

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Institut National Agronomique
(INA . El-Harrach . Alger)
المعهد القومي الفلاحي الحراش

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de
Doctorat d'Etat en Sciences Agronomiques

Optimisation des traitements de
superovulation dans le cadre du transfert
embryonnaire chez les bovins

Présentée par:
Mohamed LAFRI

Devant la commission d'examen :

Président : B AZZOUT (Professeur, Institut national agronomique El Harrach)

Rapporteurs : F BADINAND (Professeur, Ecole vétérinaire de Lyon France)
: S.Y. EL DAHASH (Professeur, Faculté vétérinaire de Tripoli - Lybie)

Examineurs : F. KHEMAR (Professeur, Université de Bab Ezzouar)
: R. OUZROUT (Professeur, Université de Annaba)

Invité d'honneur : P HUMBLLOT (D.M.V, H.D.R, U.N.C.E.I.A Maisons-Alfort - France)

Juillet 2003

Table de matières

A – Partie bibliographique

	Page
Chapitre I : Introduction générale	12
I- Importance et perspectives économiques du transfert embryonnaire en élevage bovin	13
II- Les biotechnologies de l'embryon et génétique	16
III- L'élevage bovin algérien : problématique	17
IV- Les biotechnologies appliquées à la reproduction en Algérie	19
V- Objets des travaux	20
Chapitre II : Le complexe hypothalamo-hypophysaire	
I- Introduction	23
II- Aspects morphologiques	26
III- Aspects fonctionnels	27
III.1- Régulation de la synthèse et de la libération des gonadotropines :	28
III.1.1- Hormone hypothalamique : La GnRH	
III.1.2- Le stéroïdes gonadiques	30
III.1.3- Les peptides de la famille inhibine/Activine et la follistatine	31
III.1.4- La leptine et son influence sur l'axe hypothalamo-hypophysaire	31
III.2- Régulation de la sécrétion du couple GnRH/LH	
III.2.1 - Les afférences monoaminergiques	33
III.2.2- Les afférences peptidergiques	
III.2.3- Les afférences contenant des acides aminés	34
III.2.4- Afférences de neurones porteuses de récepteurs hormonaux	34

Table des matières

A – Partie bibliographique

Page	
11	Chapitre I : Introduction générale
12	I- Importance et perspectives économiques du transfert enzymatique en élevage bovin
15	II- Les biotechnologies de l'élevage et génétiques
17	III- L'élevage bovin algérien : problématiques
19	IV- Les biotechnologies appliquées à la reproduction en Algérie
20	V- Objectifs des travaux

Chapitre II : Le complexe hypothalamo-hypophysaire

23	I- Introduction
25	II- Aspects morphologiques
27	III- Aspects fonctionnels
28	III.1- Régulation de la synthèse et de la libération des gonadotrophes :
	III.1.1- Hormone hypothalamique ; La GnRH
30	III.1.2- Les stéroïdes gonadiques
31	III.1.3- Les peptides de la famille inhibitrice/tyrosine et la folliculine
31	III.1.4- Le régime et son influence sur le complexe hypothalamo-hypophysaire
	III.2- Régulation de la sécrétion de l'axe GH/IGF1
33	III.2.1- Les stéroïdes androgéniques
	III.2.2- Les stéroïdes œstrogéniques
34	III.2.3- Les stéroïdes corticostéroïdes des axes annexes
34	III.2.4- Actions de l'axe GH/IGF1 sur les récepteurs hormonaux

III-3. Libération pulsatile des gonadotropines:	35
III-4. Le rétrocontrôle périphérique via les stéroïdes gonadiques	36
III-4.1. Le feedback négatif de E2	36
III-4.2. Le feedback positif	37

Chapitre III : La physiologie de l'ovaire

I- Introduction.	41
<u>II- Le développement folliculaire : Caractéristiques morphologiques</u>	43
II.1-. La phase de multiplication	43
II.2-. La phase de croissance	44
II.2-.1.- Le follicule primordial	
II.2-.2- Le follicule primaire	
II.2-.3.- Le follicule secondaire	
II.2-.4.- Le follicule tertiaire	
II.2.5- Le follicule mûr ou follicule de De-Graaf	46
<u>II.3-. La phase de maturation</u>	48
II-.3.1- La maturation nucléaire	
II-3.2- La maturation cytoplasmique	51
II-.3.3- La maturation membranaire	
<u>II-.4- L'atrésie folliculaire</u>	52
4-1-. Sur le plan cytologique	
4-2-. Sur le plan biochimique et fonctionnel	
III- Dynamique de la croissance folliculaire	56
III-.1- La théorie des vagues folliculaires	
III-.2- Effets du stade physiologique sur la dynamique folliculaire	56
III-2.-1 Durant le cycle sexuel	
III-. 2.2- En période prépubertaire et pubertaire	
III-.2. 3- En période de gestation et du post-partum	57
III-3.- Notion de recrutement, sélection et dominance	58

38	III-5. L'adhésion (au sein des gonades)...
38	III-4. Le contrôle hormonal de la spermatogenèse...
36	III-4.1. Le feedback négatif de LH...
32	III-4.2. Le feedback positif...

Chapitre III : La physiologie de l'ovaire

41	I. Introduction
41	II. Le développement folliculaire : caractéristiques morphologiques
43	II-1. La phase de multiplication
44	II-2. La phase de croissance
	II-2.1. Le follicule primordial
	II-2.2. Le follicule primaire
	II-2.3. Le follicule secondaire
	II-2.4. Le follicule tertiaire
46	II-2.5. Le follicule antral ou follicule de De Graaf
48	II-3. La phase de maturation
	II-3.1. La maturation antrale
51	II-3.2. La maturation ovulatoire
52	II-3.3. La maturation luteinisante
	II-4. L'ovulation
	II-4.1. Sur le plan cytoplogique
	II-4.2. Sur le plan biochimique et hormonal
56	III. Dynamique de la phase de folliculogénèse
	III-1. Les phases des ovaires folliculaires
58	III-2. Rôle du stade folliculaire sur le développement folliculaire
	III-2.1. Rôle de l'ovulation
59	III-2.2. En période post-ovulatoire et luteinisante
59	III-2.3. En période de gestation et du post-partum
58	III-3. Rôle de l'ovulation, de la phase de croissance et de la phase de maturation

III-3.1- Le recrutement	75
III-3.2- La sélection	
III-3.3- La dominance	59
IV- Régulation de la croissance folliculaire	60
IV- 1- Phase gonadotrope indépendante	61
IV-2- Phase gonadotrope dépendante	62
IV-2.1 Mécanisme régulateur du nombre de vagues folliculaires	63
IV-2.2 - Le contrôle de la phase de recrutement	64
IV-2-2.1- Données générales	65
IV-2-2-2- Notion de déviation du diamètre folliculaire	
IV-2-2-3.- Les effets des facteurs de croissance	68
IV-2-2-4.- Effets de l'hormone de croissance	
IV-2.3- <u>Le contrôle hormonal de la phase de sélection</u>	69
IV-2-3-1.- Données générales	
IV-2-3-2.- Le contrôle endocrinien	70
IV-2-3-3. L'inhibine : caractéristiques et mode d'action	71
IV-2-3-4.- La follistatine : caractéristiques et mode d'action	72
IV-2.4- <u>Le contrôle hormonal de la phase de dominance.</u>	72
IV-3- <u>Rôle des facteurs de croissance et des protéines de liaison dans le développement des follicules antraux</u>	74
1- Cas des petits follicules antraux	
2- Cas des follicules terminaux	
IV-4- <u>Événements structuraux au niveau ovarien et variations hormonales selon les phases du cycle</u>	76

77	III-3-3- La dominance
	III-3-2- La sélection
	III-3-1- Le recrutement
80	IV- Régulation de la croissance folliculaire
81	IV-4- Phase gonadotrope dépendante
82	IV-3- Phase gonadotrope dépendante
83	IV-2-1- Mécanisme régulateur du nombre de vagues folliculaires
84	IV-2-2- Le contrôle de la phase de recrutement
85	IV-2-3-1- Facteurs génétiques
	IV-2-3-2- Action de l'hypothalamus
88	IV-2-3-3- Les effets des facteurs de croissance
	IV-2-3-4- Effets de l'hormone de croissance
89	IV-2-3-5- Action de l'ovulation
	IV-2-3-6- Données cliniques
90	IV-2-3-7- Le contrôle endocrinien
91	IV-2-3-8- Équilibre : caractéristiques et mode d'action
92	IV-2-3-9- La folliculogénèse : caractéristiques et mode d'action
93	IV-2-4- Le contrôle hormonal de la phase de dominance
94	IV-2-5- Rôle des facteurs de croissance et des protéines de liaison dans le développement des follicules antraux
	1- Cas des follicules antraux
	2- Cas des follicules primaires
95	IV-2-6- Rôle des facteurs de croissance et des protéines de liaison dans le développement des follicules antraux
	1- Cas des follicules antraux
	2- Cas des follicules primaires

CHAPITRE IV: Les traitements de superovulation 76

I- Etude des réponses aux traitements de superovulation

I-1. Introduction.	79
I-2. Principes des traitements de superovulation	
I-2-1. La.P.M.S.G (Pregnant Mare Serum Gonadotropine) ou e.C.G	79
I-2-2. La F.S.H (Folliculo-Stimulating Hormon)	82
I-2-3.- L'Human Menopausal Gonadotropin	85
I-3- Moment et durée de la stimulation gonadotrope	
I-3-1 Moment de la stimulation	
I-3-2. Durée et modalités de la stimulation	86

II- Les voies d'approche pour améliorer les réponses aux traitements de superovulation

II-1. Introduction	
II-2.- L'influence du follicule dominant sur les autres follicules	92
II-3- Caractéristiques des traitements de superovulation	
II-3-1- Les prétraitements de gonadotropines	
II-3-2.- Traitements à base de liquide folliculaire	94
II-3-3- Les traitements physiques	95
II-3-4- Les traitements hormonaux	
II-3-4-1.- Les traitements à base de valérate d'oestradiol	96
II-3-4-2- Les traitements à base de human-Chorionic-Gonadotropin	
II-3-4-3- Les traitements par des agonistes de la GnRH	98

III- Endocrinologie chez les donneuses superovulées

III-1-. Caractéristiques de l'oestrus et des ovulations	101
III- 2- Caractéristiques des profils hormonaux de la LH	
III-3-. Caractéristiques du profil hormonal de la FSH	
III- 4. Caractéristiques du profil hormonal de E2	
III- 5- Caractéristiques du profil hormonal de la Progestérone (P4)	
III-6.- Caractéristiques ultra-structurales des ovocytes	107

CHAPITRE IV: Les traitements de superovulation

I - Étude des réponses aux traitements de superovulation

- I-1 - Introduction 75
- I-2 - Principes des traitements de superovulation 76
- I-2-1 - La FSH (Follicle Stimulating Hormone) 76
- I-2-2 - La FSH (Follicle Stimulating Hormone) 82
- I-2-3 - L'hormone chorionique gonadotrope 85
- I-3 - Moment et durée de la stimulation ovarienne 87
- I-3-1 - Moment de la stimulation 87
- I-3-2 - Durée et modalités de la stimulation 88

II - Les voies d'accès pour améliorer les réponses aux traitements de superovulation

- II-1 - Introduction 92
- II-2 - Influence du follicule dominant sur les autres follicules 93
- II-3 - Caractéristiques des traitements de superovulation 94
- II-3-1 - Les effets directs de gonadotrophes 94
- II-3-2 - Les effets à base de follicules 95
- II-3-3 - Les traitements physiques 95
- II-3-4 - Les traitements hormonaux 96
- II-3-4-1 - Les traitements à base de vitamine D, estradiol 96
- II-3-4-2 - Les traitements à base de human Chorionic Gonadotropin 98
- II-3-4-3 - Les traitements par des agonistes de la GnRH 98

III - Caractéristiques des réponses ovariennes aux traitements

- III-1 - Caractéristiques de l'ovulation 101
- III-2 - Caractéristiques des profils hormonaux de la LH 102
- III-3 - Caractéristiques du profil hormonal de la FSH 103
- III-4 - Caractéristiques du profil hormonal de la GnRH 104
- III-5 - Caractéristiques du profil hormonal de la Progesterone (P) 105
- III-6 - Caractéristiques des réponses des ovocytes 106

IV- Détermination de la qualité des embryons

IV- 1.- Les premiers stades du développement de l'embryon .	109
IV-2-. Premières divisions cellulaires	
IV-3-. Sortie de pellucide et phase d'élongation	112
IV-4.- L'implantation	
IV-5-. Critères d'identification de la qualité des embryons	113

B- Partie expérimentale

Première partie de l'étude

<i>«Effet des progestagènes 'le CIDR' lors de traitements de superovulation sur la production d'embryons et les profils hormonaux »</i>	117
---	-----

<u>I- Introduction</u>	119
------------------------	-----

<u>II- Matériel et méthodes</u>	121
---------------------------------	-----

1- Cadre et période de l'étude	
2- Les animaux et traitements	
3- Planning des traitements	123
4- La, détection de l'oestrus et l'insémination artificielle	
5- Les prélèvements sanguins	124
6- Les dosages hormonaux : P4, LH et E2	
7- L'analyse statistique	125

<u>III- Résultats</u>	126
-----------------------	-----

1- Effets des traitements sur la production d'embryons	
2- Caractéristiques des intervalles entre fin du traitement et les événements reproductifs	128
3- Caractéristiques des profils hormonaux durant et après superovulation	130

<u>IV- Discussion</u>	133
-----------------------	-----

IV - Océanographie de la zone des canyons

109	IV-1 - Les premiers stades du développement de l'empire
	IV-2 - Premières divisions cellulaires
112	IV-3 - Sortie de cellule et phase d'élongation
	IV-4 - Maturation
113	IV-5 - Caractéristiques de la zone des canyons

B - Partie expérimentale

Essais de culture de cellules

117	1 - Culture des cellules dans le sérum de veau
	2 - Culture des cellules dans le sérum de cheval
118	3 - Culture des cellules dans le sérum de mouton
121	4 - Culture des cellules dans le sérum de chèvre
	5 - Culture des cellules dans le sérum de porc
123	6 - Culture des cellules dans le sérum de bœuf
124	7 - Culture des cellules dans le sérum de chien
125	8 - Culture des cellules dans le sérum de chat
126	9 - Culture des cellules dans le sérum de furet
128	10 - Culture des cellules dans le sérum de rat
130	11 - Culture des cellules dans le sérum de souris
133	12 - Culture des cellules dans le sérum de hamster

Deuxième partie de l'étude

«Effet du synchronisme entre le pic de LH et la 1^{ère} IA chez des bovins soumis a des traitements de superovulation a base de FSH vs FSH + LH»

<u>I – Introduction</u>	138
<u>II- Matériels et méthodes</u>	141
1- Cadre et période de l'étude	
2- Les animaux et traitements	
3- Les prélèvements sanguins	144
4- Les dosages hormonaux : P4, LH et E2	
5- L'analyse statistique	145
<u>III- Résultats</u>	146
1- Effets des traitements sur la production d'embryons	
2- Effets de la ponction du follicule dominant sur les résultats de production d'embryons	147
3- Effets des traitements sur les intervalles	
4- Caractéristiques des profils hormonaux durant et après superovulation	149
<u>IV- Discussions</u>	152
C- Conclusion générale	159
D- Recommandations	166
Références bibliographiques	170
Publications de l'auteur	187

Résumé

Parmi les moyens d'augmenter les résultats de superovulation figure le moment précis de l'IA par rapport à l'intervalle pic de LH et l'ovulation. Les travaux ont été conduits en deux parties. La première partie de l'étude vise à comparer la production d'embryons après traitement de superovulation classique (Traitement 1, T1) ou sur cycle maîtrisé par un progestagène «le CIDR» (Traitement 2, T2). Le CIDR était inséré au 11^{ème} jour d'un cycle synchronisé et retiré 5 jours après. Une dose totale de 350 µg FSH était administrée (8 injections IM pendant 4 jours; la 1^{ère} injection était faite à J13 (J0 = 1^{er} jour du cycle) en doses décroissantes; la PG est injectée lors de la 3^{ème} injection de FSH. Les IA sont réalisées à 12 et 24 heures après apparition d'œstrus. Les embryons étaient collectées au jour 7 et leur viabilité estimée selon les critères morphologiques adoptées par l'I.E.T.S; 1989 (International Embryo Transfer Society). La LH était mesurée par EIA sur des échantillons de sang recueillis toutes les 3 h durant 36 h, commençant 24 h après PG (T1) ou 12 h après retrait du CIDR (T2). Les effets de l'intervalle et groupe de traitement entre pic de LH et IA (2 classes, <10 h et >10 h) et leur interaction sur la qualité et production d'embryons étaient analysées par ANOVA (proc GLM,).

Aucun effet de traitement n'a été observé sur les variables de la production d'embryon. Les intervalles entre la fin de traitement et début d'œstrus et entre fin de traitement et la décharge du pic de LH étaient plus importantes chez les génisses traitées durant un cycle classique que pendant un cycle maîtrisé par le CIDR-B respectivement (45.5 ± 1.4 vs 31.9 ± 0.7 ; 42.0 ± 1.6 vs 31.0 ± 1.5 ; $P < 0.05$). L'intervalle moyen entre le pic de LH et la 1^{ère} IA était corrélé significativement avec les nombres d'embryons viables et de classe 1 ($r=0.45$, et $r=0.50$, $P=0.01$, $n=24$ respectivement). Les nombres d'embryons viables et de classe 1 ont été augmentés considérablement ($P < 0.01$) quand les animaux avaient un intervalle de LH atteignant un maximum en 1^{ère} IA >10 h (7.2 ± 0.9 et 3.5 ± 0.6) comparés aux intervalles plus courts (4.2 ± 1.1 et 2.0 ± 0.7) alors que le nombre total d'embryons était inchangé (11.8 ± 1.4 vs 10.3 ± 1.8).

La deuxième partie de l'étude avait pour but d'évaluer l'effet de 2 protocoles de superovulation à base de FSH en testant l'influence d'une addition de LH au moment des 2 dernières injections de FSH par rapport aux traitements classiques de superovulation. Les donneuses ont été réparties en deux groupes de 5 (G1 et G2) et traitées successivement à 6 semaines d'intervalle. Le groupe 1: Traitement (T3), traitement classique de FSH (8 injections de FSH en doses décroissantes) pendant 4 jours suivi du traitement (T4); traitement de superovulation à base de FSH associé à 4 injections de LH faites au 3^{ème} et 4^{ème} jour du traitement. Le groupe 2: Les animaux subissent le traitement (T4), suivi 6 semaines après du traitement (T3). Les animaux étaient inséminés systématiquement 12 et 24 h après détection des chaleurs. Après collecte cervicale effectuée à J7. Les embryons sont jugés et classés selon les critères morphologiques de l'IETS (1998). La LH a été mesurée par EIA sur des prélèvements sanguins effectués 24 heures après induction de la lutéolyse par la PG, toutes les 3 heures pendant 36 heures. Les caractéristiques de production d'embryons ainsi que des profils hormonaux (LH, E2, et P4) et leur effet sur l'intervalle pic de LH-1^{ère} IA suite aux traitements de superovulation étaient analysés par ANOVA (Proc GLM).

L'intervalle moyen entre l'injection de la PG et le pic de LH est de $43,2 \pm 1,7$ heures. Aucun effet de traitement n'a été observé sur cet intervalle. Aucune différence significative n'a été mise en évidence sur la production et la qualité d'embryons, avec des nombres moyens d'embryons totaux, viables et congelables de $11,8 \pm 3,0$; $7,3 \pm 2,3$; $4,6 \pm 1,4$ ($p \geq 0,05$) respectivement. Aucun effet de traitement n'a été observé sur la durée de l'intervalle entre l'injection de PG et l'apparition des chaleurs, avec des valeurs moyennes $40,6 \pm 0,7$ heures et variant entre 37 et 46 heures. Les valeurs maximales d'E2 au pic étaient corrélées positivement aux concentrations mesurées à la 1^{ère} FSH ($r=0.56$; $p=0.01$) par contre elles étaient corrélées négativement au nombre d'embryons congelables ($r=0.44$; $p=0.05$; $n=18$).

En conclusion le déclenchement tardif du pic de LH par rapport à l'apparition de l'oestrus est associé avec une qualité d'embryons inférieure quand la 1^{ère} IA est réalisée 12 h après oestrus systématiquement. D'autres travaux doivent être conduits pour montrer si ces résultats peuvent être améliorés quand on peut inséminer après l'apparition de l'oestrus ou si l'utilisation de kits de LH seraient déterminants pour contrôler les moments les plus favorables pour l'IA.

Mots clés : superovulation, vache, oestradiol, LH, gonadotropines