter les taux de gestations des receveuses. Un groupe d'étude a cherché une potentielle différence entre une supplémentation en propylène glycol pendant 10 jours avant l'implantation ou pendant 20 jours avant. La progestéronémie a été mesurée, de même que la qualité du corps jaune au moment de l'implantation et le taux de gestation à 60 jours. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux régimes. C'est pourquoi donner du propylène glycol pendant 10 jours au lieu de 20 jours n'a pas d'effets néfastes sur le taux de gestation et est plus intéressant d'un point de vue économique (HIDALGO C. O. et al., 2005).

2) Effets du stress

Comme cela a déjà été démontré, le stress a des effets négatifs sur la fonction reproductrice d'un animal. Dans le cadre du TE, on va s'intéresser aux stress qui peuvent être engendrés, et comment les équipes peuvent les gérer. Bien qu'il y ait une part technique dans la réussite du maintien d'un taux de gestation assez élevé par ces équipes, il y a aussi quelques bons conseils à donner à l'éleveur. Des conseils simples tels que de garder les animaux donneurs proches de l'exploitation pour éviter de leur faire subir un transport toutes les 12h pendant la période de stimulation des ovaires, et il en est de même pour les receveuses qui doivent rester au calme après la synchronisation. Le moment précis des pertes embryonnaires est inconnu, mais les effets des stress post-œstrus peuvent persister jusqu'à la date de la transplantation embryonnaire. C'est pourquoi beaucoup d'équipes de transfert embryonnaire conseillent les éleveurs afin de réduire le stress des donneuses et des receveuses. Aussi, il incombe aux équipes de transfert embryonnaire de mettre en place des procédures adaptées afin de réduire le stress et améliorer le bien-être animal durant leurs activités (DOBSON H., 2003).

Les mouvements d'animaux, changements de lots, ou encore les regroupements d'animaux sont considérés comme étant un autre type de stress qui pourrait influencer la réussite du transfert. Une équipe de recherche Néerlandaise a cherché à observer quelle était l'influence d'un regroupement d'animaux sur des génisses devant subir une collecte d'embryons. Habituellement, les génisses étaient regroupées en lot de 15 dans le centre de reproduction de l'université. Pour tester le stress « changement de lot », certaines génisses ont été changées de lot avant la SO. Ainsi, les génisses étaient classées en deux groupes : celles ayant subi un changement de lot, considéré comme un stress, et celle ne changeant pas de lot, considérées comme non stressées. Les deux premières collectes pour chaque génisse étaient analysées, et il a été mis en évidence qu'il n'y avait aucune différence significative de production d'embryons totaux et viables entre les deux groupes. Ces résultats montrent que les regroupements de génisses durant la période de production d'embryons n'affectent pas les résultats des traitements de SO au sein de cette structure (HEIJNK J. B. C. et al., 2008). La question est de savoir si ces résultats sont extrapolables à l'ensemble des élevages ou non. Le facteur stress en élevage par des mouvements d'animaux est toujours à considérer tout de même.

Beaucoup d'attention est portée sur les femelles donneuses, mais il ne faut également pas oublier les receveuses, qui ne doivent pas non plus subir trop de stress. C'est pourquoi, il peut être conseillé que toutes sortes d'actions génératrices de stress telles que des traitements, vaccinations ou encore transitions alimentaires, soient organisées de manière à éviter tout stress dans le mois qui précède la pose de l'embryon et jusqu'à la confirmation de la gestation.

3) Absence de traitement

Autre élément à considérer pour le choix des donneuses, il est préférable qu'elles ne reçoivent aucun traitement, surtout un traitement antiinflammatoire non stéroïdien (AINS) et en particulier du kétoprofène. En effet, il a été montré que l'administration de cette molécule en pré et péri-ovulation diminuait la croissance folliculaire finale menant à une perturbation du processus normal d'ovulation pouvant aller jusqu'à une anovulation (KAFI M. and RAHMANI M., 2003). On peut se demander si cette conclusion peut être étendue à l'ensemble des AINS utilisés en médecine des bovins.

4) Une saison plus propice ?

Une étude rétrospective a été menée en République Tchèque sur les transferts embryonnaires réalisés entre 1991 et 2004 sur des vaches allaitantes. L'objectif de cette étude était de voir si la saison avait une influence sur le nombre d'embryons produits et leur qualité. En conclusion il en ressortait que l'hiver est la période de l'année avec les résultats les plus mauvais, alors que le printemps, l'été et l'automne sont les saisons les plus propices aux traitements de SO avec de meilleurs résultats (SLEZAKOVA M. et al., 2007). Les résultats de cette étude semblent néanmoins difficilement extrapolables à un pays comme la France du fait des différences de climats et donc du stress thermique engendré par les saisons.

D) L'insémination de la femelle donneuse

1) Quand pratiquer l'insémination ?

De manière général, l'insémination se fait de manière artificielle (IA) lorsque les chaleurs sont détectées ou lors du moment stipulé par le protocole de synchronisation. Selon le protocole de SO utilisé, l'IA peut ainsi se faire après observation des chaleurs ou à l'aveugle. En effet, quand la femelle est stimulée grâce au protocole Ovsynch (à base de GnRH), l'IA est réalisée en aveugle 16 à 20h après la seconde injection de GnRH. Si la femelle est stimulée grâce à l'utilisation du protocole Cosynch (à base de GnRH), l'IA est réalisée en aveugle au même moment que la seconde injection de GnRH.

Lorsqu'un dispositif libérant de la progestérone est utilisé, l'IA est réalisée sur observation des chaleurs. En effet, environ 48h après le retrait du dispositif libérant de la progestérone la femelle doit normalement exprimer ses chaleurs.

2) Cas de l'insémination artificielle avec une semence sexée

Il est connu qu'une insémination artificielle avec une semence sexée a un pourcentage de réussite plus faible qu'avec une semence non sexée. C'est pourquoi il vaut peut-être mieux adapter le protocole de SO à cette particularité pour augmenter les chances de réussite.

Une étude a montré qu'afin d'optimiser au mieux l'utilisation de semence sexée dans le cadre de l'IA à la suite d'un protocole de synchronisation (2 injections de PGF_{2α}), il est préférable d'objectiver l'ovulation grâce à l'utilisation d'un échographe. En effet, sur deux groupes de vaches Holstein, le groupe contrôle a été inséminé, avec de la semence sexée, 48 heures, 60 heures et 72 heures après la première injection de PGF_{2α}. Pour le groupe expérimental, les animaux étaient examinés par échographie transrectale à partir de la dernière injection de FSH jusqu'à visualiser l'ovulation. Les femelles de ce groupe étaient inséminées au moment de la visualisation de l'ovulation et 12 heures plus tard. Sept jours plus tard, les embryons ont été collectés. Pour le groupe contrôle, 14% des embryons collectés étaient classés comme transférables, alors que pour le groupe expérimental 74% des embryons étaient transférables. Ces premières données montrent que la détection de l'ovulation pour l'insémination permet d'obtenir un plus grand nombre d'embryons transférables dans les programmes de SO utilisant de la semence sexée congelée (HOLASEK R. et al., 2009). Toutefois, il est reconnu que la détection des chaleurs est un préalable très important avant la réalisation d'une IA suite à l'utilisation d'un protocole de synchronisation utilisant 2 injections de PGF_{2α}. Cette donnée n'est pas spécifique à la semence sexée. Les taux de gestation très bas dans le groupe contrôle semblent confirmer cette donnée. Il aurait donc été intéressant dans cette étude de comparer les taux de gestation suite à une détection des chaleurs et suite à la détection de l'ovulation grâce à l'échographie afin de voir si la détection de l'ovulation apporte un bénéfice réel.

E) Collecte des embryons

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

1) Récupération des embryons

- (a) Collecte des embryons par lavage des cornes utérines

Le jour de la collecte, les embryons sont récupérés grâce à un lavage de chaque corne utérine avec environ 500 mL de solution DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). Pour cela, une sonde 3 voies est utilisée. Cette sonde permet à l'aide d'une seringue d'aspirer de la solution DPBS puis de l'injecter dans la tubulure qui va à l'utérus, grâce à un système manuel d'occlusion des tubulures (Figure 16).



Figure 16 : Système d'aspiration et d'injection du liquide de collecte (photo de S. DUBOIS)

La sonde introduite par la vulve, est mise en place de manière trans-cervicale. En effet, son extrémité arrive au-delà du col utérin et est placée dans une corne utérine. Dans un deuxième temps, la sonde sera déplacée et placée dans l'autre corne. Pour une installation correcte, le technicien palpe l'utérus grâce à une palpation transrectale et peut ainsi guider la sonde. La sonde est mise en place dans l'utérus de manière stérile. Lorsque la sonde est en place, un ballonnet est gonflé afin de stabiliser le système (Figure 17).

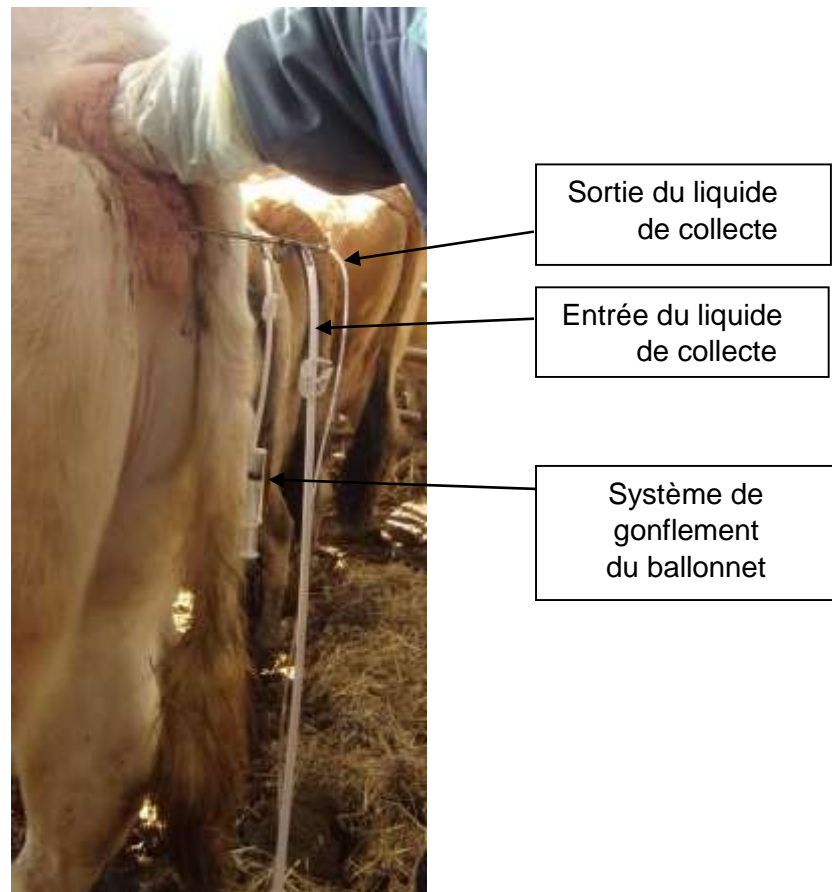


Figure 17 : Sonde 3 voies en place sur l'animal (photo de S. DUBOIS)

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

Lorsque le liquide de collecte est récupéré, ce dernier passe par un filtre sur lequel sont récupérés les embryons (Figure 18). Une fois le lavage de la première corne utérine terminé, le pistolet est mis en place dans la seconde corne utérine, et la même opération est réalisée.

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

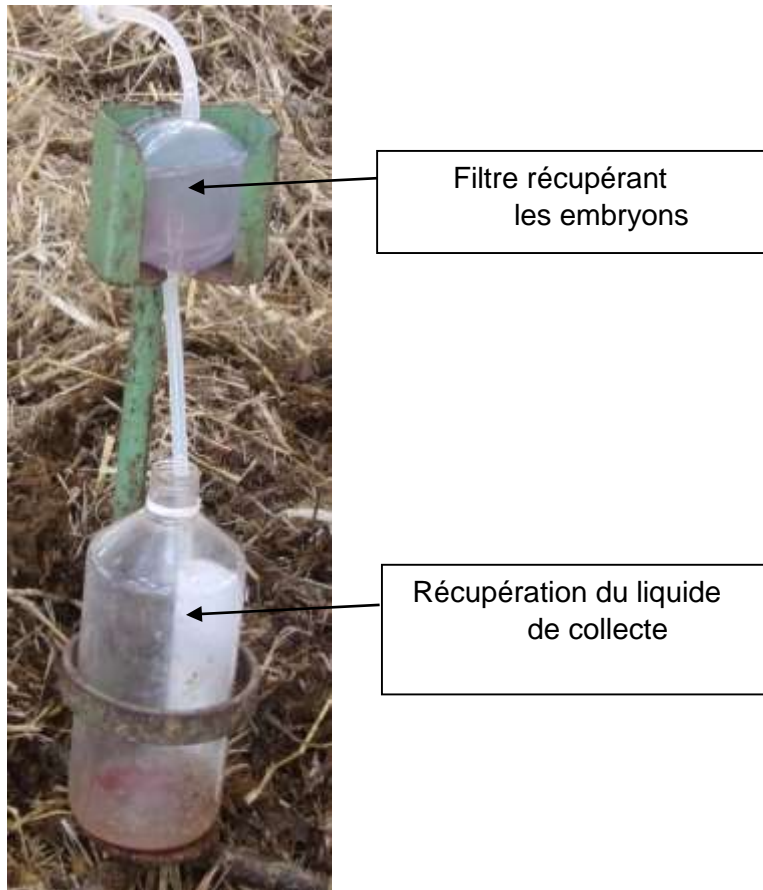


Figure 18 : Filtre récupérant les embryons lors du passage du liquide de collecte (photo de S. DUBOIS)

(b) Utilisation de molécules utérotoniques associées à un second lavage utérin

Un groupe de recherche a testé l'effet de l'utilisation de molécules utérotoniques qui faciliterait la récupération des embryons par des contractions myométriales. Après la superstimulation, les 174 vaches étaient divisées en 5 groupes. Chaque groupe recevait ou non une injection de Dinoprost à dose lutéolytique (25 mg par voie intramusculaire) 12 à 16h avant la collecte, de même qu'une injection d'ocytocine (10 UI par voie intraveineuse) au début de la collecte (Tableau 8). Une première collecte était réalisée par un premier lavage des cornes utérines, puis un second lavage utérin était réalisé de la même manière 30 minutes plus tard sur les groupes A, B, C et D afin de collecter de possibles embryons restants. Les résultats objectivaient que le meilleur taux de récupération est obtenu avec l'utilisation du dinoprost seul après un ou deux lavages. Ainsi, il pourrait être recommandé de traiter les donneuses avec une dose lutéolytique de Dinoprost 12 à 16 heures avant la collecte des embryons afin d'obtenir le meilleur taux de récupération des embryons. Ensuite, l'idéal serait de faire un second lavage utérin pour améliorer au maximum le taux de récupération des embryons (WOLGAST T. et al., 2008).

	N	Taux de récupération d'embryons au 1 ^{er} lavage	Taux de récupération d'embryons sur l'ensemble des deux lavages
Groupe A (dinoprost + ocytocine)	36	78,1%	81,6%
Groupe B (dinoprost + placebo)	34	81,2%	83,5%
Groupe C (placebo + ocytocine)	37	74,7%	78%
Groupe D (placebo + placebo)	31	72,4%	79,1%
Groupe E (Aucun traitement)	36	73,9%	

Tableau 8 : Résultats des taux de récupération des embryons après un ou deux lavages de récupération

(c) Utilisation d'un second lavage utérin

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

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

(d) Influence de la durée des différentes étapes d'une collecte sur la réussite de la transplantation embryonnaire

Au cours d'une session de collecte d'embryons sur des animaux donneurs et de transfert sur des animaux receveurs, plusieurs étapes ont des durées variables selon les techniciens et les conditions. Dans une étude, la plus grande variabilité a été observée pour l'intervalle de temps entre la fin du lavage et le début de la recherche des embryons sous la loupe binoculaire. Cette phase est principalement influencée par le nombre de femelles donneuses dont doit s'occuper un technicien. Le nombre de femelles donneuses dont doit s'occuper un technicien influence aussi significativement l'intervalle de temps entre la fin de l'évaluation des embryons et leur

transplantation ou leur congélation. La durée de l'étape de recherche et d'évaluation des embryons est influencée par le nombre d'embryons collectés par donneuse. Les résultats de cette étude montraient une grande variabilité de la durée de la phase *in vitro* et l'influence importante du nombre de femelles donneuses dont doit s'occuper un technicien sur cette variabilité. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'influence de la durée de la phase *in vitro* sur les taux de gestation des femelles receveuses (BOURGOIN G. et al., 2004).

Les résultats d'une étude ont montré que de bons taux de gestation pouvaient être atteints avec un délai de plusieurs heures entre la collecte et le transfert, quand la qualité de l'embryon et la parité de la receveuse sont optimales. Pour démarrer les transferts, les embryons sont montés dans des paillettes. Chaque embryon est monté seul dans une paillette qui servira à son transfert. Le temps que passe l'embryon dans cette paillette doit être minimal et inférieur à 30 minutes. En effet, lorsque l'embryon est dans la paillette, son environnement est défavorable car il y a une faible quantité de milieu. De plus ce milieu varie rapidement en fonction des conditions environnementales comme la température, il peut donc rapidement altérer l'embryon (PONSART C. et al., 2005).

2) Sélection des embryons viables : critères IETS

Il existe des systèmes de classification standards décrivant le stade de développement embryonnaire et la qualité de l'embryon (Figure 19). La classification pour le stade de développement est un système numérique gradué allant de « 1 » (ovocyte non-fertilisé ou embryon à une cellule) à « 9 » (blastocyste éclos) (ROBERTSON I. and NELSON R. E., 2010).

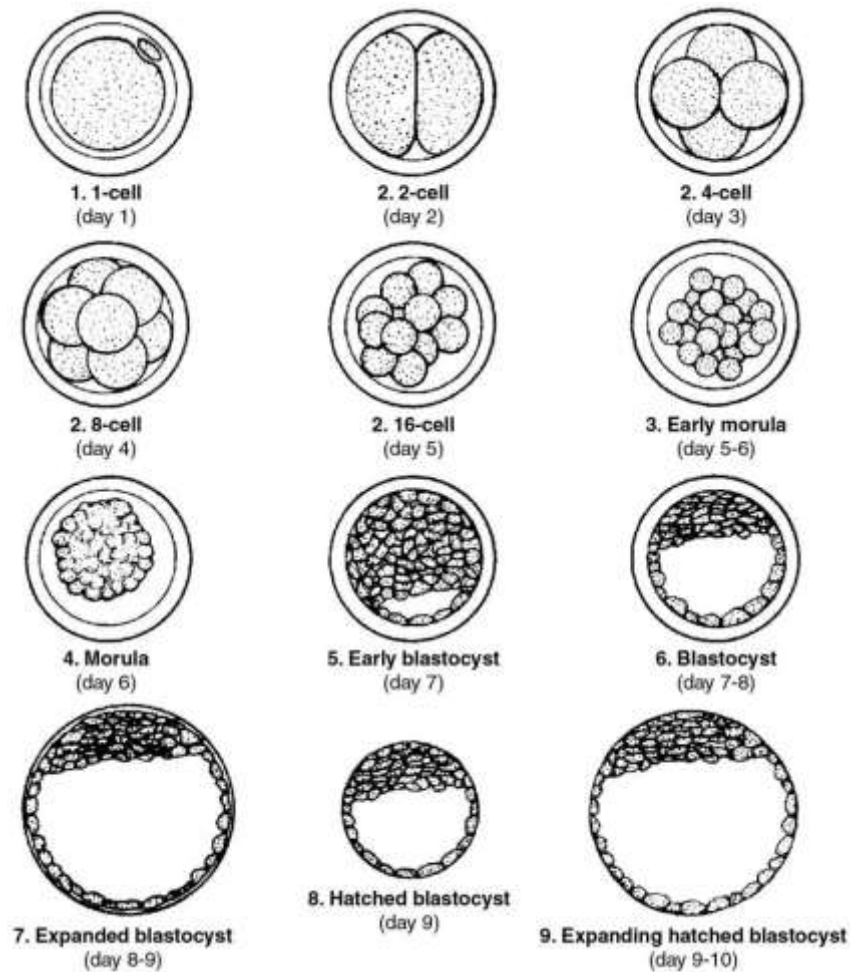


Figure 19 : Système numérique de classification des étapes du développement embryonnaire

(ROBERTSON I. and NELSON R. E., 2010)

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

- Qualité 1 : qualité excellente ou bonne (Figure 20). La masse embryonnaire est sphérique et symétrique avec des blastomères individualisables uniformes en taille, couleur et densité. Les irrégularités devraient être relativement mineures, au moins 85% du matériel cellulaire doit être intact et l'embryon est viable. La zone pellucide doit être lisse et ne doit pas avoir de surfaces concaves qui pourraient favoriser une adhésion de l'embryon à la boîte de Petri ou à la paillette.

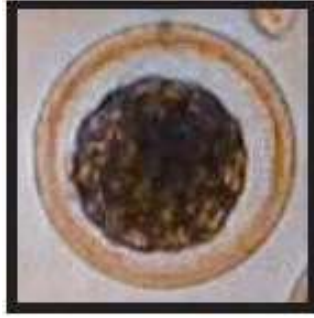


Figure 20 : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 1

(WRIGHT J. M., 2010)

- Qualité 2 : qualité acceptable (Figure 21). Des irrégularités de la masse embryonnaire sont modérées mais plus nombreuses. Ces irrégularités peuvent se situer au niveau de la forme de la masse embryonnaire ou au niveau de la taille, de la couleur et de la densité des cellules. Au moins 50% du matériel cellulaire est intact.

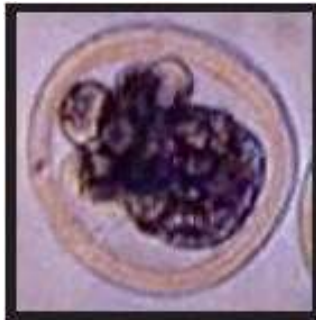


Figure 21 : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 2

(WRIGHT J. M., 2010)

- Qualité 3 : qualité pauvre (Figure 22). Il y a présence d'irrégularités majeures dans la forme de la masse embryonnaire ou dans la taille, couleur et la densité des blastomères. Au moins 25% du matériel cellulaire est intact et l'embryon est viable.

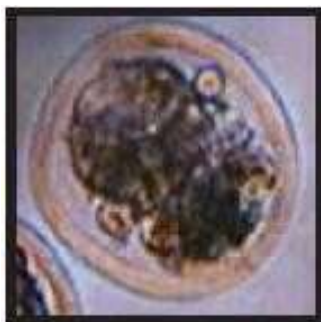


Figure 22 : J6 du développement, Morula (stade 4), Qualité 3

(WRIGHT J. M., 2010)

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

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

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

3) Les bains

Après évaluation de leur qualité, les embryons sélectionnés sont lavés dans dix bains de PBS (Phosphate Buffered Saline) successifs afin d'éliminer la présence éventuelle des bactéries et des virus. Cette pratique donne la quasi-certitude d'utiliser des embryons sains.

Les changements de bain sont effectués avec autant de pipettes qu'il y a de manipulations différentes. De plus, il est recommandé que le rapport entre le volume de milieu contenu dans la micropipette (avec les embryons) et le volume de chaque bain soit d'au moins 1/100.

Plus de détails sont donnés dans la dernière partie sur la gestion sanitaire du transfert embryonnaire.

4) Sexage possible des embryons viables

En France, la technique de sexage utilisée a été élaborée par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), les laboratoires Mérioux et l'UNCEIA en 1990. La biopsie par coupe de quelques cellules embryonnaires est réalisée sous microscope. Ensuite, l'ADN est extrait de ces cellules, la séquence spécifique de l'ADN du mâle et une séquence autosomale sont amplifiées par PCR. La détection de ces séquences est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose. La détermination du sexe est permise par le nombre de bandes observé :

- Deux bandes pour un mâle ; une correspondant à la séquence mâle et l'autre à la séquence autosomale.
- Une bande pour une femelle ; correspondant à la séquence autosomale.

Le sexage est efficace à 95%, et cette efficacité est influencée par l'expérience du technicien et la qualité de l'amplification. La précision du sexage est quant à elle supérieure à 98% (PONSART C. et al., 2006).

En 1998, les taux de gestation obtenus en ferme par les équipes adhérentes à l'UNCEIA ont été de 56% pour les embryons sexés frais et de 42% pour les embryons sexés congelés. En 2005, les résultats obtenus avec des embryons congelés ont atteint 59% pour la première fois. De plus, depuis 2000, la méthode a été simplifiée afin de diminuer le temps nécessaire au sexage (PONSART C. et al., 2006). De nos jours, le protocole (centrifugation des tubes contenant les biopsies, dénaturation de l'ADN, ajout du réactif, amplification de la séquence d'intérêt par PCR, dépôt de l'échantillon sur le gel et électrophorèse) permet le sexage des embryons en 140 minutes (LACAZE S. et al., 2007). Ceci a facilité l'organisation des chantiers de sexage et le transfert d'embryons à l'état frais. A l'état frais, les taux de gestation sont compris entre 57 et 64%. Les variations sont principalement liées à la parité des femelles receveuses, car comme dans le cas du transfert classique (embryons non biopsiés), les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les transferts sont réalisés chez des génisses. Les variations sont également liées à l'expérience du praticien qui réalise la biopsie (PONSART C. et al., 2006).

Une étude sur le terrain réalisée avec l'équipe de transfert embryonnaire de MIDATEST confirme que cette procédure de sexage est efficace sur des embryons composés d'au moins 4 cellules. Cette étude montre également que la transplantation d'embryons biopsiés puis congelés-décongelés, atteint des taux de gestation similaires à ceux obtenus avec des embryons intacts congelés (LACAZE S. et al., 2007).

Le résultat du sexage est obtenu en 2 heures, ce qui est compatible avec une activité commerciale de transfert embryonnaire. Malgré la très bonne efficacité du sexage, son utilisation sur le terrain est limitée en raison des coûts supplémentaires qu'engendrent les biopsies et la PCR, mais aussi parce que les embryons micromanipulés sont plus sensibles aux procédures de congélation et décongélation. De plus, la PCR est une technologie très sensible qui peut être influencée par du matériel cellulaire contaminant. Dans des conditions de terrain, elle doit donc être utilisée avec précaution.

Sur 5 ans, une étude a montré que dans les conditions de terrain, l'efficacité du sexage peut être améliorée. De juin 1996 à mai 2000, 1057 embryons ont été sexés. Sur la première partie de l'étude (1996-1997), 291 biopsies ont été collectées en fermes et envoyées dans une station de transfert embryonnaire. Dans la seconde partie de l'étude (1998-2000), les 766 biopsies collectées ont été sexées à la ferme dans des conditions de terrain par une équipe de transfert embryonnaire en utilisant la détection par PCR d'une séquence génomique spécifique du chromosome Y. L'efficacité du diagnostic du sexe est passée de 80% en 1996 à 91,6% en 2000 (GELDHOF A. et al., 2000).

On peut par ailleurs se poser la question suivante : le fait de biopsier un embryon au stade blastocyste réduit-il la probabilité d'obtenir une gestation après implantation chez une

femelle receveuse ? Des résultats d'études montrent que le transfert direct d'embryons sexés et donc biopsiés, congelés-décongelés, permet d'obtenir des taux de gestation similaires par rapport à des embryons congelés intacts. Ces études montrent aussi que les meilleurs taux de gestation obtenus avec des embryons micromanipulés le sont avec des génisses utilisées comme femelles receveuses (LACAZE S. et al., 2007).

Le sexage des embryons a ouvert la voie au développement de diagnostic prénatal avec la révolution des outils génomiques pour la sélection assistée par marqueurs (SAM) (HEYMAN Y., 2010).

Les résultats d'une étude ont montré que le génotypage d'un grand nombre de marqueurs provenant de biopsies après une amplification du génome dans sa totalité est réalisable dans les conditions de terrain. Un large nombre de biopsies est requis pour évaluer la fiabilité de cette méthode qui permettrait le développement de la SAM pour les embryons (LE BOURHIS D. et al., 2008).

F) Le transfert d'embryons frais

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

Le transfert de l'embryon se fait à l'aide de ce que l'on appelle une sonde, comme pour une insémination artificielle. L'objectif est de traverser le col avec cet outil sur lequel se trouve la paillette, et d'implanter l'embryon dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune de la receveuse. La qualité des corps jaunes, et donc l'identification de la corne utérine qui recevra l'embryon doit être évaluée au préalable afin de connaître le nombre de receveuses aptes à être gestantes.

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

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

Comme la mise en place de l'embryon est réalisée à l'aide d'une sonde passée au travers du col de l'utérus, on peut être amené à penser que cela provoque une inflammation. C'est

pourquoi l'utilisation d'un anti-inflammatoire a été étudiée. Une étude a montré que l'utilisation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien, en l'occurrence la Flunixin-Méglumine à la dose de 830 mg par animal en intramusculaire immédiatement après le transfert embryonnaire, n'induit pas d'amélioration statistiquement significative des taux de gestation (CZELADKO J. et al., 2009).

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

G) La congélation des embryons

Pour pallier le manque de receveuses synchronisées avec la donneuse, il est possible de congeler des embryons au stade blastocyste en les stockant dans l'azote liquide à -196°C. Pour être congelés, les embryons doivent être déshydratés par immersion dans des milieux contenant des cryoprotecteurs qui remplacent les molécules d'eau dans les cellules embryonnaires.

Tout d'abord, pour être congelé, l'embryon est placé dans une paillette qui sera identifiée avant d'être plongée dans le conteneur d'azote liquide. Pour cela, l'IETS recommande un système standardisé afin de minimiser les confusions, mais il existe plusieurs façons d'identifier une paillette contenant un ou plusieurs embryons. Prenons l'exemple d'un mode d'identification, appelée unité de base, qui est composée de trois parties. Il inclut le code de congélation de l'équipe de transfert ou du praticien suivi d'un code de deux lettres correspondant à la race de l'animal, lui-même suivi du numéro d'identification de la femelle donneuse. Voici un exemple concret : 515 HO 14468713, où 515 est le code du praticien, HO le code de la race Holstein, 14468713 le numéro d'identification de la femelle donneuse (ROBERTSON I. and NELSON R. E., 2010).

Avec la congélation, non seulement le nombre d'embryons transférables peut être ajusté au nombre de femelles receveuses prêtes, mais les embryons peuvent aussi être stockés et transférés plus tard, lorsque des receveuses seront prêtes à recevoir un embryon. De plus, les embryons congelés peuvent servir aux échanges internationaux qui sont alors facilités. Le choix du cryoprotecteur, les vitesses optimales de congélation et de décongélation, le retrait du cryoprotecteur grâce à un composé non pénétrant comme le sucre, ont mené au développement de méthodes efficaces pour la congélation de blastocystes bovins dans des paillettes (HEYMAN Y., 2010).

La cryoprotection des blastocystes n'est pas aisée en raison des caractéristiques intrinsèques de cet embryon (MOGAS T. G., 2014) :

- La pénétration lente du cryoprotecteur dans le blastocyste est largement due au nombre élevé de cellules qui le composent.
- La zone pellucide agit comme une barrière physiologique à la pénétration du cryoprotecteur.

- La présence d'un blastocœle qui pourrait ne pas être assez déshydraté et favoriser l'apparition de glace.

Gustafsson *et al.* (2001) ont rapporté que le stade blastocyste de 7 jours a environ trois fois plus de chances de survivre à une congélation et une décongélation que des embryons de 8-9 jours, sans tenir compte du stade de développement.

1) Notion de cryoprotecteur

La technique de congélation lente, développée par Wilmot et Whittingham *et al.* (1972), consiste en une diminution de la température de manière progressive et contrôlée. Généralement, l'embryon est graduellement exposé à des concentrations relativement faibles en cryoprotecteur afin d'obtenir une concentration finale de 1,35-1,5 M ; l'objectif étant de minimiser la toxicité du cryoprotecteur avec un minimum de stress osmotique.

Les paillettes contenant les embryons sont placées dans un congélateur à température ambiante. Ils sont ensuite refroidis à une température légèrement inférieure à 0°C, entre -4°C et -9°C. Dans cet intervalle de température, des cristaux de glaces extra-cellulaires se forment par induction de la cristallisation. Les échantillons sont ensuite soumis à une diminution de température lente, à un rythme de 0,3-0,5°C par minute. Cela résulte en la formation d'un gradient osmotique, entre les milieux intra et extra-cellulaires, ce qui provoque une déshydratation intracellulaire. Cette déshydratation permet la concentration du cryoprotecteur dans les cellules embryonnaires grâce à un phénomène d'équilibre entre les deux milieux (intra et extra-cellulaire). Lorsque la déshydratation cellulaire est suffisante (obtenue avec des températures comprises entre -30°C et -65°C), les paillettes sont plongées dans l'azote liquide (MOGAS T. G., 2014).

Au début des années 2000, les praticiens optaient pour le transfert des embryons de meilleure qualité (grade I) à l'état frais et congelaient les embryons de moins bonne qualité (grade II et III). Sauf qu'il est connu que les processus de congélation / décongélation peuvent endommager une faible proportion de cellules engendrant ainsi une baisse de la réussite d'une future gestation. Ainsi, actuellement, les meilleurs taux de gestation sont obtenus quand les embryons de bonne qualité sont congelés et ceux de basse qualité transférés à l'état frais (HEYMAN Y., 2010).

Actuellement, les cryoprotecteurs les plus utilisés sont le glycérol-sucrose et l'éthylène glycol. Le conditionnement des embryons congelés dans des paillettes en plastique est un moyen de stockage sûr et pratique étant donné que les paillettes sont identifiées de manière officielle selon les recommandations de l'IETS (HEYMAN Y., 2010).

Le glycérol a longtemps été utilisé comme cryoprotecteur. La technique consiste à laisser les embryons pendant 5 minutes puis 15 minutes dans des bains de concentration croissante en glycérol avant la congélation. A la décongélation, on réalise les manipulations

inverses. Les protocoles de congélation/décongélation nécessitent une hotte à flux lumineuse, une platine chauffante, un microscope, et un bon nombre de manipulations des embryons.

Il existe aussi d'autres produits qui peuvent servir à déshydrater l'embryon comme l'éthylène-glycol qui a la particularité d'entrer et de sortir des cellules très rapidement en fonction de la concentration du milieu, et qui est donc d'utilisation plus facile que le glycérol. Cette fois-ci, la technique consiste à plonger les embryons pendant 5 minutes dans un bain contenant 1,5 M d'éthylène-glycol, puis on réalise la congélation (NIVOT A., 1998). L'utilisation de l'éthylène glycol comme cryoprotecteur lors de la congélation a permis d'augmenter les chances d'obtenir une gestation future, mais le choix de la receveuse reste toujours une source importante de variation dans le taux de gestation (PONSART C. et al., 2000).

2) La décongélation des embryons congelés

Durant la décongélation, une transition rapide de température est préférée afin de prévenir la recristallisation de l'eau avec un fort potentiel de dommages dus aux cristaux intracellulaires. Au moment de la décongélation, le cryoprotecteur est en haute concentration dans l'espace intracellulaire, et il peut en sortir grâce à une dilution progressive ou en utilisant un cryoprotecteur non pénétrant supplémentaire qui agit comme un tampon osmotique permettant la sortie du premier cryoprotecteur sans absorption excessive d'eau extracellulaire (MOGAS T. G., 2014). Cette méthode est utilisée lorsque du glycérol a été utilisé comme cryoprotecteur pour la congélation.

Pour transférer un embryon congelé lorsque de l'éthylène-glycol a été utilisé, il existe deux options :

- Soit l'embryon est déposé quelques minutes dans un bain composé de PBS et de BSA à 4 g/L. Il est ensuite monté dans une paillette afin d'être transféré à la receveuse.
- Soit un transfert direct est effectué. Cette technique consiste à transférer l'embryon toujours dans l'éthylène glycol après décongélation. Ainsi, la sortie de l'éthylène-glycol de la masse embryonnaire se fait dans la corne utérine.

Les avantages du transfert direct sont sa rapidité et sa simplicité. Il n'y a plus besoin de sortir l'embryon de sa paillette d'origine, donc plus besoin de microscope et de manipulations de l'embryon. La paillette est alors décongelée dans de l'eau à 25°C, on l'essuie et on la place directement la sonde de transfert (NIVOT A., 1998).

3) A propos des embryons sexés

Les embryons sexés pourraient être considérés comme des cas particuliers étant donné qu'ils subissent une biopsie qui peut affecter les chances de réussite d'une gestation future après un protocole de congélation.

Une technique de congélation a été testée sur des embryons biopsiés et des embryons intacts afin de comparer les taux de gestation entre ces groupes. Les embryons étaient tout d'abord placés dans une solution d'agarose à 1% (l'agarose était dilué dans une solution de DPBS contenant 1g/ml de D-glucose et 35 mg/ml de pyruvate sodique). Ensuite, les embryons étaient plongés dans une solution d'éthylène glycol à 1,5M contenant 0,1M de saccharose pendant 5 minutes. Les paillettes étaient alors placées dans un congélateur programmable afin de démarrer la descente en température. Une fois la température de -6,5°C atteinte, une période de 5 minutes d'attente était réalisée avant le seeding. Après quinze minutes, les paillettes étaient amenées à -32°C à la vitesse de 0,5°C/min. La décongélation consistait en une exposition de 5 secondes des paillettes à la température ambiante. Les paillettes étaient ensuite immergées dans une eau à 22°C pendant 15 secondes, et les embryons devaient être transférés dans les 5 minutes. Sur les neuf années d'études avec cette technique de congélation et de décongélation, les taux de gestation obtenus étaient de 63,7% pour les embryons biopsiés et sexés, et de 65,1% pour les embryons intacts. Il en est conclu qu'il n'y a pas de différence entre ces deux taux de gestation avec cette technique de congélation et de décongélation qui peut donc être utilisée avec succès sur des embryons biopsiés (DUPRAS R. and CHORFI Y., 2006).

Sexer un embryon grâce à une biopsie peut altérer la viabilité de l'embryon après le transfert chez la femelle receveuse. En 2002, Lane *et al.* ont montré qu'un puissant antioxydant cellulaire, l'acide ascorbique, augmentait la survie d'embryons de souris cryopréservés. Une autre étude a cherché à savoir si la supplémentation en acide ascorbique durant la biopsie et la congélation augmenterait la survie d'embryons bovins biopsiés puis congelés et décongelés. Deux groupes ont été réalisés, les embryons du groupe contrôle étaient congelés avec 1,5 M d'éthylène glycol, alors que ceux du second groupe l'étaient avec 1,5 M d'éthylène glycol additionnés de 0,1 mM de L-ascorbate. Entre les deux groupes, les taux de gestation étaient semblables à 45%, mais le taux de vêlage était de 31% pour les embryons ayant été congelés avec le L-ascorbate alors qu'il était de 22% pour les embryons du groupe contrôle. Cette différence est due au fait que les vaches du groupe contrôle ont plus souvent avorté que les vaches du groupe L-ascorbate (22% d'avortements contre 14%). Le L-ascorbate semble donc protéger les embryons des effets délétères de la biopsie et de la congélation (KORHONEN K. et al., 2010).

4) Une potentielle alternative : la vitrification

Si la procédure de congélation lente est efficace pour les embryons de bonne qualité, cette méthode reste peu satisfaisante pour les embryons peu évolués ou manipulés (biopsies par

exemple). Ces derniers ont en effet un nombre de cellules limité et des membranes cellulaires fragiles, plus sensibles aux phénomènes de déshydratation/réhydratation et à la formation des cristaux de glace durant le processus de congélation. C'est pourquoi une approche alternative est en développement, la vitrification. Cette méthode est basée sur l'utilisation de vitesses de refroidissements rapides associées à de fortes concentrations en cryoprotecteur afin d'éviter la formation de cristaux de glace intracellulaires. Actuellement, cette méthode est surtout utilisée dans la cryopréservation d'embryons produits *in vitro* (HEYMAN Y., 2010).

H) Les suites sur la femelle donneuse

Lors de la collecte ou dans les jours suivants, la femelle donneuse doit recevoir une injection de prostaglandines pour qu'elle puisse reprendre un cycle normal. Dès son retour en chaleur, elle peut être inséminée avec de bonnes chances d'obtenir une gestation.

Une étude finlandaise portant sur les collectes réalisées entre 1998 et 2003 dans ce pays, a cherché à voir quels étaient les effets d'une production d'embryons sur les femelles donneuses. Les résultats montrent que seulement 1,8% des donneuses sont par la suite réformées pour infertilité. On peut alors en conclure que la superovulation et les protocoles de collecte des embryons ne semblent pas compromettre la fertilité des femelles donneuses en pratique, car presque tous les animaux sont de nouveaux gestants dans un intervalle de temps acceptable après la collecte. En moyenne, deux inséminations sont nécessaires, et l'intervalle de temps entre la collecte et l'insémination fécondante est de 66,5 jours (TAPONEN J. and MIKKOLA M., 2010).

I) Les suites sur les receveuses

Elles sont soumises à une attention particulière de la part de l'éleveur. En effet, ce dernier surveille spécifiquement un possible retour en chaleurs. Seules les receveuses qui extériorisent très nettement l'acceptation du chevauchement et le chevauchement des congénères avec écoulement de glaires sont considérées comme non gestantes et pourront être inséminées. Au contraire, si les chaleurs sont douteuses, il faut attendre le cycle suivant pour confirmer la gestation ou son absence. Ce diagnostic de gestation peut être pratiqué par échographie environ 30 jours après la mise en place de l'embryon.

V) Risques sanitaires

Comme pour toutes les biotechnologies de la reproduction (telles que l'insémination artificielle, la fécondation *in vitro*, etc...), le transfert embryonnaire doit permettre des échanges de gènes entre fermes, régions, pays ou continents sans risque de transmission de maladies.

En même temps qu'est apparu le transfert embryonnaire sur le terrain à la fin des années 1970, des recherches nombreuses ont été mises en place afin de préciser les risques en étudiant la nature des interactions entre agents pathogènes et embryons. Après avoir reconnu que l'embryon était une entité propre, et que par conséquent le contrôle de cette entité se devait d'être original, il est apparu que le transfert embryonnaire était le moyen le plus sûr au plan sanitaire (THIBIER M. and GUERIN B., 1993).

A) L'embryon : une entité propre

L'embryon se distingue radicalement d'un animal vivant ou même d'un gamète tel que le spermatozoïde, ce qui induit une spécificité sanitaire de l'embryon qui repose sur des observations biologiques (THIBIER M., 1994) :

- L'embryon est entouré d'une triple protection contre les agents présents dans l'environnement : le corps maternel, la cavité utérine et la membrane pellucide qui est très importante sur le plan sanitaire.
- L'embryon demeure libre dans la cavité utérine de la donneuse pendant un temps très limité, habituellement moins de neuf jours.
- L'embryon peut être examiné à la loupe, donc avec un grossissement qui permet de s'assurer de l'intégrité de sa surface en contact avec l'extérieur.

B) Les types de risque

Le but de la sécurité sanitaire est de produire un embryon collecté *in vivo* 7 jours après sa fécondation, sans qu'il soit associé à un quelconque agent susceptible d'être pathogène pour l'animal receveur qui le portera (THIBIER M. and GUERIN B., 1997). Les risques de contamination sont classiquement rassemblés en six ordres, depuis le stade initial de la contamination intracellulaire jusqu'au moment de la transplantation (Figure 23).

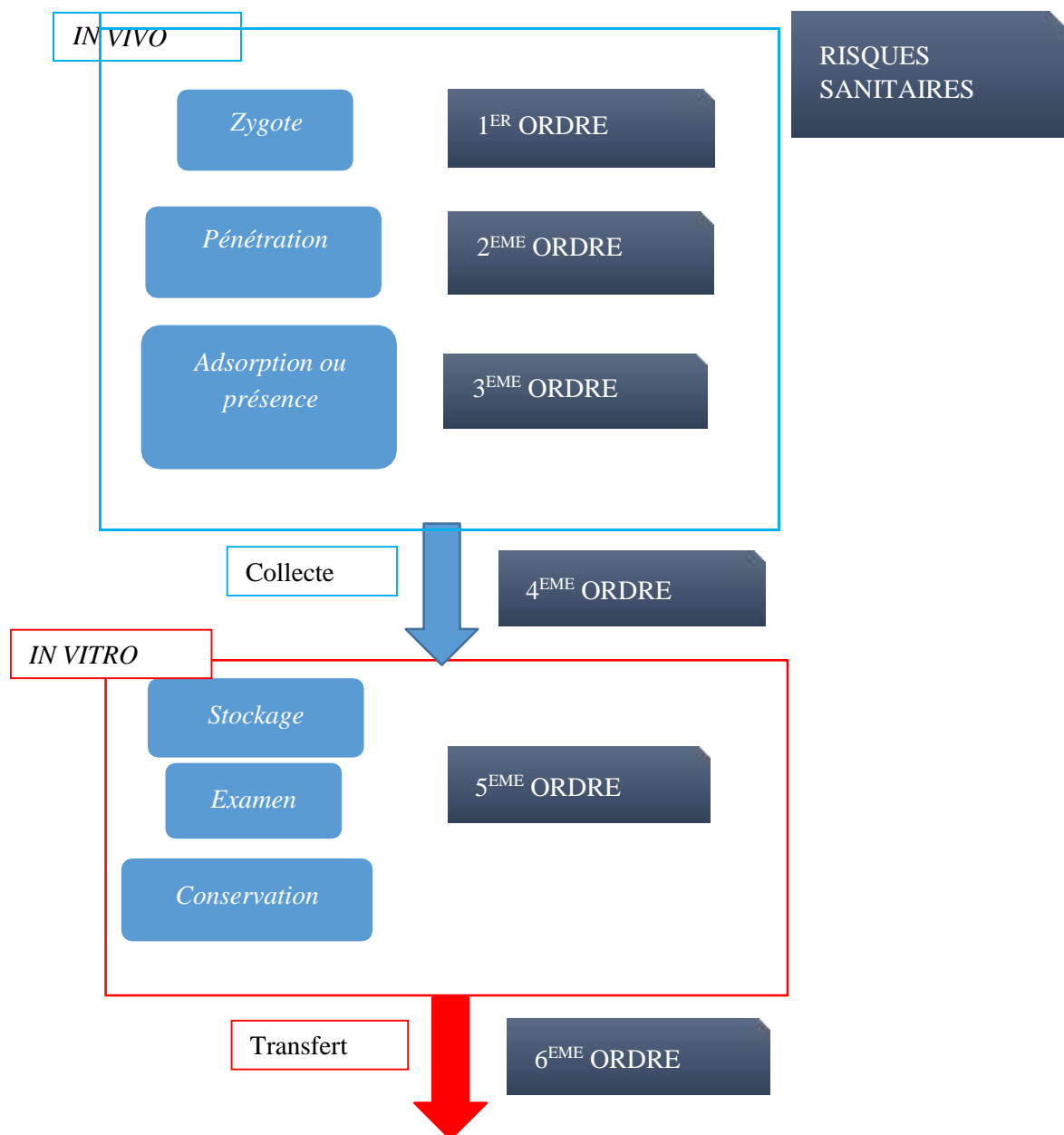


Figure 23 : Les différents risques sanitaires

Les plus grands risques de contamination correspondent aux risques de :

- 3^{ème} ordre : c'est le risque d'avoir des agents pathogènes associés à la membrane pellucide.
- 4^{ème} ordre : c'est le risque d'apporter au moins un agent pathogène au contact de l'embryon, notamment lors de la collecte.
- 5^{ème} ordre : c'est le risque d'apporter un agent pathogène lors de la phase dite « *in vitro* » entre collecte et transfert ou conditionnement, où les manipulations sont nombreuses.

C'est donc en rapport avec ces trois phases que l'étude de l'interaction éventuelle des agents pathogènes et des embryons doit être envisagée. Il est en particulier important de

maintenir en toute occasion, lors des opérations de collecte et de manipulation, l'intégrité de la membrane pellucide (THIBIER M., 1994).

Il est primordial de remarquer que le risque est en particulier associé à la probabilité qu'un agent pathogène puisse se retrouver dans l'environnement immédiat de l'embryon. Il est vrai qu'un agent qui n'a jamais été observé dans la sphère génitale ou périgénitale a à priori peu de chance d'être associé aux embryons. C'est pourquoi une des étapes clés concerne l'éventuelle présence d'agents pathogènes dans l'oviducte ou de l'utérus d'où est issu l'embryon.

C) Les agents pathogènes à risque

Il faut retenir que tous les types d'agents pathogènes, bactéries, champignons ou encore virus sont susceptibles d'être associés aux embryons (THIBIER M., 1994). Une vingtaine d'agents, chez les bovins, ont été étudiés largement et les conclusions de ces travaux sont parues dans le Manuel de la Société de Transfert Embryonnaire (THIBIER M. and GUERIN B., 1997). Voici celles que l'on peut retenir :

- Il ne faut pas extrapoler les interactions observées pour un agent pathogène entre différentes espèces animales ou à un autre agent même proche (par exemple cas des Pestivirus).
- Chez les bovins, rares sont les virus susceptibles d'adhérer à la zone pellucide, à l'exception du virus herpès bovin (BHV-1)
- Chez les bovins, quelques bactéries peuvent être associées, comme les mycoplasmes, mais elles sont en principe « inactivées » par une possible addition d'antibiotiques à des concentrations appropriées.

1) Recommandations actuelles (Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties, 2015)

Sur la base des conclusions tirées par l'IETS (International Embryo Transfer Society), les maladies et agents pathogènes sont classés en quatre catégories. Cette classification ne s'applique qu'aux embryons collectés *in vivo* et concerne toutes les espèces, mais ne seront citées ici que les affections concernant les bovins.

(a) Catégorie 1

Sont inscrits dans cette catégorie les maladies ou agents pathogènes pour lesquels les preuves réunies sont suffisantes pour affirmer que le risque de transmission est négligeable, à

condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS. Les maladies ou agents inscrits sont :

- *Brucella abortus*
- Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- Fièvre aphteuse
- Fièvre catarrhale
- Leucose bovine enzootique
- Rhinotrachéite infectieuse bovine / vulvovaginite pustuleuse infectieuse : nécessite un traitement à la trypsine

(b) Catégorie 2

Sont inscrites les maladies pour lesquelles des preuves substantielles ont été réunies, indiquant que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS, mais pour lesquelles les données existantes doivent être vérifiées par de nouvelles transplantations.

Cette catégorie ne concerne pas les bovins.

(c) Catégorie 3

Sont inscrit dans cette catégorie les maladies ou agents pathogènes pour lesquels les résultats préliminaires indiquent que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS, mais pour lesquels ces constatations préliminaires doivent être corroborées par des données expérimentales complémentaires *in vitro* et *in vivo*. Les maladies ou agents inscrits sont :

- *Haemophilus somnus*
- Infection par le virus de la peste bovine
- *Mycobacterium paratuberculosis*
- *Neospora caninum*
- Virus de l'immunodéficience bovine
- Virus de la diarrhée virale bovine

(d) Catégorie 4

Sont inscrits dans cette catégorie les maladies ou agents pathogènes pour lesquels des études ont été réalisées ou sont en cours, indiquant :

- i. Qu'aucune conclusion ne peut encore être tirée quant au niveau de risque de transmission, ou
- ii. Que le risque de transmission par TE pourrait ne pas être négligeable, même si les embryons sont manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS.

Les maladies ou agents figurant dans cette catégorie sont :

- Anaplasmose bovine
- *Chlamydia psittaci*
- Entérovirus
- *Escherichia coli* O9 :K99
- Fièvre Q (*Coxiella burnetti*)
- Herpèsvirus-4 bovin
- *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis*
- *Mycobacterium bovis*
- Stomatite vésiculeuse
- *Tritrichomonas foetus*
- *Ureaplasma* et *Mycoplasma* spp.
- Virus Akabane
- Virus para-influenza-3

Lors de la production d'embryons *in vivo*, on peut avoir des contaminations aux différentes étapes de la production et du transfert. En effet, un agent pathogène peut potentiellement provenir de la semence utilisée lors de l'insémination ou de la femelle donneuse, de l'environnement de l'animal, de l'environnement de l'embryon comme les milieux utilisés lors de la phase *in vitro*, ou encore des conditions de stockage.

2) Risques liés à la semence

(a) Quels risques ?

Beaucoup de pathogènes sont présents dans les testicules, le système lymphatique, le sang (pendant une virémie ou bactériémie) ou encore le système urinaire. Donc tous ces pathogènes peuvent se retrouver facilement dans la semence via le liquide séminal, les

spermatozoïdes ou le contact avec l'urine. Ces micro-organismes peuvent être présents dans la semence, et cette contamination peut jouer un rôle durant la fertilisation et peut aussi être transmise à l'embryon ou à la donneuse. Cela a été démontré avec le virus de la diarrhée virale bovine et *Mycoplasma spp.* (LE TALLEC B. et al., 2001). Différentes études, testant la contamination des embryons produits *in vivo*, ont montré que le risque de transmission de micro-organismes pathogènes, quand la semence est contaminée, est très élevé. Pour éviter cela, des mesures préventives sont mises en place.

(b) Mesures préventives

Elles servent à éviter la contamination de la semence et à contrôler les risques sanitaires liés à cette semence. La première, et la plus importante, est une règle épidémiologique spécifiquement appliquée aux centres d'IA : pour être sûre de collecter de la semence libre de tout pathogène, il est nécessaire de faire entrer et de ne garder dans le centre que des taureaux sains. Ainsi le centre d'IA est sain car tous les taureaux présents sont sains, et ils sont régulièrement contrôlés une fois dans le centre. Si la semence provient d'un taureau issu d'un centre non certifié indemne, alors la seule façon de minimiser les risques sanitaires, est d'examiner chaque éjaculat en testant des paillettes avec des tests sensibles.

En plus des agents majeurs pour lesquels chaque mâle est contrôlé, la semence peut être contaminée par d'autres agents, comme des pathogènes ubiquistes par exemple. Cette contamination est limitée par des mesures hygiéniques strictes appliquées sur le logement des animaux, la collection de la semence et son conditionnement. Le respect de ces règles sanitaires permet de fournir une semence de haute qualité microbiologique (<500 UFC/mL). Il est également possible d'ajouter des antibiotiques dans les contenants, c'est une procédure qui limite le nombre de bactéries présentes.

3) Risques liés à la femelle donneuse

(a) Quels risques ?

Les ovocytes et embryons sont entourés par la zone pellucide qui les protège et joue un rôle durant toutes les phases du développement embryonnaire, de la fertilisation jusqu'au développement embryonnaire précoce. Chez les mammifères, la zone pellucide est composée de trois glycoprotéines formant une structure tridimensionnelle complexe. Des changements dans cette structure ont lieu au cours de la fertilisation et aussi pendant le passage de l'embryon à travers l'oviducte. Ainsi, les agents pathogènes ne peuvent plus se lier et / ou pénétrer la zone pellucide intacte après la fécondation, et la zone pellucide devient la principale barrière contre la contamination par les principaux pathogènes étudiés. Donc le paramètre principal est lié à

l'intégrité de la ZP et il est communément admis que la seule voie de transmission de pathogènes aux receveuses est l'adhésion à la ZP.

Chez les bovins, le virus de la fièvre aphteuse, le virus de la FCO, la brucellose, la tuberculose et la leucose bovine enzootique ne semblent pas présenter de risque de transmission par le TE. A l'opposé, les risques associés avec l'herpèsvirus bovin de type 1 (BHV-1) et des agents non conventionnels tels que les prions sont plus discutables.

Concernant l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), des résultats préliminaires suggèrent un risque extrêmement faible de transmettre l'ESB en utilisant le TE (VAN SOOM A. et al., 2008).

Pour le BHV-1, la capacité du virus à adhérer à la ZP a été mise en évidence par des études *in vitro*. Cependant, les données de terrain sur les embryons exportés en France indiquent qu'aucune receveuse ne devient séropositive même si certains embryons proviennent de donneuses positives en anticorps anti-BHV-1. De plus, il a été démontré que toutes les particules virales sont éliminées par les procédures de lavages préconisées par l'IETS avec de la trypsine. Il est alors conclu que des embryons avec une ZP intacte ne sont pas des véhicules pour la transmission de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) (LE TALLEC B. et al., 2001).

Le transfert d'embryons (et/ou de milieu) contaminés par le virus de la BVD induit la séroconversion d'animaux séronégatifs et provoque donc une infection transitoire de la receveuse. Cette infection provoque soit la mort de l'embryon, soit un avortement, soit la naissance d'un veau IPI (Infecté Permanent Immunotolérant), le virus peut en effet persister pendant deux mois après son introduction dans l'utérus. En plus de l'arrêt de la gestation, ce transfert d'un embryon contaminé peut également représenter une voie d'introduction du virus dans l'élevage (CHASTANT S. and MAILLARD R., 1999).

Plusieurs sérovars de *Leptospira* (*pomona*, *grippityphosa*, *hardjo*) peuvent infecter les bovins et rester dans le foie et les reins, ce qui fait que ces animaux excrètent la bactérie par leurs urines. La présence de *L. borgpetersenii* serovar *hardjo* sur des embryons produits *in vivo* a été mise en évidence après une infection expérimentale des génisses donneuses. Le pathogène était présent dans les fluides utérins et son ADN associé à une partie des embryons, mais aucune séroconversion n'a été établie après la transplantation de ces embryons à des génisses séronégatives. *In vitro*, il a été montré que les leptospires sont capables de pénétrer la ZP et de provoquer des dommages cellulaires. De plus plusieurs lavages ne parviennent pas à enlever les pathogènes des embryons. En Belgique, où la prévalence de la leptospirose est élevée, cet agent pathogène reste classé en catégorie 4, il faut donc prévoir un risque associé à la leptospirose durant le TE (VAN SOOM A. et al., 2008).

(b) Mesures préventives

Les procédures sanitaires recommandées par l'IETS à propos de la sélection de la donneuse, la manipulation des embryons, la procédure de lavage des embryons et l'hygiène

générale de la pratique assurent à l'équipe de transfert une diminution du risque de transmission de pathogènes via le TE (LE TALLEC B. et al., 2001).

Les conditions sanitaires applicables aux femelles sont importantes afin d'assurer la sécurité sanitaire du TE. Pour cela, l'Autorité Vétérinaire doit disposer d'informations et avoir autorité sur le troupeau ou le cheptel dont proviennent les donneuses. Ainsi, elles ne doivent pas provenir d'un troupeau ou cheptel soumis à des mesures de restriction vétérinaire liées à la présence de maladies ou d'agents pathogènes listés par l'OIE autres que ceux classés par l'IETS dans la catégorie 1. De plus, au moment de la collecte, les femelles donneuses doivent être soumises à un examen clinique effectué par un vétérinaire qui certifiera que ces femelles sont indemnes de tout signe clinique de maladies (Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties, 2015)

4) Risques liés à la collecte et au stockage des embryons

(a) Quels risques ?

Comme pour la semence, les collectes et la cryoconservation des embryons ne sont pas des procédures stériles. En effet, il a été montré qu'une contamination microbienne peut être présente dans l'azote liquide ou le matériel cryopréservé. Dans une étude, trente-deux bactéries et une espèce de champignon ont été identifiées dans des cuves d'azote liquide. La source de contamination de ces cuves d'azote liquide n'était pas connue mais la principale hypothèse émise serait une contamination durant la phase *in vitro* du schéma de TE, phase où les embryons sont manipulés par un technicien (VAN SOOM A. et al., 2008).

(b) Conditions applicables à la collecte et au stockage des embryons

Concernant les milieux, tout produit biologique d'origine animale entrant dans leur composition, qu'il soit utilisé pour la collecte, le traitement, le lavage ou la conservation des embryons, doit être exempt de tout micro-organisme pathogène. Les milieux et solutions utilisés pour la collecte et la conservation des embryons doivent être stérilisés selon des méthodes agréées, comme indiqué dans le manuel de l'IETS, et manipulés de façon à rester stériles. Des antibiotiques doivent être ajoutés aux milieux utilisés pour la collecte, la manipulation, le lavage et la conservation, conformément aux recommandations du Manuel de l'IETS.

Quand les milieux sont achetés comme étant des préparations stériles prêtes à l'emploi, ils devraient toujours provenir de sources fiables. Quand la stérilisation des milieux et du matériel est réalisée en laboratoire, elle doit respecter une procédure décrite par l'IETS (STRINGFELLOW D. A., 2010). Brièvement, une stérilisation à la chaleur (autoclave) est utilisée pour la verrerie et les instruments en acier inoxydable, une stérilisation à froid peut être

utilisée pour les instruments non emballés qui ne seront pas en contact direct avec les embryons. La stérilisation au gaz avec de l'oxyde d'éthylène est utilisée pour les plastiques thermo-labiles et les caoutchoucs. Enfin, une irradiation aux rayons gamma et un faisceau d'électrons est utilisée pour le matériel médical emballé par le fabricant et sensibles à la chaleur (SCHIEWE M. C. and HASLER J. F., 2010).

Dans l'idéal, le matériel utilisé doit être neuf ou stérilisé avant chaque usage, et il ne doit pas faire l'objet d'un transfert entre pays en vue d'une nouvelle utilisation par l'équipe de collecte.

(c) Conditions applicables au stockage et au transport des embryons

Plusieurs règles sont à suivre afin de toujours avoir un risque sanitaire minimal. Les embryons destinés à l'exportation doivent être conservés en ampoules, flacons ou paillettes stériles scellés, en respectant des conditions d'hygiène rigoureuses, dans un lieu de stockage agréé par l'Autorité Vétérinaire du pays exportateur, où aucune contamination des embryons ne risque de se produire. Seuls des embryons provenant d'une même femelle donneuse peuvent être conditionnés ensemble. Dans la mesure du possible, les embryons doivent être congelés et conservés dans l'azote liquide en flacons ou conteneurs nettoyés et stérilisés dans le plus strict respect des conditions d'hygiène sur le site de stockage agréé. Les flacons, ampoules ou paillettes doivent être scellés au moment de la congélation et être clairement identifiés au moyen d'étiquettes, conformément au système normalisé recommandé dans le manuel de l'IETS. Avant leur exportation, les conteneurs d'azote liquide doivent être scellés sous la supervision du vétérinaire officiel, et il y a établissement définitif des certificats vétérinaires requis (Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties, 2015).

(d) Gestion de la contamination bactérienne des conteneurs d'azote liquide

L'utilisation d'azote liquide dans des conteneurs pour stocker de la semence ou des embryons est courante dans de nombreux pays, c'est pourquoi il est important au niveau sanitaire de bien contrôler ces cuves. En effet, un conteneur peut être contaminé par une manipulation non-adaptée.

Dans une étude de 2006, des écouvillons ont été prélevés à partir de deux cannes plongées dans l'azote liquide et de chaque côté de conteneurs utilisés pour le stockage de semence et d'embryons, avant et après une procédure de lavage des cannes et des conteneurs. Douze conteneurs ont été étudiés. Les cannes et conteneurs ont été nettoyés de la manière suivante :

- Premier lavage à l'eau
- Puis lavage à l'eau additionnée du détergent Extran®-MA02 (Merck)

- Puis rinçage
- Enfin désinfection

Deux groupes ont été réalisés, les conteneurs du groupe A (8 conteneurs) ont été rincés avec une solution à 2% de glutaraldéhyde puis avec une solution d'éthanol 70%. Les conteneurs du groupe B (4 conteneurs) ont été rincés seulement avec la solution d'éthanol 70%. Ensuite, ils ont été séchés au four Pasteur à 60°C.

Un deuxième échantillon a alors été prélevé dans chaque conteneur comme pour le premier échantillon, pour vérifier l'efficacité de cette procédure de lavage.

Avant nettoyage, *Bacillus cereus* a été isolé dans 11 conteneurs, *Bacillus* gram négatif oxydase négative, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* et *Escherichia coli* ont été isolés sur deux conteneurs, et sur un seul conteneur a été trouvé *Proteus mirabilis*.

Après nettoyage et désinfection, aucun conteneur ne montrait

une contamination bactérienne, donc cette étude montre l'importance de la désinfection de routine des conteneurs pour éviter la contamination bactérienne (PESSOA G. A. et al., 2006).

D) La prophylaxie sanitaire du transfert embryonnaire

Après avoir vu quels étaient les agents pathogènes susceptibles d'intervenir au cours d'un transfert embryonnaire, voyons comment les risques sont gérés et pourquoi le TE est le moyen le plus sûr sanitaire de diffuser une génétique.

Comme pour l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire est réalisé en Europe et en France dans un cadre réglementaire très strict (Journal Officiel des Communautés Européennes, JOCE L302 25 septembre 1989, L75 24 juin 1993, L53 24 février 1994) qui oblige avant toute intervention à évaluer très précisément le statut sanitaire des femelles donneuses, mais aussi celui des embryons transférés et des donneuses (HUMBLLOT P., 1999).

L'IETS a très précisément indiqué la façon dont les embryons devaient être manipulés pour réduire au maximum les risques. Cette procédure implique l'inspection clinique de la donneuse, le lavage des embryons, l'élimination de tout embryon dont la zone pellucide est non intacte ou associée à des débris cellulaires, un traitement trypsique dans certains cas et une sélection très attentive des produits biologiques utilisés pour la préparation des milieux de culture (THIBIER M. and GUERIN B., 1997).

1) La phase *in vitro*, point clé de la sécurité sanitaire

La présence des embryons dans le liquide de collecte va être utilisée non seulement pour la recherche de ces embryons et leur évaluation, mais aussi pour garantir l'absence d'agents pathogènes. Cette garantie est apportée d'une part par la décision de ne transférer que des embryons à zone pellucide intacte et sans débris cellulaires, et d'autre part par la mise en œuvre de dix lavages qui doivent conduire l'embryon à être dans un environnement stérile. Cette même phase va aussi servir de « témoin » de la présence éventuelle d'agents de contamination et l'analyse virologique ou bactériologique des différents milieux pourra ainsi servir à apprécier la qualité de l'environnement auquel auront été soumis les embryons collectés puis manipulés avant leur transfert ou conditionnement (THIBIER M., 1994).

Toutes ces manipulations peuvent se faire à l'aide de micropipettes à main avec des embouts jetables de 20 µL (Figure 24). Ces embouts sont rapidement insérés et retirés du mandrin, ce qui permet de les changer entre chaque bain. Ainsi avec la technique adéquate les embryons ne seront pas en contact avec une partie quelconque de la pipette. D'autres pipettes à main sont utilisables et acceptables, à condition que les embouts soient facilement échangeables (STRINGFELLOW D. A., 2010).

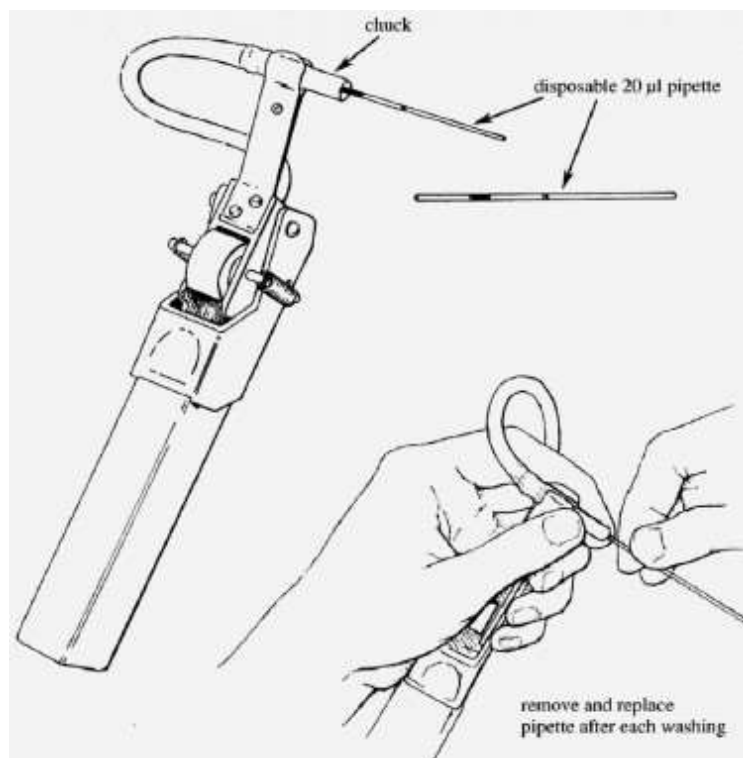


Figure 24 : Système de pipettes jetables de 20 µL

Les principales exigences de l'IETS (International Embryo Transfer Society) concernant le lavage des embryons sont (STRINGFELLOW D. A., 2010) :

- Seuls les embryons provenant d'une même femelle donneuse peuvent être lavés ensemble
- Dix embryons au maximum dans un même bain
- Seuls les embryons avec une ZP intacte peuvent être lavés
- Seuls les embryons sans matériel adhérent à la ZP peuvent être lavés
- Un minimum de 10 bains est nécessaire, prévoir suffisamment de temps pour un nettoyage, un mélange doux dans chaque lavage (Figure 25)
- Utiliser une nouvelle micropipette stérile à chaque changement de bain des embryons
- Obtenir des volumes de telle sorte que chaque bain soit 100 fois plus dilué que le précédent.

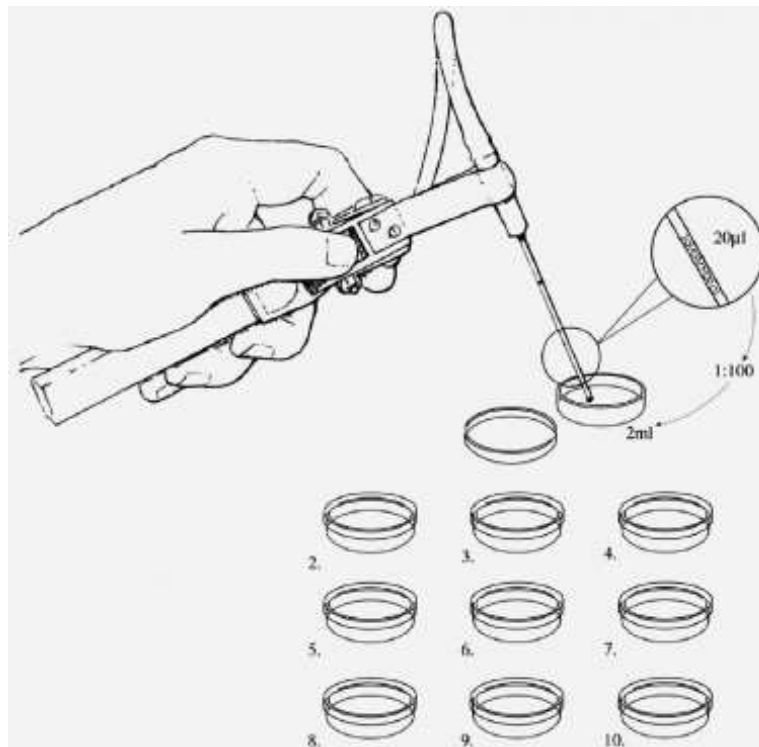


Figure 25 : Les bains de lavage des embryons

Sur la figure 25, on observe que les 10 bains de lavage sont prêts et sont dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Comme on doit avoir un facteur 100 de dilution entre chaque bain, il est possible de prélever 20 µL que l'on dilue dans 2 mL du milieu suivant, ainsi on respecte cette dilution au centième entre chaque bain.

Ces recommandations nécessitent des manipulations préalables au nettoyage de sorte que seuls les embryons d'une même femelle soient lavés ensemble, et surtout une observation des embryons à un grossissement minimum de X50 est nécessaire pour vérifier l'intégrité de la ZP et l'absence de matériel adhérent à cette dernière. Si la présence d'un matériel est observée, le technicien tente de le retirer sans abîmer la ZP. L'absence de matériel adhérent à la ZP est confirmée après les dix bains de lavages.

Si des embryons ont une ZP défectueuse ou des débris adhérents à cette dernière et qu'il n'est pas possible de les retirer, alors ces embryons sont écartés des autres et ne seront pas utilisés.

2) Le traitement à base de trypsine

Ce traitement des embryons avec une ZP intacte a montré une efficacité certaine pour la suppression ou l'inactivation de certains virus (comme le BHV-1) qui peuvent être attachés ou associés à la ZP après la phase *in vitro*. Quand un traitement à base de trypsine est requis, il convient de modifier la procédure de lavage des embryons comme suit : d'abord, les embryons sont passés dans 5 bains de lavage, le premier avec de la solution saline tamponnée au phosphate (solution PBS) avec ou sans calcium et magnésium, le deuxième contenant des antibiotiques large-spectre, le troisième contenant un sérum à 0,4% d'albumine bovine, et ensuite deux bains contenant chacun un aliquot de trypsine pour un total de 60 à 90 secondes d'exposition à l'enzyme diluée.

Enfin, les 5 bains suivants servent à rincer les embryons. Ces bains sont composés de solution PBS contenant des antibiotiques et du sérum à 2% d'albumine bovine afin de fournir un substrat pour éliminer l'activité enzymatique restante (STRINGFELLOW D. A., 2010).

Ainsi, le point privilégié de la surveillance sanitaire ne s'exerce plus sur l'animal lui-même mais sur le praticien qui effectue la manipulation de l'embryon pendant cette phase *in vitro*.

E) Le concept de l'agrément officiel des équipes de transfert embryonnaire

L'équipe de collecte d'embryons est un groupe de techniciens qualifiés comprenant au moins un vétérinaire pour procéder aux opérations de collecte, de manipulation et de stockage des embryons (Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties, 2015). Les conditions requises à remplir sont :

- L'équipe doit être titulaire d'un agrément délivré par l'Autorité compétente.
- L'équipe doit comprendre au moins un vétérinaire qui en assure la supervision.
- Le vétérinaire de l'équipe est responsable de toutes les activités de l'équipe, y compris celles concernant la vérification de l'état sanitaire des animaux donneurs, le respect des conditions sanitaires lors des opérations de maniements des femelles donneuses et des soins chirurgicaux, et des procédures de désinfection et d'hygiène.
- Le personnel de l'équipe doit être parfaitement formé aux techniques et principes de contrôle des maladies et appliquer des règles d'hygiène rigoureuse afin d'éviter toute contamination.

L'équipe de collecte doit travailler dans des installations adéquates et disposer des équipements nécessaires pour assurer :

- La collecte des embryons.
- Le traitement et la manipulation des embryons dans un laboratoire fixe ou mobile.
- Le stockage des embryons.

Ces installations ne doivent pas nécessairement se trouver sur le même site.

L'équipe de collecte d'embryons doit tenir un registre de ses activités qui doit être présenté à l'Autorité vétérinaire lors de tout contrôle pendant les deux années suivant l'exportation des embryons.

L'équipe de collecte doit être soumise, au moins une fois par an (Arrêté Ministériel initial du 8 septembre 1986, révisé par l'Arrêté Ministériel du 13 mars 1991), à des contrôles réguliers effectués par un vétérinaire officiel pour s'assurer du respect des procédures d'hygiène.

F) Les conditions concernant le laboratoire de manipulation

Tout laboratoire de manipulation peut être fixe ou mobile. C'est une installation dans laquelle les embryons sont extraits de leur milieu de collecte, puis examinés et soumis à tous les traitements requis et examinés avant transfert ou congélation. Le laboratoire doit être séparé physiquement des animaux, et le secteur propre dédié aux manipulations doit être nettement séparé du secteur souillé. Ainsi le laboratoire doit répondre à quelques règles sanitaires :

- Il doit être placé sous la supervision directe du vétérinaire de l'équipe et contrôlé régulièrement par un vétérinaire officiel.
- Lorsque des embryons destinés à l'exportation sont manipulés, aucune opération ne doit être effectuée sur des embryons de qualité sanitaire inférieure.
- Il doit être protégé contre les rongeurs et les insectes.
- Il est construit avec des matériaux permettant un nettoyage et une désinfection efficaces. Ces opérations doivent toujours être réalisées avant et après chaque manipulation d'embryons.

G) Démonstration de la sécurité sanitaire

En 1993, un rapport est publié pour présenter les résultats de contrôle réalisés pendant six années et portant sur plus de 40 équipes officiellement agréées.

Selon les équipes de collectes, le contrôle peut être annuel, voire semestriel ou trimestriel (selon le nombre de collectes réalisées sur une année). Après chaque collecte dont les embryons sont susceptibles de sortir de la ferme, ces équipes conservent 1 ml du liquide de

collecte, 1 ml du mélange des trois derniers liquides de lavage et les embryons non fécondés ou dégénérés recueillis. Ces échantillons sont directement congelés, dûment identifiés et conservés jusqu'au moment où le contrôle est initié.

Les liquides de collecte et de lavage sont soumis à une recherche microbiologique quantitative selon la technique décrite dans le code sanitaire de l'OIE et à une recherche de *Mycoplasma*.

Les liquides de collecte, de lavage et les embryons dégénérés sont soumis à une recherche de l'Herpès-Virus Bovin de type 1 et du Virus de la Diarrhée Virale Bovine. Le choix de ces agents viraux correspond d'une part à ceux qui ont la plus grande probabilité d'être retrouvés et d'autre part à leur pouvoir pathogène.

Concernant l'interprétation des résultats, il n'est pas nécessaire que le liquide de collecte soit stérile. En revanche, il ne doit contenir ni mycoplasmes ni agent viral, ce qui traduirait une faute de l'équipe qui ne doit collecter les embryons que si l'animal est en parfaite santé. De même, les embryons non fécondés ou dégénérés ne doivent contenir aucun de ces agents pathogènes. Les liquides de lavage, eux, se doivent d'être stériles.

Sur ces six années d'étude, 1245 collectes ont été contrôlées, mais 33 de ces collectes n'ont pu donner lieu à une interprétation pour des raisons matérielles diverses. Plus de 1000 ensembles d'analyses (83%) ont donné lieu à des résultats favorables. Enfin, 172 collectes ont été reconnues défavorables (14%).

Le contrôle des liquides de collecte a donné lieu à un dénombrement bactérien. Un tiers des liquides de collecte est stérile. Pour le reste des liquides de collectes qui ne sont donc pas stériles, des mollicutes (type mycoplasmes) ont été isolées à 17 occasions (<2%), mais aucun virus n'a été isolé.

Concernant les liquides de lavage, 1040 d'entre eux se sont révélés stériles. Parmi les 172 qui ne l'étaient pas, 23 étaient issus de liquides de collecte stériles, traduisant alors une contamination de ces milieux lors de la phase *in vitro*.

La recherche virale à partir des embryons non fécondés ou dégénérés s'est avérée négative dans tous les cas.

Cette étude montre que de tels contrôles sont réalisables en pratique.

La proportion d'analyses favorables (83%) montre bien que dans la grande majorité des cas, les opérations de collecte et de transfert sont bien réalisées dans les conditions requises. En effet, un tel contrôle a pour but de refléter l'aptitude de l'équipe à souscrire aux règles édictées, et donc la majorité des équipes suivent correctement toutes les conditions exigées par la réglementation.

Le fait que 14% des analyses soient défavorables, même si aucune ne présente de danger aigu de contamination, montre que de telles manipulations doivent être entreprises avec grand soin et selon les conditions fixées, faute de quoi la qualité sanitaire s'en trouve altérée.

Les résultats des liquides de collecte prouvent que si seuls les animaux sains, non malades cliniquement, sont l'objet de telles collectes, la probabilité de retrouver des agents pathogènes est extrêmement faible.

Les résultats des liquides de lavage sont cruciaux pour l'évaluation de la qualité sanitaire des TE des équipes contrôlées, puisqu'ils permettent à la fois d'évaluer l'efficacité de la réduction et de la disparition de la contamination éventuelle des liquides de collecte et l'absence d'addition d'agents pathogènes extérieurs. Dans 14% des cas, le but recherché n'a pas été atteint. Les raisons d'une telle observation sont multiples :

- Elles peuvent provenir d'un oubli de l'équipe de réaliser les dix lavages
- Elles peuvent correspondre à un mauvais traitement des liquides lors de la constitution de l'échantillon
- Une contamination provenant du milieu environnant (y compris le milieu de lavage qui peut avoir été contaminé au moment de sa fabrication ou de sa conservation)

Quelques dizaines d'échantillons avaient une population bactérienne 3 à 4 logs supérieure à celle retrouvée dans le liquide de collecte correspondant, traduisant indubitablement une technique et des locaux ou un environnement nettement défavorables voire inadmissibles.

En conclusion, ce type de contrôle fournit à la fois à la branche du TE et aux services vétérinaires officiels toutes les garanties sanitaires vis-à-vis des éleveurs qui introduisent des embryons issus d'autres troupeaux. Ceci démontre qu'un tel contrôle contribue à assurer la grande sécurité sanitaire du processus de TE (THIBIER M. and GUERIN B., 1993).

CONCLUSION

Un transfert embryonnaire nécessite une organisation importante. Tout d'abord, les femelles donneuses et receveuses doivent être synchronisées. Pour cela, différents protocoles sont disponibles, le plus courant étant l'utilisation d'un dispositif libérant de la progestérone ou un analogue. Puis, lorsque donneuses et receveuses sont synchronisées, et que des chaleurs de références ont été observées, un protocole de superovulation peut être mis en place sur les donneuses. Dans le protocole de base, la superstimulation des ovaires consiste en l'administration de doses décroissantes de FSH. Enfin, sept jours après l'insémination artificielle, les embryons sont récupérés par lavage des cornes utérines. Les embryons sont alors évalués sous loupe binoculaire, et ceux de meilleure qualité sont gardés et lavés.

Les embryons sélectionnés peuvent être transférés à l'état frais, c'est-à-dire le jour de la collecte, ou être congelés pour une mise en place ultérieure. La congélation des embryons est réalisée grâce à l'utilisation d'un cryoprotecteur, l'éthylène glycol étant le plus fréquemment utilisé. Ainsi, les embryons peuvent être conservés indéfiniment dans des paillettes plongées dans des conteneurs d'azote liquide à une température de -196°C . Cette congélation permet de réaliser des transferts à des dates ultérieures, et ainsi de s'affranchir d'un éventuel manque de receveuses aptes à recevoir un embryon. D'autre part, elle facilite la diffusion génétique, le transport d'embryons congelés étant plus simple que celui de veaux ou d'individus adultes.

Enfin, le transfert embryonnaire est fiable au niveau sanitaire. En effet, tout est mis en œuvre pour conserver cette efficacité sanitaire, notamment par le biais des consignes d'un organisme tel que l'IETS. Cela permet au transfert embryonnaire d'être un outil de diffusion génétique rapide présentant un minimum de risques sanitaires.

BIBLIOGRAPHIE

BALL P. J. H., PETERS A. R. (2004).

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

BARONE R. (2001).

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

BARONE R. (1978).

Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Appareil urogénital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. 1^{ère} édition. Vigot. 951 p.

BENDER R. W. et al. (2012).

BENDER R. W., HACKBART K. S., CARVALHO P. D., SANDOVAL G. B., SOUZA A. H., DRESCH A. R., VIEIRA L. M., GUENTHER J. N., WILTBANK M. C.

Use of double-flush technique to improve embryo recovery results in superovulated high producing dairy cows. *Proceeding du 28^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France)*, p. 106.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aete-proceedings-2012/file> [Consulté le 11 février 2016]

BO G. A., MAPLETOFT R. J. (2012).

Recent advances in the control of follicular development and superovulation protocols in cattle. *Proceeding du 28^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France)*, pp. 57–68.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aete-proceedings-2012/file> [Consulté le 11 février 2016]

BOURGOIN G. et al. (2004).

BOURGOIN G., QUINTON H., ROHOU A., HUMBLLOT P., PONSART C.

Variability of the different time components between flushing and transfer or freezing of a cattle embryos. *Proceeding du 20^{ème} colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2004, Lyon (France)*, p. 114.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/77-aete-proceedings-2004/file> [Consulté le 11 février 2016]

CARVALHO P. D. et al. (2012).

CARVALHO P. D., SOUZA A. H., DRESCH A. R., VIEIRA L. M., HACKBART K. S., BENDER R. W., GUENTHER J. N., WILTBANK M. C., LUCHINI D., BERTICS S., BETZOLD N., SHAVER R. D.

Effect postpartum body weight change and circulating NEFAS on embryo production in superovulated high producing dairy cows. *Proceeding du 28^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France)*, p. 122.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aete-proceedings-2012/file> [Consulté le 11 février 2016]

CHASTANT S., MAILLARD R. (1999).

BVD et transfert d'embryons chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, Volume 30, pp. 31–37.

CHEVALIER P. (2012).

L'usage des stimulateurs de croissance en production animale : position des experts et des gouvernements : revue des connaissances scientifiques [en ligne]. Direction de la santé environnementale et de la toxicologie, Institut national de santé publique du Québec, 57 p.

Disponible sur :

https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1317_UsageStimulaCroissProdAnimalPosExpertsGouv.pdf [Consulté le 3 août 2016]

COLAZO M. G., MAPLETOFT R. J. (2014).

A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, 55 (8), pp. 772-780.

Site du NCBI [en ligne], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095965/> [Consulté le 17 juillet 2016]

COLLEAU J. J., (1985).

Efficacité génétique du transfert d'embryons dans les noyaux de sélection chez les bovins laitiers. *Génétique, Sélection, Evolution*, 17 (4), pp. 499-538.

Site des archives ouvertes [en ligne], <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00893660/document> [Consulté le 25 septembre 2015]

COLLEAU J. J. et al. (1998).

COLLEAU J. J., HEYMAN Y., RENARD J. P.

Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles en sélection. *INRA productions animales*, 11 (1), pp. 41-56.

Site de l'INRA [en ligne], <https://www6.inra.fr/productions-animales/1998-Volume-11/Numero-1-1998/Les-biotechnologies-de-la-reproduction-chez-les-bovins-et-leurs-applications-reelles> [Consulté le 2 mars 2016]

CROWE M. A. (2011).

Estrous cycles : Characteristics. *Encyclopedia of dairy sciences, 2nd edition* (FUQUAY J. W. et al.), Academic Press, 4, pp. 428-433.

CZELADO J. et al. (2009).

CZELADKO J., ZNANIECKI R., JACKOWSKA M., BUKOWSKA D., OLECHNOWICZ J., JASKOWSKI J. M.

Does Flunixin meglumine change the relation between pregnancy rate and a time of passage the transfer gun through uterus cervix into the place of embryo deposition in recipient heifers? *Proceeding du 25^{ème} colloque de l'AETE, 11-12 septembre 2009, Poznan (Pologne)*, p. 156.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/82-aete-proceedings-2009/file> [Consulté le 11 février 2016]

DE ROOVER R. et al. (2001).

DE ROOVER R., KOHLEN C., DONNATELLI S., LEONARD S., VERHAEGHE B., DESSY F.

Effect of administration of FSH to prepubertal heifers on follicular developmental kinetics. *Proceeding du 17^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France)*, p. 116.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aete-proceedings-2001/file> [Consulté le 11 février 2016]

DETTNER J. et al. (2009).

DETTNER J., WOLGAST T., REUSS W., MEINECKE-TILLMANN S.

Are holstein cows with twin corpora lutea at the start of superovulation inferior embryo donors? *Proceeding du 25^{ème} colloque de l'AETE, 11-12 septembre 2009, Poznan (Pologne)*, p. 160.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/82-aete-proceedings-2009/file> [Consulté le 11 février 2016]

DEZAUX P. (2001).

Synchronisation des chaleurs chez les vaches allaitantes par l'association GnRH-PGF2 α -GnRH. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 68 p.

DOBSON H. (2003).

Stress and reproduction. *Proceeding du 19^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2003, Rostock (Allemagne)*, pp. 105–113.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/76-aete-proceedings-2003/file> [Consulté le 11 février 2016]

DUPRAS R., CHORFI Y. (2006).

The use of agarose in the freezing of sexed bovine embryos. *Proceeding du 22^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse)*, p. 106.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete-proceedings-2006/file> [Consulté le 11 février 2016]

FUENTES S., DE LA FUENTE J. (2010).

Superovulation by split FSH dose in beef cows. *Proceeding du 26^{ème} colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande)*, p. 150.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file> [Consulté le 11 février 2016]

GELDHOT A. et al. (2000).

GELDHOF A., GOOSSENS L., MOYAERT I., CUELENAERE M., ROSCHLAU K., ROSCHLAU D., NIVOT A., BECKERS J. F., ECTORS F.

Sex determination in bovine embryos by micro-aspiration results of five years practice under farm conditions. *Proceeding du 16^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne)*, p. 150.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aete-proceedings-2000/file> [Consulté le 11 février 2016]

GOVIGNON A. et al. (2001).

GOVIGNON A., PONSART C., DRIANCOURT M. A., FLORIN B., ROHOU A., HUMBLLOT P.

PMSG priming during the cycle preceding superovulation improves embryo quality in dairy heifers. *Proceeding du 17^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France)*, p. 126.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aete-proceedings-2001/file> [Consulté le 11 février 2016]

GOVIGNON A. et al. (2000).

GOVIGNON A., ROHOU A., PONSART C., DELCROIX P., HUMBLLOT P.

Sources of variation of embryo production after superovulation in prim holstein dairy cows.

Proceeding du 16^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2009, Santander (Espagne), p. 158.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aete-proceedings-2000/file> [Consulté le 11 février 2016]

Guide de la fertilité bovine, CEVA.

Fascicule *Guide de la fertilité bovine*, fourni par le laboratoire CEVA lors d'une conférence sur le site VetAgro-Sup (campus vétérinaire de Lyon) en 2014.

HANZEN C. et al. (1999).

HANZEN C., DRION P., LOURTIE O., DEPIERREUX C., CHRISTIANS E.

La mortalité embryonnaire. 1. Aspects cliniques et facteurs étiologiques dans l'espèce bovine.

Annales de Médecine Vétérinaire, 143, pp. 91–118.

HAVLICEK V. et al. (2013).

HAVLICEK V., HOELKER M., TESFAYE D., BECKERS J. F., BREM G., BESENFELDER U.

Effect of the modified superovulation protocol on the embryo development in cattle.

Proceeding du 29^{ème} colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2013, Istanbul (Turquie), p. 146.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/86-aete-proceedings-2013/file> [Consulté le 11 février 2016]

HEIJNK J. B. C. (2008).

HEIJNK J. B. C., HORNEMAN M. L., FLAPPER H., LANDMAN B., MERTON J. S.

The effect of animal regrouping on the results of a bovine in vivo embryo production program.

Proceeding du 24^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 164.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 11 février 2016]

HEYMAN Y. (2010).

From non surgical embryo transfer to somatic cloning in cattle: technical challenges and hurdles to the use of reproductive biotechnologies. *Proceeding du 26^{ème} colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande)*, pp. 7–17.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file> [Consulté le 11 février 2016]

HIDALGO C. O. et al (2002).

HIDALGO C. O., GOMEZ E., FERNANDEZ I., DUQUE P., PRIETO L., FACAL N., DIEZ C.

Progesterone levels, corpus luteum quality and pregnancy rates in heifers treated with propylene glycol prior to embryo transfer. A field trial. *Proceeding du 18^{ème} colloque AETE, 6-7 septembre 2002, Rolduc (Pays-Bas)*, p. 180.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/75-aete-proceedings-2002/file> [Consulté le 11 février 2016]

HIDALGO C. O. et al (2005).

HIDALGO C. O., GOMEZ E., TAMARGO C., FACAL N., DIEZ C.

Refining propylene-glycol dosage prior to embryo transfer. A field trial. *Proceeding du 21^{ème} colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2005, Keszthely (Hongrie)*, p. 144.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/78-aete-proceedings-2005/file> [Consulté le 11 février 2016]

HOLASEK R. et al. (2009).

HOLASEK R., FOJTA P., HEGEDUSOVA Z., HRUSKA D., KUBICA J.

Using of sex-sorted insemination doses in superovulation. *Proceeding du 25^{ème} colloque de l'AETE, 11-12 septembre 2009, Poznan (Pologne)*, p. 186.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/82-aete-proceedings-2009/file> [Consulté le 11 février 2016]

HUMBLLOT P. (1999).

Utilisation de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire en France, leur impact sur la limitation des problèmes sanitaires. *Proceeding du colloque Biotechnologies de la reproduction animale et sécurité sanitaire des aliments, 29 septembre 1999, Paris (France)*, pp. 11-14.

Site de l'ANSES [en ligne], <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOT-Co-Reproductanimale.pdf> [Consulté le 2 mars 2016]

JACOB T. (2012).

La vache, un animal prédisposé à la torsion de l'utérus : étude de 145 cas. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 96 p.

JASKOWSKI J. M. et al. (2014).

JASKOWSKI J. M., GEHRKE M., URBANIAK K., WOZNA M., RYBSKA M., JOZWIAK P., JASKOWSKI B. M., BORYCZKO Z.

Clinical or ultrasound examination for selection of recipient heifers. *Proceeding du 30^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne)*, p. 104.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/87-aete-proceedings-2014/file> [Consulté le 11 février 2016]

JASKOWSKI J. M., URBANIAK K. (2006).

Does the time needed to pass different transfer guns through the cervix and uterine body influence the pregnancy results in recipient heifers ? *Proceeding du 22^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse)*, p. 128.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete-proceedings-2006/file> [Consulté le 11 février 2016]

KAFI M., RAHMANI M. (2003).

The effect of ketoprofen on the growth of ovulatory follicle and ovulation in dairy cows. *Proceeding du 19^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2003, Rostock (Allemagne)*, p. 171.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/76-aete-proceedings-2003/file> [Consulté le 11 février 2016]

KOMMISRUDE. et al. (2002).

KOMMISRUDE E., VATN T., PEDERSEN M., OLSAKER I., FARSTAD W.

In vivo production of bovine embryos using two feeding regimes differing in urea content.

Proceeding du 18^{ème} colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2001, Rolduc (Pays-Bas), p. 194.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/75-aete-proceedings-2002/file> [Consulté le 11 février 2016]

KORHONEN K. et al. (2010).

KORHONEN K., KANANEN K., LINDEBERG H., JULKUNEN H., VARTIA K., KAIMIO I., KONTINEN A., BREDBACKA P., VILKKI J., PEIPPO J.

Ascorbic acid exposure during biopsing and freezing of bovine in vivo embryos increases calving rate. *Proceeding du 26^{ème} colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande)*, p. 184.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file> [Consulté le 11 février 2016]

LACAZE S. et al. (2007).

LACAZE S., PONSART C., HUMBLLOT P.

Sexing and direct transfer of bovine biopsied frozen-thawed embryos under-on-farm conditions in a commercial program. *Proceeding du 23^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2007, Alghero (Italie)*, p. 188.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/80-aete-proceedings-2007/file> [Consulté le 11 février 2016]

LAIZEAU J. S. (2003).

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

LAIZEAU J. S. et al. (2001).

LAIZEAU J. S., MANCIAUX L., BEKHOUCHE N., MARIE M., HUMBLLOT P., PONTER A., GRIMARD B.

Milk production and energy metabolism affect embryo production in montbeliarde dairy cattle in France. *Proceeding du 17^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France)*, p. 142.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aete-proceedings-2001/file> [Consulté le 11 février 2016]

LANDMAN B. et al. (2006).

LANDMAN B., RAMIREZ O., HAZELEGER W., MERTON S., MULLAART E.

Optimization of flushing procedures for embryo recovery in dairy cattle. *Proceeding du 22^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse)*, p. 138.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete-proceedings-2006/file> [Consulté le 11 février 2016]

LE BOURHIS D. et al. (2008).

LE BOURHIS D., AMIGUES Y., CHARREAUX F., LACAZE S., TISSIER M., MOREL A., MERVANT G., MOULIN B., GONZALEZ C., HUMBLLOT P.

Embryo genotyping from in vivo biopsed bovine embryos. *Proceeding du 24^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France)*, p. 188.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 11 février 2016]

LEHLOENYA K. C. et al. (2008).

LEHLOENYA K. C., GREYLING J. P. G., GROBLER S.

Donor age effect on superovulatory response of boer goat does. *Proceeding du 24^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France)*, p. 190.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 11 février 2016]

LE TALLEC B. et al. (2001).

LE TALLEC B., PONSART C., GUERIN B.

Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. *Proceeding du 17^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France)*, pp. 71–81.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aete-proceedings-2001/file> [Consulté le 11 février 2016]

LINDEBERG H. et al. (2008).

LINDEBERG H., KAIMIO I., HANNILA M. L.

Influence of an embryo or the recipient on pregnancy rate after embryo transfer in dairy cattle. *Proceeding du 24^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France)*, p. 196.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 11 février 2016]

LINDEBERG H. et al. (2005).

LINDEBERG H., KANADEN-ANTTILA K., VARTIA K., AALTO J., HALMEKYTO M., SALAHEDDINE M., DE LOOS F.

Repeatable use of holstein-friesian heifers as embryo donors in a commercial embryo recovery program. *Proceeding du 21^{ème} colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2005, Keszthely (Hongrie)*, p. 164.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/78-aete-proceedings-2005/file> [Consulté le 11 février 2016]

MAILLO V. et al. (2011).

MAILLO V., BESENFELDER U., HAVLICEK V., GARRETT M., KELLY A. G., RIZOS D., LONERGAN P.

Effect of lactation on circulating metabolic hormones postpartum and early embryo development in dairy cows. *Proceeding du 27^{ème} colloque AETE, 9-10 septembre 2011, Chester (Angleterre)*, p. 196.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/84-aete-proceedings-2011/file> [Consulté le 11 février 2016]

MALAFOSSE A. (1997).

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

MANCIAUX L. et al. (2003).

MANCIAUX L., MARIANI E., HUMBLLOT P., PONSART C.

Influence of milk parameters on embryo production following superovulation in the montbeliard breed. *Proceeding du 19^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2003, Rostock (Allemagne)*, p. 190.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/76-aete-proceedings-2003/file> [Consulté le 11 février 2016]

MAPLETOFT R. (2002).

MAPLETOFT R., STEWARD K. B., ADAMS G. P.

Superovulation in perspective. *Proceeding du 18^{ème} colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2002, Rolduc (Pays-Bas)*, pp. 120–128.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/75-aete-proceedings-2002/file> [Consulté le 11 février 2016]

MENARD D. P. et al. (2000).

MENARD D. P., MARTINEZ-BELLO J. D., IGLESIAS A.

It is possible to increase the number of viable embryos using progestagen ear implants 1-3 days before standard superovulation with low response cows or low fertility cows. *Poceeding du 16^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne)*, p. 186.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aete-proceedings-2000/file> [Consulté le 11 février 2016]

MENISSIER F. (1983).

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

MOGAS T. G. (2014).

New insight on cryopreservation of oocytes and embryos. *Proceeding du 30^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne)*, pp. 61–76.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/87-aete-proceedings-2014/file> [Consulté le 11 février 2016]

MONNIAUX D. (2012).

Superovulatory responses and embryo production in ruminants : lessons from ovary. *Proceeding du 28^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France)*, pp. 7–40. Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aete-proceedings-2012/file> [Consulté le 11 février 2016]

MONTMEAS L. (2013).

Les hormones de la reproduction, *Reproduction Des Animaux D'élevage. 3^o édition*. Educagri Editions, pp. 34–53.

NIVOT A. (1998).

Transplantation embryonnaire bovine - le transfert direct : une nouvelle opportunité. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 1998 (5), pp. 13–19.

NOORDMAN J. W. J. (2011).

NOORDMAN J. W. J., MULLAART E., KNIJN H. M., MERTON J. S.

Effect of family on number of bovine embryos obtained by flushing after superovulation. *Proceeding du 27^{ème} colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2011, Chester (Angleterre)*, p. 210.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/84-aete-proceedings-2011/file> [Consulté le 11 février 2016]

Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties (2015).

Collecte et manipulation des embryons du bétail et d'équidés collectés in vivo. *Code sanitaire pour les animaux terrestres. 24^{ème} édition*, 1, pp. 148–155.

PASQUIER P. (1988).

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

PESSOA G. A. (2006).

PESSOA G. A., NAVARRO R. B., CALEGARI J., SILVA C. A. M., RUBIN M. I. B.
Bacterial contamination in liquid nitrogen containers : pathogen and disinfection. *Proceeding du 22^{ème} colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2002, Rolduc (Pays-Bas)*, p. 167.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/75-aete-proceedings-2002/file> [Consulté le 11 février 2016]

PINARD P. (1981).

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

PONSART C. et al. (2000).

PONSART C., DELCROIX P., ROHOU A., JUPIN L., HUMBLLOT P.
Sources of variation of pregnancy rates after transfer of bovine frozen embryos. *Proceeding du 16^{ème} colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne)*, p. 192.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aete-proceedings-2000/file> [Consulté le 11 février 2016]

PONSART C. et al. (2006).

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

PONSART C. et al. (2005).

PONSART C., QUINTON H., ROHOU A., KEHLEMBO J., BOURGOIN G., HUMBLLOT P.
Influence of the different time components between flushing and transfer on pregnancy rates of fresh cattle embryos. *Proceeding du 21^{ème} colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2005, Keszthely (Hongrie)*, p. 180.
Site de l'AETE [en ligne], www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/78-aete-proceedings-2005/file [Consulté le 11 février 2016]

PURSLEY J. R. et al. (1995).

PURSLEY J. R., MEE M. O., WILTBANK M. C.
Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44 (7), pp. 915–923.

ROBERTSON I., NELSON R. E. (2010).

Certification and identification of embryos (Chapter 9), *Manual of the International Transfer Society*, 4th edition, pp. 86–105.

SANTOS FILHO A. S. et al. (2010).

SANTOS FILHO A. S., GUIDO S. I., BARTOLOMEU C. C., OLIVEIRA J. C. V.
Superovulatory response in old dairy cows. *Proceeding du 26^{ème} colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande)*, p. 224.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file> [Consulté le 11 février 2016]

SCHIEWE M. C., HASLER J. F. (2010).

General hygiene and quality control practices in an embryo-production laboratory (Chapter 8), *Manual of the International Transfer Society*, 4th edition, pp. 73–85.

SERRE M. (1999).

Intérêt de la transplantation embryonnaire en race bovine Charolaise. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 77 p.

SLEZAKOVA M. et al. (2007).

SLEZAKOVA M., HEGEDUSOVA Z., RIHA J.
The effect of season on the results of superovulation and embryo transfer in beef cattle. *Proceeding du 23^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2007, Alghero (Italie)*, p. 234.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/80-aete-proceedings-2007/file> [Consulté le 11 février 2016]

STEVENSON J. F. (2007).

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

STRINGFELLOW D. A. (2010).

Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos (Chapter 6), *Manual of the International Transfer Society*, 4th edition, pp. 65–68.

TAPONEN J., MIKKOLA M. (2010).

Fate of donor cows and heifers after embryo flushing. *Proceeding du 26^{ème} colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande)*, p. 234.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file> [Consulté le 11 février 2016]

THIBIER M. (2014).

The european embryo transfer industry in cattle - a challenge in 1984, a success in 2014 - and well supported and reported by the AETE. *Proceeding du 30^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne)*, pp. 31–44.
Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/87-aete-proceedings-2014/file> [Consulté le 11 février 2016]

THIBIER M. (1994).

L'originalité de la surveillance sanitaire et vétérinaire du transfert embryonnaire bovin. *Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 78 (4), pp. 193–204.

THIBIER M., GUERIN B. (1997).

La sécurité sanitaire dans le transfert d'embryons bovins, collectés *in vivo*, fécondés *in vitro* ou clonés. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 70 (2), pp. 183–194.

THIBIER M., GUERIN B. (1993).

Le contrôle de qualité sanitaire du transfert d'embryons bovins: six années d'expérience française. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 66 (4), pp. 429–438.

VAN SOOM A. et al. (2008).

VAN SOOM A., IMBERECHTS H., DELAHAUT P. H., THIRY E., VAN ROY V., WALRAVENS K., ROELS S., SAEGERMAN C.

Sanitary control in bovine embryo transfer : where practice meets science. *Proceeding du 24^{ème} colloque AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France)*, pp. 95–116.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 11 février 2016]

VOS P. et al. (2004).

VOS P., GROENENDAAL H., VAN GASTEL A., ALGRIANY O., DIELEMAN S. J.

Impact of the accuracy of the time interval between FSH injections on follicular quality in superovulated cows. *Proceeding du 20^{ème} colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France)*, p. 190.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/77-aete-proceedings-2004/file> [Consulté le 11 février 2016]

WATHES D. C. et al. (2004).

WATHES D. C., TAYLOR V. J., CHENG Z., SWALI A., BEEVER D. E.

Relations between energy balance and reproduction in high yielding dairy cows. *Proceeding du 20^{ème} colloque AETE, 10-11 septembre 2004, Lyon (France)*, p. 96.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/77-aete-proceedings-2004/file> [Consulté le 11 février 2016]

WOLGAST T. et al. (2008).

WOLGAST T., DETTERER J., REUSS W., SCHMIDT T., MEINECKE-TILLMANN S.

Improvement of embryo recovery rates by modified flushing techniques in holstein cattle at a commercial embryo transfer station. *Proceeding du 24^{ème} colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France)*, p. 240.

Site de l'AETE [en ligne], <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file> [Consulté le 11 février 2016]

WRIGHT J. M. (2010).

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