

# **SOMMAIRE**

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>

## **PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **FACTEURS DE VARIATION DES RESULTATS DE COLLECTE D'EMBRYONS**

<b>I - INFLUENCE DE LA DONNEUSE D'EMBRYONS .....</b>	<b>17</b>
A – Facteurs génétiques.....	17
1 – La race .....	17
2 - L'ascendance paternelle.....	18
B – Facteurs physiologiques.....	19
1 - L'âge et la parité .....	19
2 – La lactation et le niveau de production laitière .....	19
3 - L'intervalle vêlage - collecte .....	20
C – Facteurs sanitaires.....	20
1 – Infertilité et production d'embryons .....	20
2 – Influence d'une infection par le virus BVD.....	20
<b>II - INFLUENCE DU MALE.....</b>	<b>21</b>
A – Effet direct du taureau .....	21
B – Effet du protocole d'insémination .....	21
<b>III - INFLUENCE DU TRAITEMENT .....</b>	<b>22</b>
A – Les hormones utilisables .....	22
1 – Choix de l'hormone de superovulation .....	22
2 – Association PMSG/anti-PMSG.....	23
3 – Influence du rapport FSH/LH des préparations commerciales .....	24
B – Le protocole .....	25
1 – Rythme d'injection.....	25
2 – Site d'injection .....	26
3 – Cycle naturel ou maîtrisé.....	27

4 – Influence de la répétition des traitements.....	28
5 – Influence du jour du cycle auquel débute le traitement .....	28
<b>C – Dernières avancées et recherches en cours .....</b>	<b>29</b>
1 – Notion de vagues de croissance folliculaire et régulation du nombre de follicules ovulatoires .....	29
2 – Comment éviter les effets délétères du follicule dominant ? .....	30
a – Par un suivi échographique quotidien pour commencer le traitement en l’absence d’un follicule dominant.....	30
b – Par l’étude de la population folliculaire le jour du début du traitement .....	31
c – Par l’élimination du follicule dominant .....	32
3 – Augmenter le nombre de follicules susceptibles de répondre au traitement de stimulation ovarienne .....	36
a – Par le « priming » .....	36
b – Par une stimulation de la sécrétion d’IGF-1 .....	37
<b>IV - INFLUENCE DE L’ALIMENTATION .....</b>	<b>38</b>
<b>V - INFLUENCE D’AUTRES FACTEURS D’ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>39</b>
A – Les conditions atmosphériques et le climat .....	39
B – L’exploitation.....	40
C – Le mois, la saison et l’année de collecte.....	40
D – L’opérateur .....	40
<b><u>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE RETROSPECTIVE</u></b>	
<b>ETUDE DES FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION D’EMBRYONS EN RACE CHAROLAISE EN CLIENTELE</b>	
<b>I – MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>45</b>
A – Présentation de Charolais Embryons .....	45
B – Population d’étude .....	45
C – Protocole d’étude .....	46
1 – Les traitements de superovulation.....	46
a – Nature de la préparation de FSH et doses administrées .....	46
b – Présentation des différents protocoles utilisés .....	47
2 – La collecte des embryons .....	49
3 – Recherche et appréciation de la viabilité des embryons .....	49
D – Données recueillies.....	50
1 – Par l’intermédiaire de Charolais Embryons .....	50
2 – Par l’intermédiaire du Herd Book Charolais.....	50
E – Présentation des variables .....	52
1 – Variables « individuelles » .....	52
2 – Variables liées à la collecte .....	54

3 – Variables réponses.....	59
F – Analyses statistiques .....	59
1 – Analyse univariée.....	61
2 – Analyse multivariée.....	62
<b>II – RESULTATS.....</b>	<b>62</b>
A – Analyse descriptive.....	62
1 – Taux global de superovulation après traitement .....	62
2 – Résultats moyens par collecte .....	62
3 – Corrélations entre variables.....	63
B – Facteurs de variation du <i>Nombre total de structures par collecte</i> et du <i>Nombre d’embryons viables par collecte</i> .....	63
1 – Analyse sur l’échantillon total.....	63
a – Analyse univariée.....	63
$\alpha$ – Distribution des variables réponses.....	63
$\beta$ – Variables explicatives.....	64
b – Analyse multivariée .....	66
$\alpha$ – Modélisation de la variable réponse <i>Nombre total de structures par collecte</i> . .....	66
$\beta$ – Modélisation de la variable réponse <i>Nombre d’embryons viables par collecte</i> .....	67
$\chi$ – Bilan .....	69
2 – Analyse sur le sous-ensemble des vaches .....	69
a – Analyse univariée.....	69
$\alpha$ – Distribution des variables réponses.....	69
$\beta$ – Variables explicatives.....	70
b – Analyse multivariée .....	71
$\alpha$ – Modélisation de la variable réponse <i>Nombre total de structures par collecte</i> . .....	71
$\beta$ – Modélisation de la variable réponse <i>Nombre d’embryons viables par collecte</i> .....	72
$\chi$ – Bilan .....	74
<b>III – DISCUSSION .....</b>	<b>74</b>
A – Méthodologie.....	74
1 – Population d’étude.....	74
2 – Le protocole.....	75
3 – Les données recueillies.....	75
B – Activité de collecte de Charolais Embryons.....	75
1 – Evolution de l’activité sur la période d’étude (1989-1999) .....	75
2 – Evolution de l’activité au cours de l’année .....	76
B – Les résultats .....	76
1 – Taux global de superovulation .....	76
2 – Taux de collecte après traitement et résultats moyens par collecte.....	76
3 – Facteurs de variation des résultats de collecte .....	77
a – L’âge et la <i>parité</i> .....	77
b – Le <i>rang de traitement intralactation</i> .....	79
c – L’ <i>intervalle vêlage–traitement</i> de superovulation .....	79
d – L’ <i>année</i> et la <i>saison</i> .....	79

4 – Variables sans influence significative sur la production d’embryons.....	80
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>83</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>91</b>
<b>ANNEXE 1 .....</b>	<b>93</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>95</b>
<b>ANNEXE 3 .....</b>	<b>97</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**E17-β** : œstradiol 17-beta

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone

**GnRH** : Gonadotropin Releasing Hormone

**IA** : Insémination Artificielle

**IGF1** : Insulin-like Growth Factor 1

**IM** : Intramusculaire

**PGF2 α** : Prostaglandine F2 alpha

**PMSG** : Pregnant Mare Serum Gonadotropin

**LH** : Luteinizing Hormone

**SC** : Sous-cutanée

**UI** : Unité Internationale



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Description des deux protocoles de traitement de superovulation utilisés dans cette étude.....	48
Figure 2 : Répartition des qualifications de la donneuse d'embryons et de sa mère (n = 332) .....	53
Figure 3 : Répartition des qualifications du père de la donneuse d'embryons (n = 332).....	53
Figure 4 : Répartition du nombre de traitements de superovulation par année (n = 927).....	54
Figure 5 : Répartition du nombre de donneuses d'embryons (génisses et vaches) introduites chaque année dans l'échantillon (n = 332).....	55
Figure 6 : Répartition du nombre de traitements de superovulation par mois (n = 927) .....	56
Figure 7 : Répartition de la variable <i>Age</i> (en années) pour le premier traitement de chaque donneuse (n=332) et pour l'échantillon total (n=927) .....	57
Figure 8 : Répartition de la variable <i>Parité</i> pour le premier traitement de chaque donneuse (n = 332) et pour l'échantillon total (n = 927) .....	57
Figure 9 : Répartition de la variable <i>Intervalle vêlage-traitement</i> (en jours) pour le premier traitement de chaque vache (n = 249).....	58
Figure 10 : Répartition des variables <i>Nombre total de structures par collecte</i> et <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> sur l'échantillon total. ....	64
Figure 11 : Répartition des variables <i>Nombre total de structures par collecte</i> et <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> sur l'échantillon des vaches. ....	69
Figure 12 : Evolution de l'activité de collecte d'embryons en France – Résultats nationaux (d'après l'A.E.T.E., 1989-2000).....	95
Figure 13 : Evolution de l'activité de collecte d'embryons de Charolais Embryons (1989-1999).....	95



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Influence de la race sur la production d'embryons (d'après DONALDSON, 1984a).....	17
Tableau 2 : Résultats de 5 années (1993 – 1997) de collectes d'embryons (d'après SERRE, 1999).....	18
Tableau 3 : Influence du niveau de production laitière sur la production d'embryons (d'après MANCIAUX et al, 2000).....	19
Tableau 4 : Effet de l'inoculation du virus BVD sur la production d'embryons chez des génisses superovulées de race Prim'Holstein (J0 = jour de l'IA), d'après KAFI et al (1997).....	20
Tableau 5 : Effets du moment et du nombre des inséminations sur la production d'embryons (d'après SLIMANE et al, 1995).....	22
Tableau 6 : Efficacité comparée de la PMSG et de la FSH (d'après MONNIAUX et al, 1983 ; GOULDING et al, 1991).....	23
Tableau 7 : Effet du rapport FSH/LH sur la production d'embryons (d'après LUCAS-HAHN et NIEMANN, 1991).....	25
Tableau 8 : Effet du site d'injection de la FSH (400 mg Folltropin-V <sup>ND</sup> ) sur la production d'embryons chez des vaches dont la note d'état corporel est égale à 1 ou 2 (d'après BO et al, 1994).....	26
Tableau 9 : Réponse ovarienne à un traitement de superovulation par de la FSH chez des vaches cyclées, pendant un traitement à base de progestagènes (d'après ALBERIO et al, 1994) (* p<0,05).....	27
Tableau 10 : Influence de la présence d'un follicule dominant sur la production d'embryons – (d'après HUHTINEN et al, 1992 ; BUNGARTZ et NIEMANN, 1994).....	31
Tableau 11 : Intérêt de l'étude de la population folliculaire par échographie le jour du début du traitement de superovulation (d'après BUNGARTZ et NIEMANN, 1994).....	32
Tableau 12 : Effet de la ponction du follicule dominant sur la production d'embryons – Résultats de différentes études.....	33
Tableau 13 : Effet de l'association implant de progestagènes-E17-β sur la croissance folliculaire – Présentation du protocole de traitement (a.m. : ante meridiem ; p.m. : post meridiem) (d'après BO et al,1991).....	34
Tableau 14 : Effet de l'intervalle entre l'injection d'œstradiol et le début du traitement de superovulation sur la production d'embryons (*p<0,05) (d'après YAAKUB et al, 1996).....	35
Tableau 15 : Intérêt de l'association progestagènes – E17-β <i>versus</i> progestagènes seuls sur la production d'embryons (*p<0,05) (d'après YAAKUB et al, 1996).....	36
Tableau 16 : Effet du priming sur la production d'embryons – Résultats de différentes études. (bFF : bovine Follicular Fluid ; **p<0.01 ; *p<0.05).....	37

Tableau 17 : Effet d'un traitement par l'hormone de croissance bovine recombinante (rBST) sur le taux d'ovulation et sur la population folliculaire chez des génisses (* $p < 0,001$ ) (d'après GONG et al, 1991).....	38
Tableau 18 : Effet d'un traitement par l'hormone de croissance bovine recombinante ( rBST) sur la production d'embryons (d'après HERRLER et al, 1990 ; RIEGER et al, 1991). .....	38
Tableau 19 : Origine et composition des différentes préparations de FSH utilisées dans cette étude.....	46
Tableau 20 : Traitement de superovulation utilisé d'août 1997 à décembre 1999 – Valeurs des doses dégressives de pFSH et de pLH.....	47
Tableau 21 : Description des variables <i>pointages adultes</i> et <i>index génotypiques</i> pour le premier traitement .....	52
Tableau 22 : Description de la variable <i>donneuse jumelle</i> (n = 332).....	54
Tableau 23 : Effectif de donneuses d'embryons introduites chaque année dans l'échantillon d'étude.....	55
Tableau 24 : Présentation de la variable <i>Mois de collecte</i> mise en classes.....	56
Tableau 25 : Description des variables quantitatives pour le premier traitement <i>Age</i> , <i>Parité</i> , <i>Note de difficulté de vêlage</i> et <i>Intervalle vêlage-traitement</i> .....	56
Tableau 26 : Présentation des variables <i>Parité</i> et <i>Intervalle vêlage– traitement</i> mises en classes pour le premier traitement de chaque donneuse.....	58
Tableau 27 : Description de la variable <i>Rang de traitement intralactation</i> .....	59
Tableau 28 : Présentation de la variable <i>Rang de traitement intralactation</i> mise en classes.....	59
Tableau 29 : Réponse au traitement de superovulation (332 animaux ; 927 traitements) .....	62
Tableau 30 : Résultats des collectes d'embryons.....	63
Tableau 31 : Corrélations entre la variable <i>Age</i> et les autres variables explicatives.....	63
Tableau 32 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon total (n = 927) – Variables explicatives du <i>Nombre total de structures par collecte</i> ( $p < 0,15$ ) .....	65
Tableau 33 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon total (n = 927) – Variables explicatives du <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> ( $p < 0,15$ ) .....	65
Tableau 34 : Modèle multivarié n°1 pour la variable <i>Nombre total de structures par collecte</i> (échantillon total).....	66
Tableau 35 : Modèle multivarié n°2 pour la variable <i>Nombre total de structures collectées</i> (échantillon total).....	67
Tableau 36 : Modèle multivarié n°1 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon total).....	67
Tableau 37 : Modèle multivarié n°2 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon total).....	68

Tableau 38 : Modèle multivarié n°3 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon total).....	68
Tableau 39 : Modèle multivarié n°4 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon total).....	68
Tableau 40 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon des vaches (n = 803) – Variables explicatives du <i>Nombre total de structures par collecte</i> (p<0,15) .....	70
Tableau 41 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon des vaches (n = 803) – Variables explicatives du <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (p<0,15) .....	71
Tableau 42 : Modèle multivarié n°2 pour la variable <i>Nombre total de structures par collecte</i> (échantillon des vaches).....	72
Tableau 43 : Modèle multivarié n°3 pour la variable <i>Nombre total de structures par collecte</i> (échantillon des vaches).....	72
Tableau 44 : Modèle multivarié n°4 pour la variable <i>Nombre total de structures par collecte</i> (échantillon des vaches).....	72
Tableau 45 : Modèle multivarié n°1 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon des vaches).....	73
Tableau 46 : Modèle multivarié n°2 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon des vaches).....	73
Tableau 47 : Modèle multivarié n°3 pour la variable <i>Nombre d'embryons viables par collecte</i> (échantillon des vaches).....	73
Tableau 49 : Comparaison des résultats de Charolais Embryons et de ceux publiés par SERRE (1999) pour la période 1993 – 1997 .....	77
Tableau 48 : Production d'embryons – Résultats Nationaux (1989-2000) et de Charolais Embryons (1989-1999) .....	78



## **INTRODUCTION**

La transplantation embryonnaire est une méthode de reproduction qui consiste, dans un premier temps, à prélever après stimulation hormonale les embryons d'une femelle dite donneuse – c'est la collecte des embryons – pour, dans un second temps, les transplanter dans l'utérus de femelles dites receveuses – c'est le transfert des embryons.

Dans l'espèce bovine, la transplantation embryonnaire est une technique utilisée depuis plus d'un quart de siècle. Elle est aujourd'hui largement diffusée. En 2000, les équipes de transplantation agréées ont réalisé en France 6716 collectes pour récolter en moyenne 9,31 embryons par collecte dont 5,40 embryons transférables. Au total, 34062 embryons ont été transférés et 12347 embryons ont été stockés (GUERIN, 2001).

Cependant, la production des embryons, pour des raisons diverses, reste le facteur limitant du transfert embryonnaire. En effet, les résultats n'ont que très peu évolué depuis plus de 10 ans. La réponse aux traitements de superovulation est très variable (entre 0 et 50 embryons produits par collecte). Le taux d'embryons transférables après collecte dépasse rarement 60 %. Enfin, 10 à 20 % des donneuses ne répondent pas aux traitements de stimulation ovarienne (NIBART, 1991).

De nombreuses études ont décrit les facteurs de variation de la production d'embryons chez les bovins. Mais la plupart du temps, ces études concernent la production d'embryons chez les vaches de race laitière. Les données concernant les vaches allaitantes sont plus rares. L'objectif de cette étude est donc de décrire les facteurs de variation de la production d'embryons dans un échantillon de génisses et de vaches de race exclusivement Charolaise en Bourgogne.

Dans un premier temps, nous rappellerons les principaux facteurs influençant la production d'embryons chez les bovins. Dans un second temps, nous présenterons et analyserons la technique et les résultats d'une équipe de transfert embryonnaire, Charolais Embryons, afin d'identifier les facteurs de variation de la production d'embryons chez les vaches de race Charolaise.



**PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

**FACTEURS DE VARIATION DES RESULTATS DE  
COLLECTE D'EMBRYONS**



## I - INFLUENCE DE LA DONNEUSE D'EMBRYONS

### A – Facteurs génétiques

#### 1 – La race

Dans une étude rétrospective portant sur 1596 collectes, DONALDSON (1984a) a obtenu des écarts considérables entre les races : le nombre total d'embryons collectés varie significativement entre 6,0 et 16,2 selon la race, le nombre d'embryons transférables de 2,8 à 6,6, le pourcentage d'embryons transférables de 35% à 68% et le taux de gestation par collecte de 37% à 75%. Les résultats par race sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Influence de la race sur la production d'embryons (d'après DONALDSON, 1984a)

Race	Nombre de collectes	Nombre d'embryons par collecte		
		Total (m ± $\sigma$ )	Transférables (m ± $\sigma$ )	Transférables (%)
Angus	11	6,9 ± 4,5	4,7 ± 3,7	68
Beefmaster	145	13,0 ± 8,8	6,1 ± 6,0	48
Brangus	248	16,2 ± 14,3	6,6 ± 8,1	43
Charolais	12	10,9 ± 9,8	4,7 ± 4,7	47
Chianina	24	10,6 ± 7,2	6,2 ± 5,1	60
Hereford	31	10,2 ± 7,9	5,0 ± 5,6	46
Limousin	54	9,6 ± 8,8	4,7 ± 5,0	52
Longhorn	120	6,0 ± 6,0	2,8 ± 3,5	47
Salers	110	9,6 ± 8,2	6,0 ± 5,7	64
Santa Gertrudis	140	11,0 ± 10,9	4,2 ± 5,7	43
Simbrah	68	15,8 ± 12,5	6,1 ± 7,7	35
Simmental	535	13,1 ± 9,4	6,6 ± 6,3	51
Zebu	98	9,2 ± 8,1	3,4 ± 4,4	39

A plusieurs reprises, la race Simmental apparaît en tête du classement pour le nombre moyen d'embryons transférables par collecte : 6,6 ± 6,3 pour DONALDSON (1984a), 7,4 pour BREUEL et al (1991). Deux hypothèses sont avancées par BREUEL et al (1991) pour expliquer la supériorité de cette race : le taux de naissances gémellaires (entre 5 et 10 %) y serait plus élevé que dans les autres races à viande (environ 0,4 %) d'où une éventuelle prédisposition de cette race à la polyovulation ; la seconde hypothèse est une plus grande sensibilité de cette race aux gonadotrophines et donc aux traitements de polyovulation.

D'une façon plus générale, il semblerait que les races à viande répondent mieux aux traitements de superovulation que les races laitières : SHARPIN et al (2000), dans une étude portant sur 269 collectes, ont obtenu plus d'embryons transférables chez les vaches à viande par rapport aux vaches laitières (respectivement 6,9 *versus* 5,3 ;  $p < 0,05$ ).

Les résultats concernant la race Charolaise ne sont pas nombreux : seules quatre études y font référence. Les résultats de DONALDSON (1984a) ont déjà été présentés dans le tableau 1. Ceux cités par MONNIAUX et al (1983) (n = 30) et BREUEL et al (1991) (n = 60) sont respectivement 8,6 ± 6,7 et 6,1 pour le nombre total d'embryons par collecte et 4,4 ± 4,3 et 5,1 pour le nombre d'embryons transférables par collecte. Enfin, SERRE (1999) présente



## B – Facteurs physiologiques

### 1 - L'âge et la parité

Les différentes études relatives à l'effet de l'âge de la donneuse sur la production d'embryons mettent en évidence deux tendances d'intérêt majeur. Tout d'abord, la production d'embryons est supérieure chez les vaches par rapport aux génisses (HASLER et al, 1981, 1983 ; DETTERER et al, 1997 ; MENARD et MARTINEZ, 1997). Les vaches produiraient en moyenne 1 à 2,5 embryons transférables de plus que les génisses. Cependant, après avoir atteint un pic pendant la 2<sup>ème</sup> lactation, le nombre d'embryons transférables par collecte diminue de façon significative ( $p < 0,05$ ) lorsque la parité augmente. On observe donc une baisse du nombre d'embryons transférables par collecte à partir de la 3<sup>ème</sup> lactation (GOVIGNON et al, 2000). Dans cette étude, le nombre moyen d'embryons transférables par collecte pour les génisses, les vaches en première lactation, en deuxième lactation et à 3 lactations ou plus était respectivement égal à 4,77, 5,33, 5,62 et 4,00. Pour HASLER et al (1981), le nombre moyen d'embryons transférables par collecte diminue à partir de l'âge de 7 ans (soit à partir de la 5<sup>ème</sup> lactation).

Concernant l'effet de l'âge des génisses à la première collecte, d'après NIBART (1992), GUSTAFSSON et JANSEN ont montré que le pourcentage d'embryons viables est inférieur pour les génisses de moins de 16 mois à celui obtenu chez les génisses de plus de 16 mois (respectivement 39 % *versus* 78 %,  $p < 0,001$ ) ; le pourcentage de femelles collectées après traitement est également inférieur pour les génisses de moins de 16 mois (respectivement 51 % *versus* 84 %,  $p < 0,01$ ) ; les auteurs concluent que plutôt que l'âge lui-même, il semblerait que ce soit l'âge à la puberté en relation avec l'alimentation et le nombre de cycles sexuels avant la superovulation qui soient importants.

### 2 – La lactation et le niveau de production laitière

Les conclusions des différentes études concernant l'effet de la lactation sur la production d'embryons sont contradictoires. Pour DARROW et al (1982), le nombre d'embryons transférables est significativement supérieur chez les vaches en lactation par rapport aux vaches tarées (4,0 *versus* 2,8 ;  $p < 0,01$ ) ; ils observent aussi une diminution progressive du nombre d'embryons transférables avec l'avancement de la lactation. A l'opposé, pour DE RUIGH et al (1995), les vaches en lactation produisent moins d'embryons viables que les vaches tarées ( $p < 0,01$ ).

Concernant le niveau de production laitière, alors que pour HASLER et al (1983) la production journalière et le stade de lactation n'influencent pas la réponse aux traitements de superovulation, MANCIAUX et al (2000) ont montré que le niveau de production laitière influence de façon significative le nombre d'embryons transférables, le nombre d'embryons de qualité 1 et le nombre d'ovocytes non fécondés ( $p < 0,05$  ; tableau 3).

Tableau 3 : Influence du niveau de production laitière sur la production d'embryons (d'après MANCIAUX et al, 2000)

Production laitière (kg)	<7000	7000-9000	9000-11000	>11000	p
Nombre total d'embryons	10,0 ± 0,8	9,5 ± 0,5	10,6 ± 0,6	8,2 ± 0,9	0,06
Nombre d'embryons transférables	5,4 ± 0,8	6,2 ± 0,4	7,5 ± 0,5	4,9 ± 0,7	0,003
Nombre d'embryons de qualité 1	2,9 ± 0,5	3,9 ± 0,4	5,0 ± 0,5	2,9 ± 0,5	0,002
Nombre d'ovocytes non fécondés	2,6 ± 0,6	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,5	0,04

### 3 - L'intervalle vêlage - collecte

Pour HASLER et al (1983), le taux de fécondation est significativement plus élevé 151 à 300 jours après vêlage (71 %) par rapport aux vaches à moins de 150 jours (65 %) ou à plus de 300 jours (66 %). Plus récemment, PEREZ et al (2001) ont montré que des vaches allaitantes traitées avec de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) durant les 20 premiers jours post-partum produisaient en moyenne 19,4 follicules contre seulement 1,1 follicules dans le groupe témoin et donc que les premiers jours du post-partum n'étaient pas incompatibles avec une stimulation ovarienne.

## C – Facteurs sanitaires

### 1 – Infertilité et production d'embryons

HASLER et al (1983), dans une étude portant sur 984 collectes en race Prim'Holstein, ont comparé les résultats de collectes de vaches «en bonne santé » (n = 666) par rapport à des vaches «infertiles » (vaches présentant un kyste ovarien, des adhérences de l'appareil reproducteur, une infection utérine ou des vaches infertiles à chaleurs normales – n = 318). Les donneuses «en bonne santé » ont produit plus d'embryons viables que celles classées comme infertiles (6,4 *versus* 2,4 ; p<0,05), leur taux de fécondation était également plus élevé (66 % *versus* 42 % ; p<0,05) ; 51 % des donneuses infertiles n'ont produit aucun embryon contre seulement 14 % des donneuses en bonne santé (p<0,05). Enfin, au cours des 2 premières années de cette étude, 18,8 % des donneuses dites infertiles n'ont montré aucun signe d'œstrus après traitement et n'ont donc pas été inséminées, contre seulement 5,5 % des donneuses classées en bonne santé.

### 2 – Influence d'une infection par le virus BVD

L'inoculation par voie intranasale, d'une souche non cytopathogène du virus BVD, 9 jours avant l'insémination, à des génisses superovulées de race Prim'Holstein (tableau 4), affecte la maturation folliculaire et le processus de l'ovulation, ce qui a pour conséquence une diminution significative du nombre et de la qualité des embryons produits (KAFI et al, 1997).

Tableau 4: Effet de l'inoculation du virus BVD sur la production d'embryons chez des génisses superovulées de race Prim'Holstein (J0 = jour de l'Insémination Artificielle), d'après KAFI et al (1997)

Résultats par donneuse (lsmeans ± se)	Groupe témoin (n=12)	Groupe BVD (n=13)	p
Nombre de follicules > 9 mm (J0)	6,2 ± 0,8	4,7 ± 0,8	>0,05
Nombre de follicules > 9 mm (J1)	1,1 ± 0,3	3,8 ± 0,7	<0,05
Nombre de corps jaunes (J6)	7,4 ± 1,2	1,7 ± 0,6	<0,05
Nombre total d'embryons	5,8 ± 2,3	0,6 ± 0,3	<0,05
Nombre d'embryons transférables	4,0 ± 0,7	0,2 ± 0,2	<0,05

## II - INFLUENCE DU MALE

### A – Effet direct du taureau

Plusieurs études ont mis en évidence un effet significatif du taureau utilisé sur la qualité des embryons : PONSART et al (2001), GOVIGNON et al (2000), HUPKA et al (2000), MANCIAUX et al (1997) et DE RUIGH et al (1995).

Pour GOVIGNON et al (2000), le nombre moyen d'embryons de qualité 1 par collecte varie entre 1,1 et 3,7 ( $p < 0,05$ ) en fonction du taureau utilisé. Pour HUPKA et al (2000), le taureau utilisé influence significativement la qualité des embryons ( $p < 0,01$ ) mais la fertilité du taureau en ferme ne serait pas corrélée à sa fertilité dans les programmes de transfert embryonnaire. A l'opposé, AURICH et HAHN (1993) font un parallèle entre le taux de non retour en chaleur après insémination pour un taureau donné et le nombre d'embryons transférables obtenus par traitement de superovulation pour ce même taureau.

### B – Effet du protocole d'insémination

Plusieurs protocoles d'insémination ont été comparés pour optimiser la production d'embryons. Ils diffèrent selon :

- ✓ le nombre d'inséminations : 1 insémination *versus* 2 inséminations (LACAZE et al, 1991 ; SLIMANE et al, 1995 ; HUPKA et al, 2000),
- ✓ le moment des inséminations par rapport au début des chaleurs et par rapport au pic de Luteinizing Hormone (LH) (SLIMANE et al, 1995),
- ✓ le nombre de taureaux utilisés : 2 inséminations avec le même taureau *versus* 2 inséminations avec 2 taureaux différents (HUPKA et al, 2000),
- ✓ le type de semence : fraîche *versus* congelée (GOULDING et al, 1994).

SLIMANE et al (1995) ont ainsi montré (tableau 5) que :

- le nombre total d'embryons et le nombre d'embryons viables sont significativement supérieurs dans un protocole avec 2 inséminations par rapport à celui ne prévoyant qu'une seule insémination,
- les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la première insémination est pratiquée plus de 6 heures après le pic de LH.

Les autres études n'ont pas mis en évidence d'effet significatif du protocole d'insémination sur la production d'embryons.

**Tableau 5 : Effets du moment et du nombre des inséminations sur la production d'embryons (d'après SLIMANE et al, 1995)**

Effectif de vaches collectées	Protocole	Nombre d'embryons par collecte ( $m \pm \sigma$ )		
		Total	Viables	Qualité 1 et 2
n=57	1 IA 6 à 9h après le pic de LH (n=25)	12,0±8,3	6,0±6,2	4,8±5,4
	2 IA 12 et 24h après le début des chaleurs (n=27)	12,3±7,9	6,1±4,6	5,1±4,3
	1 IA 18h après le début des chaleurs (n=5)	8,0±2,8	4,8±4,4	4,0±4,5
	Valeur de p	p<0,05	p<0,05	p>0,05
n=30	Intervalle pic de LH-IA inférieur à 6h (n=8)	/	4,5±1,3	3,3±1,1
	Intervalle pic de LH-IA supérieur ou égal à 6h (n=22)	/	7,6±1,0	6,7±0,9
	Valeur de p	/	p=0,07	p=0,02

### III - INFLUENCE DU TRAITEMENT

#### A – Les hormones utilisables

A l'heure actuelle, deux hormones gonadotropes sont utilisables pour les traitements de superovulation : l'une d'origine chorionique, la PMSG également appelée eCG, l'autre d'origine hypophysaire, la FSH.

#### 1 – Choix de l'hormone de superovulation

De nombreuses études comparant l'efficacité de la PMSG à celle de la FSH ont été réalisées dans le passé. Dans un premier temps, les résultats obtenus avec la FSH étaient très encourageants mais pas toujours reproductibles. Cette variabilité dans les résultats peut s'expliquer par la diversité des protocoles de superovulation (dose administrée, rythme des injections) et par une grande variabilité du rapport FSH/LH des préparations commerciales. Le tableau 6 présente les résultats d'études comparant l'activité de la PMSG à celle de la FSH.

**Tableau 6 : Efficacité comparée de la PMSG et de la FSH (d'après MONNIAUX et al, 1983 ; GOULDING et al, 1991) (inj. = injection)**

Auteurs	Effectif de donneuses	Protocole	Nombre d'embryons par collecte (m±σ)		
			Total	Qualité 1 et 2	Qualité 3
MONNIAUX et al (1983)	n=58	PMSG : 1 inj. de 2500 UI n = 28	6,0±6,4	3,3±4,6	
		FSH (Burns-Biotec) : 4x2 inj. dose totale 50mg, n = 30	8,6±6,7	4,4±4,3	
		p	> 0,05	> 0,05	
GOULDING et al (1991)	n=200	PMSG : 1 inj. de 2000 UI n = 95	8,1±0,6	3,0±0,3	1,5±0,2
		pFSH (Folltropin-Vetepharm) : dose totale 24 mg, n = 105	12,3±0,8	4,4±0,4	2,1±0,2
		p	< 0,001	= 0,01	= 0,09

Selon les études, l'utilisation de la FSH permet d'obtenir 1 à 2 embryons viables de plus que la PMSG (1 pour MONNIAUX et al, 1983 ; 1,5 pour NIBART 1991 ; 2 pour GOULDING et al, 1991). Outre un plus grand nombre d'embryons, la FSH présente d'autres avantages par rapport à la PMSG : le pourcentage de vaches sans réponse est plus faible (8% *versus* 21% d'après NIBART, 1991) et le pourcentage de vaches produisant plus de 3 embryons viables est plus élevé (50% *versus* 28%,  $p < 0,05$  selon MONNIAUX et al, 1983). Ainsi, il est aujourd'hui généralement admis que l'efficacité de la FSH en terme de production d'embryons viables est supérieure à celle de la PMSG, même si la variabilité des réponses est toujours aussi importante.

La différence d'efficacité entre les deux gonadotrophines s'expliquerait, d'après SAUMANDE (1995), par un effet sur la qualité des embryons, le nombre d'ovulations étant identique. Pour BOLAND et al (1991), l'utilisation de la PMSG serait associée à un nombre élevé de follicules anovulatoires du fait de sa longue demi-vie.

## 2 – Association PMSG/anti-PMSG

La très longue demi-vie de la PMSG (environ 120 heures) explique sa facilité d'emploi (une seule injection suffit) ; mais elle entraîne aussi des effets défavorables : la croissance folliculaire persiste après le pic de LH entraînant une sécrétion élevée d'œstradiol qui modifie l'environnement utérin et par-là même le développement embryonnaire précoce (BOLAND et al, 1991). L'utilisation d'anticorps anti-PMSG a donc été proposée afin de limiter les effets défavorables de la PMSG.

Cependant, les résultats concernant l'utilisation d'un sérum anti-PMSG, injecté par voie intraveineuse au moment des chaleurs, sont contradictoires. Pour SAUMANDE et al (1984), quand un sérum anti-PMSG est injecté lors des chaleurs à des animaux stimulés par la PMSG, le nombre d'embryons viables obtenu est identique à celui obtenu avec de la FSH du commerce ; ce traitement présenterait deux avantages par rapport à la FSH : un coût moins élevé et une mise en œuvre plus simple (2 injections au lieu de 8). Cependant, ce point de vue n'est pas partagé par tous : aucun effet bénéfique de l'utilisation de l'anti-PMSG n'a été mis en évidence ni par BOLAND et al (1991) ni par GOULDING et al (1996).

Pour ALFURAJI et al (1993), la difficulté réside dans la définition précise du moment optimal pour injecter l'anti-PMSG. C'est ce qu'ils ont montré dans un article faisant la synthèse d'une trentaine d'études portant sur l'utilisation de l'anti-PMSG. Dans cette méta-analyse, la moyenne pondérée pour l'ensemble des études du nombre d'embryons utilisables est de 4,7 avec l'association PMSG/anti-PMSG contre 3,1 avec la PMSG seule. Cependant les résultats sont très variables d'une étude à l'autre et ces différences s'expliqueraient par des protocoles très différents en ce qui concerne le moment de l'injection de l'anti-PMSG. Les meilleurs résultats sont obtenus quand l'injection d'anti-PMSG est pratiquée 5 à 6 heures après le pic préovulatoire de LH. Or ce pic intervient 36 à 72 heures après l'injection de prostaglandines. Il n'est donc pas possible de prendre comme repère l'injection de prostaglandines (ou l'injection de PMSG) pour injecter l'anti-PMSG. Les auteurs concluent que l'association PMSG/anti-PMSG peut être bénéfique en terme de production d'embryons viables mais à condition de déterminer avec précision le moment opportun de l'injection de l'anti-PMSG ; or cela nécessite des prélèvements de sang toutes les 4 heures pour détecter le pic de LH ou d'œstradiol-17 $\beta$ , ce qui est difficilement réalisable en pratique courante.

Enfin, dans une étude plus récente (n = 999), DETTERER et al (1997) ont analysé l'influence de différentes gonadotrophines sur les nombres d'embryons collectés et transférables. On retrouve un écart d'environ 1,5 embryons transférables entre la meilleure préparation de FSH (Folltropin-V ; n = 332) et la PMSG malgré l'utilisation d'anti-PMSG (n = 110).

Ainsi, à l'heure actuelle, l'utilisation de la PMSG combinée à un sérum anti-PMSG semble être délaissée au profit de la FSH, entraînant en France l'arrêt de la commercialisation de la spécialité contenant les anticorps anti-PMSG (Neutra-PMSG<sup>ND</sup>). Cependant, toutes les préparations commerciales de FSH ne sont pas équivalentes.

### **3 – Influence du rapport FSH/LH des préparations commerciales**

De nombreux auteurs rapportent que les variations du rapport FSH/LH des différentes préparations de gonadotrophines sont une cause importante de la grande variabilité de la réponse ovarienne suite à une stimulation. Les préparations de FSH contenant une grande quantité de LH conduisent à une réponse ovarienne faible (sans doute du fait d'un dérèglement dans la maturation ovocytaire et dans l'équilibre endocrinien) ; cependant, il existe un certain seuil de LH en dessous duquel il ne faut pas descendre sous peine de ne pas obtenir d'ovulation : les préparations de FSH hautement purifiées induisent significativement moins d'ovulations que les préparations complémentées en LH. LUCAS-HAHN et NIEMANN (1991) ont alors évalué la réponse à une stimulation chez des vaches laitières avec de la FSH purifiée plus ou moins complémentée en LH et l'ont comparée à celle obtenue avec une préparation commerciale fortement contaminée par la LH. Les résultats montrent que la solution à 40 % de LH produit plus de corps jaunes et d'ovocytes fécondés, mais aussi plus d'embryons dégénérés, que la solution à 20 % de LH et la solution commerciale (tableau 7).

**Tableau 7: Effet du rapport FSH/LH sur la production d'embryons (d'après LUCAS-HAHN et NIEMANN, 1991)**

<b>Résultats par donneuse</b>	<b>FSH purifiée + 40% LH (0,423 UI)</b>	<b>FSH purifiée + 20% LH (0,069 UI)</b>	<b>FSH commerce (80% LH ou 8,5 UI)</b>	<b>p</b>
Nombre moyen de corps jaunes	12,6 ± 1,1	10,1 ± 0,9	9,0 ± 0,9	<0,05
Nombre moyen d'ovocytes fécondés	5,1 ± 1,3	2,6 ± 0,6	2,7 ± 0,5	<0,05
Nombre moyen d'embryons transférables	3,4 ± 0,6	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,5	>0,05

D'autre part, selon NIBART (1991), le rapport optimal FSH/LH est spécifique de chaque race. Pour la race Charolaise, la meilleure réponse est obtenue avec un rapport FSH/LH compris entre 0,5 et 1, alors que pour la race Prim'Holstein, le rapport optimal est compris entre 3 et 6.

## **B – Le protocole**

### **1 – Rythme d'injection**

Du fait de la courte demi-vie de la FSH, les protocoles classiques de superovulation nécessitent de nombreuses injections. Actuellement, il semblerait que les meilleurs résultats soient obtenus lorsque la FSH est injectée 2 fois par jour pendant 4 jours avec des doses décroissantes. Cependant, de nombreuses études ont pour but de tester l'efficacité de protocoles plus simples limitant le nombre d'injections et par la même le stress occasionné lors de la manipulation des animaux, ainsi que le travail des éleveurs.

□ 2 injections par voie Intramusculaire (IM), pendant 4 jours, fractionnement en doses égales ou décroissantes

DUFOUR et al (1990) n'ont pas observé de différence significative dans le nombre d'ovulations selon le fractionnement des doses en parties égales (9,4 ovulations ; n=6) ou inégales et décroissantes (8,6 ovulations ; n=18) sur 8 injections.

□ 2 injections par voie IM et par jour pendant 4 jours versus 1 seule injection par voie Sous-Cutanée (SC) de la même dose totale

Pour MAPLETOFT et al (1992), l'efficacité des deux protocoles est la même : dans une étude portant sur 48 génisses de race à viande, aucune différence significative dans le nombre d'embryons viables n'a été observée entre les deux protocoles.

Cependant, l'efficacité du protocole à une seule injection par voie SC est fonction de l'état d'engraissement des donneuses et du site d'injection (BO et al, 1994) : pour des vaches maigres (note d'état corporel égale à 1 ou 2), une seule injection par voie SC dans le cou est moins efficace qu'une seule injection par voie SC en arrière de l'épaule ou que 2 injections par voie IM et par jour pendant 4 jours. Pour des donneuses en bon état corporel (note d'état égale à 3 ou 4), l'efficacité des deux protocoles est comparable, quel que soit le site d'injection (dans le cou ou en arrière de l'épaule).

- 2 injections par jour pendant 4 ou 5 jours versus 1 injection par jour pendant 3 jours

LOONEY et al (1981) n'ont pas observé de différence significative en ce qui concerne le nombre d'ovocytes fécondés entre 2 injections par jour pendant 5 jours (3,1 ovocytes fécondés ; n=12) et 1 injection par jour pendant 3 jours (3,3 ovocytes fécondés ; n=12) ; pour ces deux traitements, la dose totale était la même : 50 mg de FSH porcine (Burns Biotec) Pour DONALDSON (1990), 75 unités de FSH (SUPEROV<sup>ND</sup>) en une injection par jour pendant 3 jours (n = 58) ou en 2 injections par jour pendant 4 jours à doses égales (n = 373) produisent le même nombre moyen d'embryons transférables (respectivement  $5,3 \pm 5,3$  versus  $5,5 \pm 5,5$ ).

Différents solvants de dilution de la FSH ont été testés afin de limiter le nombre d'injections. Le polyvinylpyrrolidone est un solvant adéquat pour prolonger l'absorption de la FSH administrée en une seule injection. Huit injections par voie IM d'une dose totale standard de FSH porcine diluée dans une solution de NaCl 0,9 % donnent autant d'embryons et d'embryons viables qu'une seule injection par voie IM ou SC de la même dose totale diluée dans une solution à 30% de polyvinylpyrrolidone (SATO et al, 1996 ; YAMAMOTO et al, 1994). DOVGOPOL et al (1995) ont testé l'efficacité d'un autre diluant, la « prolongone » à base d'oxyde de silicone. Trois préparations commerciales différentes de FSH ont été diluées dans 5 à 7 ml de prolongone puis injectées par voie SC en une seule fois entre le 8<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour du cycle. Le nombre total d'embryons collectés est respectivement  $7,0 \pm 1,4$ ,  $6,0 \pm 1,5$  et  $7,8 \pm 1,5$  pour chacune des trois préparations (n=20, n=26 et n=11). Les auteurs concluent qu'une seule injection de FSH diluée dans la « prolongone » par voie SC provoque une bonne réponse ovarienne. Cependant ces résultats n'ont pas été comparés à un lot témoin.

## 2 – Site d'injection

La réponse ovulatoire et le pourcentage de vaches présentant un œstrus ont été significativement plus élevés ( $p < 0,05$ ) chez les vaches Holstein ayant reçu une dose de 400 mg de FSH porcine (Folltropine<sup>ND</sup>) diluée dans 20 ml de solution saline en une seule injection par voie SC derrière l'épaule (n = 17) par rapport à celles ayant reçu la même dose par voie SC dans la région du cou (n = 17) (HOCKLEY et al, 1992). Cependant, cette étude ne tient pas compte de l'état d'engraissement des vaches : en effet, nous avons vu précédemment que lorsque les vaches sont maigres, une injection de 400 mg de FSH porcine (Folltropine<sup>ND</sup>) par voie SC dans le cou est moins efficace que la même dose injectée par voie SC en arrière de l'épaule (BO et al, 1994 – tableau 8).

**Tableau 8 : Effet du site d'injection de la FSH (400 mg Folltropin-V<sup>ND</sup>) sur la production d'embryons chez des vaches dont la note d'état corporel est égale à 1 ou 2 (d'après BO et al, 1994).**

Résultats par donneuse	1 injection par voie SC dans le cou n = 8	1 injection par voie SC derrière l'épaule n = 7	p
Vaches en chaleurs	3/8	7/7	<0,05
Nombre de corps jaunes	$2,0 \pm 0,8$	$13,0 \pm 0,9$	<0,05
Nombre total d'embryons	$1,1 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,9$	<0,05
Nombre d'embryons transférables	$0,7 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,8$	>0,05

### 3 – Cycle naturel ou maîtrisé

Pour des raisons pratiques, les traitements de stimulation ovarienne sont parfois associés à un traitement de synchronisation des chaleurs à base de progestagènes, sous forme d'implants ou de spirales.

#### □ Cas des donneuses cyclées

L'intérêt de la combinaison d'un implant ou d'une spirale vaginale de progestagènes à un traitement de superovulation (par de la FSH ou de la PMSG) est la possibilité d'initier le traitement à n'importe quel moment du cycle ovarien et donc de s'affranchir d'une surveillance des chaleurs (ALMEIDA, 1987). Cependant, bien que cette combinaison présente un aspect pratique, elle ne permet pas toujours d'obtenir une production maximale d'embryons (ALBERIO et al, 1994). Ces derniers ont comparé la combinaison spirale de progestagènes – FSH à la FSH seule (groupe témoin) en faisant varier le jour de pose de la spirale : groupe I : j0 (chaleur de référence) à j6 ; groupe II : j7 à j13 ; groupe III : j14 à j20 (tableau 9). Globalement, le nombre total d'embryons collectés après un traitement associant une spirale de progestagènes à de la FSH est significativement inférieur à celui obtenu avec de la FSH seule ; aucun effet significatif n'est observé sur le nombre d'embryons transférables. Mais les résultats varient aussi en fonction de la période du cycle à laquelle est posée la spirale : les moins bons résultats sont obtenus pour le groupe III, c'est à dire lorsque le traitement à base de progestagènes débute dans le dernier tiers du cycle œstral (dans ce groupe, 50 % des donneuses n'ont pas superovulé).

**Tableau 9 : Réponse ovarienne à un traitement de superovulation par de la FSH chez des vaches cyclées, pendant un traitement à base de progestagènes (d'après ALBERIO et al, 1994) (\* p<0,05)**

Groupe	Résultats par donneuse (m±σ)		
	Nombre de corps jaunes	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons transférables
I (j0 à j6)	6,1 ± 2,9	5,0 ± 3,7	4,2 ± 3,2
II (j7 à j13)	6,7 ± 4,1	5,4 ± 5,1	4,2 ± 4,6
III (j14 à j20)	3,6 ± 2,9	2,5 ± 3,6	2,1 ± 3,5
Total I+II+III	5,5 ± 3,6	4,0 ± 3,6 *	3,5 ± 3,8
Témoin	8,5 ± 5,1	9,5 ± 6,2 *	6,0 ± 4,9

#### □ Cas des femelles en anœstrus

Pour DUFFY et al (1994), la combinaison progestagènes (spirale PRID<sup>ND</sup>) – FSH peut être utilisée avec succès chez des donneuses non vues en chaleurs avant le traitement de superovulation. Chez ces femelles (n = 23), le nombre d'embryons collectés, le nombre d'embryons de qualité 1 ou 2 et le nombre d'embryons de qualité 3 sont comparables à ceux obtenus sur un lot de femelles (n = 55) vues en chaleurs avant l'initiation du traitement de superovulation avec la FSH seule (respectivement 9,9 , 2,7 et 2,1 *versus* 11,0 , 2,9 et 1,9). De même, CABODEVILA et al (1994) n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les résultats obtenus avec des femelles en anœstrus post-partum superovulées avec la combinaison spirale vaginale de progestagènes – FSH (n = 11) et avec ceux obtenus chez des femelles cyclées superovulées avec la FSH seule (n = 11).

Ainsi, l'association d'un traitement de stimulation ovarienne à un traitement par des progestagènes (spirale ou implant) présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre même en l'absence d'informations sur les cycles des animaux traités et, surtout, de diminuer la

fréquence des non-réponses. On améliore donc la production totale d'embryons en diminuant la fréquence des animaux qui ne produisent aucun bon embryon (SAUMANDE, 1995).

#### **4 – Influence de la répétition des traitements**

En général, la répétition des traitements se traduit par une diminution de la production d'embryons. L'augmentation du rang de collecte a pour effet une baisse significative ( $p < 0,05$ ) du nombre d'embryons transférables (DE RUIGH et al, 1995 ; GOVIGNON et al, 2000 ; PONSART et al, 2001). HUPKA et al (2000) constatent une augmentation significative du nombre d'ovocytes non fécondés ( $p = 0,0035$ ) et du nombre d'embryons dégénérés ( $p = 0,004$ ). Par contre, pour GOVIGNON et al (2000), la répétition des collectes n'a pas d'effet sur le nombre d'embryons dégénérés et l'augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés n'est significative ( $p < 0,05$ ) qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> collecte.

L'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer la diminution de la réponse ovarienne associée à la répétition des traitements est celle d'une auto-immunisation contre les hormones de stimulation ovarienne, PMSG et FSH (DONALDSON et PERRY, 1983 ; NIBART, 1991). A l'heure actuelle, il n'y a pas de données disponibles concernant l'existence d'anticorps anti-FSH. Par contre, l'existence d'anticorps anti-PMSG, chez les bovins, a récemment été confirmée par DRION et al (2001). Ces derniers ont administré, une fois par semaine pendant 5 à 10 semaines, 1000 à 2000 UI de PMSG à deux groupes de 4 vaches. Ils ont alors mesuré le taux de liaison de la PMSG aux protéines plasmatiques. Globalement, la répétition des traitements par la PMSG entraîne, chez ces animaux, une augmentation significative du taux d'anticorps anti-PMSG (révélée par une élévation du taux de liaison de la PMSG aux protéines plasmatiques), à partir de la 6<sup>ème</sup> injection dans le premier groupe et à partir de la 3<sup>ème</sup> injection dans le second groupe. De plus, la production d'anticorps est variable d'une vache à l'autre et chez certaines de ces vaches, la réaction immunologique n'est pas significative. On peut donc supposer l'existence de différentes populations de vaches en fonction de leur sensibilité immunologique à la PMSG. L'existence de ces différentes populations a d'ailleurs été démontrée chez la chèvre par ROY et al (1999).

#### **5 – Influence du jour du cycle auquel débute le traitement**

Le jour du cycle œstral auquel débute le traitement de superovulation est responsable de grandes variations dans les résultats de collecte d'embryons. LINDSELL et al (1986) ont obtenu de meilleurs résultats pour le nombre d'embryons collectés et une tendance pour le nombre d'embryons transférables en commençant le traitement à j9 ( $n = 10$ ) par rapport à j3 ( $n = 11$ ), j6 ( $n = 11$ ) et j12 ( $n = 10$ ). De façon similaire, GOULDING et al (1990) observent une réponse ovarienne significativement plus faible quand le traitement est commencé le deuxième jour du cycle par rapport au dixième jour du cycle. Cependant, DONALDSON (1984b) et HASLER et al (1983) qui ont étudié de façon plus précise la seconde moitié du cycle (j8 à j13) n'ont pas réussi à mettre en évidence des différences significatives de production entre ces différents jours (j8, j9, j10, j11, j12 et j13). Ces résultats sont donc contradictoires ; cette approche ne permet pas de déterminer avec précision le moment idéal pour débiter le traitement.

Le suivi endoscopique puis échographique des ovaires pendant les traitements de superovulation et une meilleure connaissance des phénomènes de croissance et de dominance folliculaire ont modifié l'approche globale des phénomènes de superovulation. Ce n'est pas le jour du début du traitement pendant le cycle qui influence les résultats mais la population folliculaire et notamment la présence ou l'absence de gros follicules au moment de l'initiation du traitement de superovulation (SAUMANDE, 1995).

## C – Dernières avancées et recherches en cours

### 1 – Notion de vagues de croissance folliculaire et régulation du nombre de follicules ovulatoires

#### □ Les vagues de croissance folliculaire

De nombreuses études échographiques confirment la théorie des vagues selon laquelle le développement folliculaire évolue sous la forme de croissances et de régressions successives de plusieurs follicules. Chaque vague consiste en l'émergence, tous les sept à neuf jours environ, de plusieurs follicules de diamètre supérieur ou égal à 5 mm parmi lesquels apparaît le follicule dominant. Chez la vache, un cycle ne comporte habituellement que deux ou trois vagues (avec des extrêmes de un à quatre), le follicule ovulatoire étant issu de la dernière vague de la phase lutéale, commençant peu avant la lutéolyse. Chaque vague comporte un follicule dominant : si trois vagues sont observées, elles débutent en général aux 2<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jours du cycle ; si deux vagues sont observées, elles apparaissent aux 2<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jours du cycle (GINTHER et al, 1989).

#### □ Les trois étapes du tri folliculaire : recrutement, sélection et dominance

Seuls les follicules qui atteignent une certaine taille (2 mm) en temps opportun poursuivent leur développement. C'est parmi ceux-ci que le (ou les) follicule(s) ovulatoire(s) est (ou sont) désigné(s). Trois étapes successives sont responsables de ce tri folliculaire.

- Le recrutement : c'est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonadodépendants (diamètre : 2 mm). Il s'agit d'un mécanisme aléatoire, provoqué par l'augmentation transitoire de la FSH, où seuls sont recrutés les follicules atteignant « la bonne taille au bon moment » (ROCHE et BOLAND, 1991).
- La sélection : c'est l'émergence du (ou des) follicule(s) ovulatoire(s) parmi les follicules recrutés. Cette sélection est secondaire à la réduction de la FSH qui a initié le recrutement. En effet, le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'œstradiol, mais également d'inhibine. Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur la production hypophysaire de FSH qui diminue donc. Dès que la concentration de FSH devient inférieure à celle induisant le recrutement, les follicules recrutés entrent en atrophie, à l'exception du (ou des) follicule(s) sélectionné(s). En effet, chez le follicule dominant, des facteurs locaux (Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1), œstradiol, activine) rendraient plus sensibles les cellules folliculaires à la présence de FSH, annulant par ce mécanisme d'autostimulation interne les conséquences néfastes de la chute du taux de FSH.
- La dominance : elle est morphologique – car exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire – et fonctionnelle – car le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression de follicules en croissance ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (KO et al, 1991), et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (GONG et al, 1993). Elle correspond donc au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide du volume du (ou des) follicule(s) dominant(s). Bien que la FSH diminue, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne : l'œstradiol qu'il produit amplifie sa synthèse d'IGF1 qui est normalement sous le contrôle de la FSH. L'IGF1 stimule à son tour l'aromatation des androgènes en œstrogènes. De plus, l'acquisition par la granulosa de récepteurs à la LH, contribue à

maintenir une concentration élevée en AMPc dans les cellules folliculaires, et donc à la croissance du (ou des) follicule(s) dominant(s) (WEBB et al, 1992).

La croissance des follicules antraux jusqu'à la phase de sélection du follicule dominant est donc sous la dépendance du taux élevé de FSH. A l'issue de la sélection la croissance du follicule dominant n'est plus uniquement sous la dépendance du taux de FSH circulant mais persiste par l'intermédiaire du mécanisme d'auto-stimulation interne ; les autres follicules, dont la croissance reste dépendante du taux élevé de FSH, régressent.

Le principe du traitement de superovulation par la FSH est donc de court-circuiter les phénomènes de sélection et de dominance et d'amener jusqu'à l'ovulation les follicules qui, privés de FSH et de LH, auraient subi le phénomène d'atrésie.

Il est démontré que la destruction d'un follicule dominant au début d'une vague de croissance folliculaire retarde la régression des follicules de taille directement inférieure ; en fin de vague, sa destruction entraîne un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante (KO et al, 1991).

Ainsi que nous allons le présenter, la présence d'un follicule dominant au moment de la mise en place du traitement de superovulation est néfaste pour la réponse au traitement. Diverses stratégies ont été proposées pour s'affranchir du follicule dominant en début de traitement.

## **2 – Comment éviter les effets délétères du follicule dominant ?**

### **a – Par un suivi échographique quotidien pour commencer le traitement en l'absence d'un follicule dominant**

Plusieurs études ont mis en évidence les effets néfastes de la présence d'un follicule dominant au moment de l'initiation du traitement de superovulation (GRASSO et al, 1989a/b ; GUILBAULT et al, 1991 ; HUHTINEN et al, 1992 ; BUNGARTZ et NIEMANN, 1994). La comparaison des réponses chez les animaux pour lesquels le traitement de superovulation a commencé en présence ou en absence d'un follicule dominant montre que dans ce dernier cas le nombre moyen d'ovulations est fortement augmenté (tableau 10). GRASSO et al (1989a) ont comparé les résultats de superovulation de deux groupes de génisses. Les groupes étaient constitués, après examen échographique, selon la présence ou l'absence d'un follicule dominant au moment du début du traitement ; tout follicule, le jour du début du traitement, de plus de 9 mm de diamètre et en phase de croissance ou ayant un diamètre constant de plus de 9 mm depuis moins de 4 jours était considéré comme dominant. Au moment du début du traitement, les nombres de follicules dont le diamètre était supérieur ou égal à 2 mm étaient identiques dans les deux groupes. Les résultats montrent que la présence d'un follicule dominant retarde l'apparition ou réduit le nombre de follicules de diamètre supérieur ou égal à 7 mm pendant le traitement de superovulation. De plus, le nombre d'ovulations est fortement réduit : le nombre de corps jaunes estimés par échographie est significativement inférieur dans le groupe avec follicule dominant par rapport au groupe sans follicule dominant ( $7,1 \pm 1,8$  versus  $13,5 \pm 1,7$  ;  $p < 0,05$ ).

**Tableau 10 : Influence de la présence d'un follicule dominant sur la production d'embryons – (d'après HUHTINEN et al, 1992 ; BUNGARTZ et NIEMANN, 1994)**

(FD = follicule dominant ; ND = absence de follicule dominant)

Auteurs	Echographie	Définition du FD	Groupe	Nombre total d'embryons par collecte	Nombre d'embryons viables par collecte
HUHTINEN et al (1992)	Quotidienne	>8mm et en croissance ou >8mm et stable depuis moins de 3 jours	FD n=13	4,1 ± 1,6	2,2 ± 1,4
			ND n=22	10,3 ± 1,3	6,6 ± 1,1
			p	<0,01	<0,05
HUHTINEN et al (1992)	Quotidienne	>9mm et en croissance ou >9mm et stable depuis moins de 4 jours	FD n=16	6,0 ± 1,6	2,4 ± 1,2
			ND n=19	9,6 ± 1,4	7,1 ± 1,1
			p	>0,05	<0,01
BUNGARTZ et NIEMANN (1994)	Quotidienne	>9mm et en croissance ou >9mm et stable depuis moins de 4 jours	FD n=9	2,8 ± 1,0	2,1 ± 0,9
			ND n=17	8,2 ± 1,2	5,0 ± 1,0
			p	<0,01	<0,05

Les deux études présentées dans le tableau 10 définissent le follicule dominant non seulement par une taille minimale, mais aussi par une notion de croissance. En effet, la taille n'est pas un critère suffisant pour identifier un follicule dominant ; il faut aussi que ce follicule soit en croissance (SAUMANDE, 1995). Ce dernier critère implique l'observation quotidienne des ovaires pendant au moins les trois jours qui précèdent le traitement, contrainte qui limite l'utilisation d'un tel contrôle en pratique courante. Le suivi échographique pendant au moins 3 jours avant le début du traitement pour s'assurer de l'absence de follicule dominant au moment du début du traitement semble donner des résultats satisfaisants (HUHTINEN et al, 1992 ; BUNGARTZ et NIEMANN, 1994 ; tableau 10). Cependant, ce suivi est lourd à mettre en place. Certains auteurs ont donc essayé de pratiquer une seule échographie le jour du début de la stimulation. L'objectif n'est plus alors de rechercher la présence d'un follicule dominant mais d'étudier la population folliculaire qui serait le reflet de l'activité du follicule dominant.

#### **b – Par l'étude de la population folliculaire le jour du début du traitement**

Selon BUNGARTZ et NIEMANN (1994), la présence ou l'absence d'un follicule dominant peut être détectée par un nombre limité d'échographies : en effet, le nombre de follicules de 3 à 8 mm de diamètre serait un critère satisfaisant pour juger de l'activité ou non d'un follicule dominant à un instant t. Ainsi, les auteurs ont échographié les donneuses uniquement le jour du début du traitement ; ils ont considéré que les donneuses ayant moins de 10 follicules de 3 à 8 mm de diamètre ont un follicule dominant en activité alors que les donneuses ayant plus de 10 follicules de 3 à 8 mm de diamètre ne sont pas sous l'influence d'un follicule dominant. Les résultats de la stimulation ovarienne sont significativement supérieurs dans le groupe considéré comme ne présentant pas de follicule dominant par rapport au groupe en présentant un (tableau 11).

**Tableau 11 : Intérêt de l'étude de la population folliculaire par échographie le jour du début du traitement de superovulation (d'après BUNGARTZ et NIEMANN, 1994).**

(FD = follicule dominant ; ND = absence de follicule dominant)

Critère échographique	Groupe	Résultats par collecte		
		Nombre de corps jaunes	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons transférables
< 10 follicules de 3 à 8 mm	FD (n = 12)	4,5 ± 1,4	1,2 ± 0,4	0,3 ± 0,2
≥ 10 follicules de 3 à 8 mm	ND (n = 14)	15,5 ± 2,5	12,9 ± 2,8	7,8 ± 2,5
	p	< 0,01	< 0,01	< 0,01

### **c – Par l'élimination du follicule dominant**

D'autres méthodes ayant pour but de détruire, avant l'administration du traitement gonadotrope, un éventuel follicule dominant sont en cours d'évaluation ; ces méthodes sont soit mécaniques, soit hormonales.

#### **□ Méthodes physiques**

Il s'agit de ponctionner le follicule dominant par aspiration transvaginale échoguidée. Les résultats (tableau 12) des différentes études testant l'efficacité de la ponction du follicule dominant sont plutôt encourageants. Cette ponction du follicule dominant est la plupart du temps bénéfique en terme de nombre total d'embryons collectés et d'embryons viables sauf pour SHAW et GOOD (2000) pour lesquels l'augmentation du nombre total d'embryons collectés suite à l'ablation du follicule dominant ne s'expliquerait que par l'augmentation du nombre d'embryons non transférables.

Tableau 12 : Effet de la ponction du follicule dominant sur la production d'embryons – Résultats de différentes études.

Auteurs	Effectif	Choix du ou des follicules à ponctionner	Groupe	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons viables	Nombre d'embryons de qualité 1
BUNGARTZ et NIEMANN (1994)		Le plus gros follicule 48h avant la 1 <sup>ère</sup> FSH	Ponction (n = 13)	18,7 ± 2,7	10,1 ± 1,5	/
			Témoin (n = 11)	5,1 ± 1,4	1,0 ± 0,5	/
			p	< 0,01	< 0,01	/
HILL et KUEHNER (1996)			Ponction (n=112)	14,8 ± 0,7	8,9 ± 0,6	/
			Témoin (n=112)	11,1 ± 0,7	6,0 ± 0,6	/
			p	<0,001	<0,001	/
JAKOB et al (1996)	18 vaches (2 collectes par vache)	Follicules ≥ 8 mm ; 40h avant 1 <sup>ère</sup> FSH		5,9 embryons de plus après ponction	3,1 embryons de plus après ponction	/
BERGFELT et al (1997)	38 génisses	Follicules > 5 mm ; 24h avant la 1 <sup>ère</sup> FSH	Ponction (n = 20)	7,8 ± 1,3	3,8 ± 0,8	/
			Témoin (n = 18)	8,9 ± 1,5	3,9 ± 0,8	/
			p	> 0,05	> 0,05	/
DE RUIGH et MULLAART (1999)	119 génisses de 12 à 16 mois	Le ou les 2 plus gros follicules 68 à 72h avant 1 <sup>ère</sup> FSH	Ponction (n=55)	/	4,98 ± 4,46	/
			Témoin (n=64)	/	4,26 ± 3,47	/
			p	/	0,16	/
EDE et al (1999)	346 génisses et 292 vaches	Le plus gros follicule 48h avant 1 <sup>ère</sup> FSH	Ponction (n=82)	12,3 ± 1,0	6,5 ± 0,2	3,2 ± 0,5
			Témoin (n=556)	10,0 ± 0,3	5,8 ± 0,6	2,5 ± 0,2
			p	0,08	>0,10	0,06
SHAW et GOOD (2000)	1385 collectes d'embryons	Follicule > 8 mm 48h avant 1 <sup>ère</sup> FSH	Ponction (n=1214)	12,1 ± 0,3	5,7 ± 0,2	3,6 ± 0,1
			Témoin (n=171)	10,5 ± 0,8	5,2 ± 0,5	3,3 ± 0,4
			p	0,06	0,49	0,36
SHAW et GOOD (2000)	87 vaches (2 collectes par vache)	Follicule > 8 mm 48h avant 1 <sup>ère</sup> FSH	Ponction (n=87)	12,8 ± 1,0	5,0 ± 0,4	3,0 ± 0,3
			Témoin (n=87)	9,7 ± 0,7	5,3 ± 0,4	2,9 ± 0,3
			p	0,01	0,56	0,55

□ Méthode hormonale (élimination du follicule dominant et synchronisation de la vague folliculaire)

Nous avons déjà vu (grâce au suivi échographique) que les résultats de superovulation sont améliorés lorsque le traitement de superovulation est initié au début d'une vague folliculaire, avant la sélection du follicule dominant (et donc avant qu'il n'exerce un effet répresseur sur le développement des autres follicules). Dans cette optique, BO et al (1995) ont cherché, par un traitement hormonal, à éliminer le follicule dominant et par-là même à provoquer l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire avant l'initiation du traitement de superovulation.

□ Un traitement associant implant de progestagènes et œstradiol 17-β (E17-β) provoque l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire

Dans un premier temps, BO et al (1991) ont évalué l'effet de l'association implant de progestagènes – E17-β sur la croissance folliculaire. Par un suivi échographique, ils ont comparé l'évolution de la population folliculaire dans les différents groupes présentés dans le tableau 13.

**Tableau 13 : Effet de l'association implant de progestagènes-E17-β sur la croissance folliculaire – Présentation du protocole de traitement (a.m. : ante meridiem ; p.m. : post meridiem) (d'après BO et al,1991).**

Jour du cycle	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
	Témoin n = 15	Implant n = 14	implant+ E17-β (j2) n = 14	Implant + E17-β (j9) n = 14
0	Chaleurs de référence			
2	/	implant	implant + E17-β	implant
9	Stimulation FSH + E17-β			
11 a.m.	500 µg cloprostenol			
11 p.m.	/	Retrait implant		
13 a.m.	Chaleurs de polyovulation			
13 p.m.	IA			
14 a.m.	IA			
20	Collecte d'embryons			

Le suivi échographique a montré que le diamètre du plus gros follicule dans le groupe 3 est significativement plus faible que celui observé dans les autres groupes entre le 5<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour. Le jour du début du traitement de superovulation, le diamètre le plus faible est également observé dans le groupe 3. L'injection d'œstradiol au 2<sup>ème</sup> jour du cycle associée à la pose d'un implant de progestagènes provoquerait donc la régression du follicule dominant et l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire. Cet effet n'est pas observé avec la pose d'un implant seul ou quand l'injection d'œstradiol est réalisée 7 jours après la pose de l'implant.

Concernant les résultats de collecte, ils n'ont pas été améliorés dans cette étude par le pré-traitement implant de progestagènes + E17-β. Selon les auteurs, cela peut s'expliquer par un intervalle trop long entre l'injection d'œstradiol et le début du traitement de superovulation (7 jours dans le groupe 3) ; de ce fait, dans ce groupe, le traitement de superovulation a sans doute débuté alors qu'un nouveau follicule dominant était déjà actif, même si morphologiquement il n'a pas été décelé.

Les études qui ont suivi avaient pour but de déterminer l'intervalle entre l'injection d'œstradiol et le début d'une nouvelle vague de croissance folliculaire (ce qui correspondrait au délai optimal entre l'injection d'œstradiol et le début du traitement de superovulation).

□ Délai entre l'injection d'E17-β et le début d'une nouvelle vague de croissance folliculaire

Les résultats combinés de deux études réalisées par BO et al (BO et al, 1994 ; 1995), montrent que l'émergence de la nouvelle vague se produit 3 à 5 jours après l'injection d'œstradiol chez 94 % (44/47) des animaux ayant reçu un implant de progestagènes ; l'intervalle moyen entre l'injection d'œstradiol et l'émergence de la nouvelle vague est de  $4,3 \pm 0,1$  jours. Dans ces deux études, les implants ont été posés à différents moments du cycle (j2, j5, j8) et l'injection d'œstradiol a été réalisée 24 heures après la pose de l'implant (soit à j3, j6, j9). Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes (j2, j5, j8) pour l'intervalle injection d'œstradiol – émergence de la nouvelle vague folliculaire.

Ainsi, l'association progestagènes - E17-β permet de prévoir le moment de l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire et donc de débiter le traitement de superovulation à un moment optimal, à savoir avant la sélection du follicule dominant et donc à un moment où la population folliculaire est homogène et où le nombre de follicules susceptibles de répondre au traitement de superovulation est élevé.

□ Intérêt de la combinaison implant de progestagènes – E17-β avant un traitement de superovulation

YAAKUB et al (1996) ont comparé les résultats de collecte d'embryons en fonction de l'intervalle entre l'injection d'œstradiol et le début du traitement de superovulation chez des animaux préalablement traités par un implant de progestagènes (tableau 14).

**Tableau 14 : Effet de l'intervalle entre l'injection d'œstradiol et le début du traitement de superovulation sur la production d'embryons (\*p<0,05) (d'après YAAKUB et al, 1996).**

Intervalle E17-β - 1 <sup>ère</sup> FSH	n	Résultats par collecte		
		Nombre de corps jaunes	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons transférables
3 jours	23	$12,8 \pm 1,7$ *	$6,1 \pm 0,9$	$3,2 \pm 0,7$
4,5 jours	24	$18,2 \pm 1,7$ *	$8,2 \pm 1,0$	$4,1 \pm 0,8$
6 jours	23	$14,4 \pm 2,0$	$6,9 \pm 1,4$	$2,7 \pm 0,9$ *
Progestagènes seuls	21	$15,0 \pm 1,8$	$7,9 \pm 1,1$	$4,5 \pm 0,7$ *

L'intervalle entre l'injection d'œstradiol et le début du traitement de superovulation semble donc influencer la production d'embryons ; les meilleurs résultats sont obtenus avec un intervalle de 4,5 jours, ce qui peut être rapproché des conclusions de BO et al (1995), à savoir que le délai moyen d'apparition d'une nouvelle vague folliculaire après une injection d'œstradiol est de 4,3 jours.

Cependant, même après détermination du moment optimal d'administration de l'œstradiol, les résultats obtenus avec les animaux traités avec l'association progestagènes – œstradiol ne sont pas meilleurs que ceux obtenus avec les progestagènes seuls (tableaux 14 et 15). Malgré son intérêt théorique, l'ajout d'œstradiol dans les protocoles de superovulation ne paraît donc pas intéressant.

**Tableau 15 : Intérêt de l'association progestagènes – E17- $\beta$  versus progestagènes seuls sur la production d'embryons (\*p<0,05) (d'après YAAKUB et al, 1996).**

Groupe	Résultats par collecte		
	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons transférables	% d'embryons transférables
Progestagènes seuls n = 19	12,4 $\pm$ 3,5	4,4 $\pm$ 1,6	35 *
Progestagènes + E17- $\beta$ (1 jour après) n = 19	13,2 $\pm$ 2,1	6,6 $\pm$ 1,8	50 *

### **3 – Augmenter le nombre de follicules susceptibles de répondre au traitement de stimulation ovarienne**

#### **a – Par le « priming »**

Le priming est un pré-traitement hormonal dont l'objectif est d'augmenter le nombre de follicules recrutables au début du traitement de superovulation. Il consiste en l'injection d'une ou plusieurs faibles doses de FSH au début du cycle œstral (j2, j3, j4).

Le tableau 16 montre que l'efficacité du priming est très variable d'une étude à l'autre. RAJAMAHENDRAN et al (1987) et TOUATI et al (1991) ont observé une amélioration des résultats avec le priming ; remarquons que dans ces deux études, les protocoles utilisés sont les mêmes (2,5 mg de FSH injectés à j3 et j4). Inversement, d'autres auteurs n'ont mis en évidence aucun effet bénéfique du priming (RIEGER et al, 1988 ; LUSSIER et CARRUTHERS, 1989 ; GRASSO et al, 1989b).

Tableau 16 : Effet du priming sur la production d'embryons – Résultats de différentes études. (bFF : bovine Follicular Fluid ; \*\*p<0.01 ; \*p<0.05)

Auteurs	Groupe	n	Résultats par collecte		
			Nombre de corps jaunes	Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons transférables
RAJAMAHENDRAN et al (1987)	Témoin	26	7,3 ± 0,9	5,5 ± 1,5	3,8 ± 0,8
	Priming FSH 2,5 mg à j3 et j4	21	12,9 ± 2,2**	14,2 ± 3,7**	5,4 ± 2,1
RIEGER et al (1988)	Priming NaCl 2 ml NaCl à j2	16	/	13,3 ± 8,4	5,3 ± 5,8
	Priming FSH 10 mg à j2	19	/	13,8 ± 7,4	7,3 ± 4,5
	Témoin	76	/	12,1 ± 8,6	5,3 ± 5,4
LUSSIER et CARRUTHERS (1989)	Priming NaCl 7 ml NaCl/j 6j	9	12,0 ± 1,8	/	/
	Priming FSH 0,5 mg/j 6j	8	7,4 ± 1,3	/	/
	Priming bFF 7 ml/j 6j	9	4,2 ± 0,8**	/	/
GRASSO et al (1989b)	Priming NaCl 2 ml NaCl à j3	9	10,7 ± 0,9	/	/
	Priming FSH 10 mg à j3	9	6,2 ± 1,5**	/	/
TOUATI et al (1991)	Priming NaCl NaCl à j3 et j4	72	/	8,7 ± 5,0	5,1 ± 3,5
	Priming FSH 2,5 mg à j3 et j4	75	/	11,8 ± 7,2**	7,5 ± 5,1*

### b – Par une stimulation de la sécrétion d'IGF-1

Le facteur de croissance IGF-1 est un puissant stimulant de la croissance folliculaire : il stimule la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa, la production d'œstrogènes et de progestérone ainsi que le nombre de récepteurs à la LH ; dans la plupart des cas, il amplifie l'action des gonadotrophines. Il est sécrété majoritairement par le foie sous l'action de l'hormone de croissance (MONGET, 1993).

GONG et al (1991) ont donc observé les effets d'une injection quotidienne de 25 mg de rBST (recombinant bovine somatotropine ou hormone de croissance bovine recombinante) à des génisses, pendant 42 jours (tableau 17) : le taux plasmatique d'IGF-1 double dans les deux jours suivant la première injection de rBST et reste élevé pendant toute la période du traitement. Cette élévation du taux d'IGF-I a été suivie, à partir du troisième jour après le début du traitement, d'une très nette augmentation du nombre de follicules de 2 à 5 mm de diamètre (la corrélation entre les deux variables est forte :  $r = 0,732$  ;  $p < 0,01$ ). Cependant, cette augmentation du nombre de follicules de 2 à 5 mm n'a pas pour autant modifié le nombre d'ovulations, sans doute à cause de l'action inhibitrice exercée par le follicule dominant sur les follicules de plus de 5 mm de diamètre.

**Tableau 17 : Effet d'un traitement par l'hormone de croissance bovine recombinante (rBST) sur le taux d'ovulation et sur la population folliculaire chez des génisses (\* p<0,001) (d'après GONG et al, 1991)**

Groupe	Taux d'ovulation	Nombre de follicules (m ± σ)			
		total	> 10 mm	5 à 10 mm	2 à 5 mm
Témoin (n = 6)	1,0 ± 0,0	33,2 ± 3,2 *	0,8 ± 0,2	6,5 ± 1,0	25,8 ± 2,7 *
rBST (n = 6)	1,0 ± 0,0	60,2 ± 6,7 *	0,8 ± 0,2	6,8 ± 1,4	52,5 ± 6,5 *

Ainsi, un prétraitement à la rBST pourrait augmenter le nombre de follicules susceptibles de répondre à un traitement de superovulation. Cependant, lorsque ce protocole a été testé dans le cadre de collectes d'embryons, la rBST n'a apporté aucune amélioration des résultats (HERRLER et al, 1990 ; RIEGER et al, 1991 ; tableau 18).

**Tableau 18 : Effet d'un traitement par l'hormone de croissance bovine recombinante ( rBST) sur la production d'embryons (d'après HERRLER et al, 1990 ; RIEGER et al, 1991).**

Auteurs	Protocole	Groupe	Résultats par collecte	
			Nombre total d'embryons	Nombre d'embryons transférables
HERRLER et al (1990)	640 mg rBST 5 jours avant 2500 UI de PMSG	rBST n = 15	6,5 ± 1,5	3,8 ± 1,1
		témoin n = 15	4,5 ± 1,4	1,9 ± 0,7
		p	> 0,05	> 0,05
RIEGER et al (1991)	20 mg de rBST à chaque injection de FSH	rBST n = 19	8,3 ± 5,3	5,3 ± 4,0
		témoin n = 18	7,2 ± 6,6	5,2 ± 4,5
		p	> 0,05	> 0,05

#### IV - INFLUENCE DE L'ALIMENTATION

L'étude des relations entre nutrition et production d'ovocytes et d'embryons est un problème complexe. Afin de comparer les différentes études, il faut tenir compte des niveaux d'apports testés dans chaque expérimentation, mais aussi de la durée d'application des différents régimes testés (à court terme ou à long terme). De plus, les comparaisons entre les expériences sont rendues difficiles du fait de l'hétérogénéité dans l'expression des différents niveaux d'apports alimentaires testés. Ainsi, FRERET et al (2000), dans leur analyse bibliographique, ont rassemblé les informations concernant les effets de la variation du niveau d'apport énergétique sur la production et la qualité des ovocytes et des embryons. Les points importants mis en évidence par FRERET et al (2000) (et références citées) sont les suivants :

- Effets de l'alimentation sur le taux moyen de progestérone plasmatique préovulatoire

Globalement, les résultats obtenus dans les différentes études chez les femelles suralimentées (le plus souvent une diminution de la progestérone avant l'ovulation) et sous-alimentées (le plus souvent une augmentation de la progestérone avant l'ovulation) sont cohérents. L'hypothèse avancée pour expliquer cette baisse de la concentration plasmatique de progestérone en cas de suralimentation serait une augmentation de son métabolisme au niveau du foie, la suralimentation entraînant une augmentation du flux sanguin hépatique. Un

faible niveau de progestérone préovulatoire, provoqué par l'augmentation des apports alimentaires avant l'ovulation, pourrait influencer indirectement la survie embryonnaire *via* des effets sur l'ovocyte en développement.

□ Effets de l'alimentation sur la production et la qualité des embryons

Les effets de la suralimentation à court terme avant la collecte sont globalement défavorables à la qualité des embryons produits. Les résultats sont relativement cohérents entre les différentes études et ont été reliés à la diminution de la progestérone plasmatique préovulatoire.

Quant aux effets de la suralimentation à long terme avant la collecte, les résultats sont là aussi cohérents : les différentes études montrent un effet défavorable d'un fort excès d'apports alimentaires sur la production d'embryons, notamment en terme de qualité.

Enfin, une forte restriction alimentaire à court terme avant la collecte a un effet globalement défavorable, avec un retard de développement et une diminution du taux de survie embryonnaire.

□ Etat corporel et production d'ovocytes et d'embryons

Globalement, la qualité des ovocytes et des embryons produits est supérieure pour les vaches en bon état corporel par rapport aux vaches maigres (les vaches des différentes études ne présentaient pas de notes extrêmes).

## V - INFLUENCE D'AUTRES FACTEURS D'ENVIRONNEMENT

### A – Les conditions atmosphériques et le climat

L'influence des conditions atmosphériques sur la réponse aux traitements de superovulation a été étudiée par FREYTAG et al (1995). Des relevés de température ambiante, de pression atmosphérique et d'humidité relative ont été effectués le jour du début du traitement, de l'insémination et de la collecte. L'analyse statistique a mis en évidence une influence significative de la température le jour du début du traitement sur le nombre d'embryons collectés ; un effet significatif de la pression atmosphérique sur le nombre d'embryons collectés a été mis en évidence mais seulement à partir des relevés du jour du début du traitement et du jour de l'insémination. Enfin, aucune influence de l'humidité relative n'a été mise en évidence. Les auteurs concluent que les conditions atmosphériques influencent sans doute la réponse au traitement de superovulation mais que la population d'étude est trop faible (n = 455 collectes) pour dégager de véritables tendances.

Une autre étude a évalué la capacité d'adaptation des donneuses d'embryons à un climat différent de celui de leur pays de naissance. BENYEI (1997) a testé la capacité de génisses Prim'Holstein nées en Hongrie (climat continental) de s'adapter au climat chaud de l'état de Pernambuco au Brésil (38 à 43°C pendant la saison chaude, 30 à 35°C en saison modérée, 25°C minimum pendant la nuit). Les femelles étaient logées en stabulation libre couverte et étaient micro-arrosées pendant 10 minutes quand la température dépassait 38°C. Les génisses arrivées gestantes de 3 mois ont été superovulées régulièrement par FSH à partir de 6 mois après le vêlage. Les résultats montrent que pendant la première année de présence, les donneuses n'ont pas répondu de façon satisfaisante aux traitements de superovulation ; passée cette période, la production d'embryons a augmenté pour atteindre une moyenne d'embryons congelables supérieure à 5. Une période d'environ un an serait donc nécessaire pour que les donneuses s'adaptent à leur nouvel environnement climatique.

De plus, les profils hormonaux, observés après superovulation, apparaissent différents chez des vaches en climat subtropical de ceux décrits dans les conditions européennes ; en particulier, le pic de LH apparaît retardé de 24 heures par rapport à l'injection de prostaglandines et ceci peut conduire à utiliser un schéma d'inséminations systématiques différent (HUMBLLOT et al, 1994).

### **B – L'exploitation**

Deux études rétrospectives portant chacune sur près de 2000 collectes d'embryons ont montré que l'exploitation explique une part importante des variations du nombre total d'embryons et du nombre d'embryons transférables par collecte: 20,3 % des variations du nombre total d'embryons par collecte et 15,4 % des variations du pourcentage d'embryons transférables par collecte (HARVENGT et al, 1998; HUPKA et al, 2000).

### **C – Le mois, la saison et l'année de collecte**

Les résultats des différentes études sont contradictoires. Pour HARVENGT et al (1998), le mois et l'année sont des facteurs qui influencent de façon significative le nombre total d'embryons collectés et le nombre d'embryons transférables, l'influence du mois étant particulièrement marquée pour le nombre total d'embryons. A l'opposé, HUPKA et al (2000) n'ont pas mis en évidence d'effet significatif de l'année et de la saison sur ces deux paramètres ; seul le nombre d'ovocytes non fécondés est significativement influencé par l'année.

### **D – L'opérateur**

HARVENGT et al (1998) ont également constaté que l'effet opérateur explique en partie les variations des nombres d'embryons totaux et transférables. Cependant, ils constatent une part plus importante de l'effet opérateur dans le pourcentage d'embryons transférables (3,2 %) que dans le nombre total d'embryons (0.9 %) ; ceci est probablement explicable par le fait que la détermination de la qualité des embryons varie vraisemblablement entre les opérateurs.

Malgré les recherches en cours sur les mécanismes de régulation de la folliculogénèse, les résultats de superovulation ne progressent pas de façon significative et la grande variabilité des réponses à la superovulation reste la même. Cependant, les recherches concernant les traitements de superovulation peuvent laisser espérer une simplification des protocoles de traitement de superovulation par la FSH.

Les facteurs de variation du rendement des collectes d'embryons sont particulièrement nombreux. Les résultats varient en fonction du choix de la donneuse, du taureau d'insémination et du protocole d'insémination, du traitement de superovulation, du système de production ( et en particulier de l'alimentation) et de la région. Pourtant, quelques grandes idées peuvent être dégagées, notamment concernant les critères de choix de la donneuse d'embryons. Le profil de la "bonne" donneuse tel que l'on peut l'établir à partir de cette analyse est le suivant : une vache, plutôt qu'une génisse, si possible en première ou en deuxième lactation, et au maximum âgée de sept à neuf ans. La vache doit être cyclée, avec des cycles réguliers (il est nécessaire d'observer au minimum deux cycles avant de débiter le traitement et de respecter un délai post-partum d'au moins 60 jours). Outre les critères sanitaires réglementaires, elle doit être indemne de toute pathologie en particulier de pathologie de la reproduction (d'où l'importance d'un examen du tractus génital avant d'entreprendre le traitement de superovulation). Son environnement ne doit pas occasionner de stress et doit être le plus sain possible, en particulier à l'abri d'un passage de virus BVD

(d'où l'importance du respect des règles de quarantaine lors de l'éventuelle introduction d'un animal dans le cheptel). Enfin, la donneuse doit être en bon état général et ne doit pas être ni suralimentée, ni sousalimentée.

Les données disponibles sont le plus souvent obtenues chez des vaches laitières (en grande majorité de race Prim'Holstein) par des équipes des centres d'insémination artificielle pour la sélection génétique. Très peu d'études concernent les races à viande (MONNIAUX et al, 1983; DONALDSON, 1984a ; BREUEL et al, 1991 ; YAAKUB et al, 1996 ; HARVENGT et al, 1998 ; SHARPIN et al, 2000), et parmi elles, seulement une concerne spécifiquement la race Charolaise (SERRE, 1999). L'originalité de notre étude des facteurs de variation de la production d'embryons, tel que nous allons le voir dans la deuxième partie, est donc la race, Charolaise, l'opérateur, vétérinaire praticien et donc le choix des animaux introduits dans l'échantillon d'étude.



**DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**  
**RETROSPECTIVE**

**ETUDE DES FACTEURS DE VARIATION DE LA**  
**PRODUCTION D'EMBRYONS EN RACE**  
**CHAROLAISE EN CLIENTELE**



L'objectif de ce travail était d'identifier les facteurs de variation de la production d'embryons obtenus par superovulation en race Charolaise. Il s'agit d'une étude rétrospective, effectuée à partir des résultats de 11 années de collectes d'embryons réalisées par l'équipe agréée de transplantation embryonnaire de Charolais Embryons.

## **I – MATERIEL ET METHODES**

### **A – Présentation de Charolais Embryons**

Charolais Embryons est une association loi 1901, basée à la ferme du Marault (58 470 Magny-Cours) dans le département de la Nièvre. Elle a été créée en 1984, sur l'initiative d'un éleveur-sélectionneur de ce même département. Cette association a pour objectifs de promouvoir et de développer la transplantation embryonnaire en race Charolaise et de favoriser la commercialisation des embryons tant en France qu'à l'étranger.

La ferme du Marault, Agropole Charolais, est un Groupement d'Intérêts Economiques (GIE) qui met à la disposition de Charolais Embryons toutes les installations nécessaires à son activité de transplantation embryonnaire (une stabulation, une salle de collecte, un laboratoire, une salle de stockage pour les embryons congelés).

Jusqu'en 1997, les prestations de collectes et de transferts d'embryons étaient assurés par un seul vétérinaire praticien du département de la Nièvre. Depuis, une antenne a été créée dans le département de la Saône et Loire par un second vétérinaire praticien qui réalise les prestations de Charolais Embryons dans ce département.

### **B – Population d'étude**

Cette étude regroupe les résultats de 927 traitements de superovulation réalisés entre janvier 1989 et décembre 1999 sur un échantillon de 332 donneuses d'embryons (83 génisses et 249 vaches), toutes de race Charolaise. La totalité des collectes a été réalisée par une seule et même équipe : Charolais Embryons, et par un seul et même opérateur, vétérinaire praticien du département de la Nièvre (les résultats des collectes réalisées depuis 1997 par le second vétérinaire praticien n'ont pas été intégrés dans cette étude). La quasi-totalité de l'activité est concentrée sur la région Bourgogne. Environ 70 % des animaux traités appartiennent à des élevages de la Nièvre (58) ; le reste de l'activité se répartit dans les autres départements de la région (la Côte d'Or, la Saône-et-Loire et l'Yonne) et dans les départements limitrophes (l'Allier, le Cher)

Tout animal, susceptible d'être inclus dans l'échantillon d'étude, ne l'a été qu'à l'issue d'une première visite au cours de laquelle était réalisé un examen général et un examen minutieux de l'appareil génital, afin de s'assurer que la vache était cyclée et qu'elle ne présentait pas d'anomalie au niveau de son appareil génital. Certains animaux, présentant un retard d'involution utérine, ou en anœstrus (anœstrus vrai, kyste ovarien) ou encore présentant une métrite ou une vaginite, ont pu, après traitement, être introduits dans la population d'étude.

Les critères d'inclusion des animaux dans l'échantillon d'étude étaient donc les suivants :

- critères sanitaires réglementaires : appartenir à un cheptel officiellement indemne de tuberculose, officiellement indemne ou indemne de brucellose et de leucose,
- critères sanitaires individuels : être indemne, à l'issue de la visite préliminaire, de toute pathologie, en particulier de l'appareil génital,
- critères génétiques : l'animal doit avoir un niveau génétique supérieur à la moyenne du troupeau, lequel niveau est évalué à partir des données annuelles du Herd Book Charolais présentes sur la Fiche Carrière de l'animal (pointages, index, et qualification). Toutes les donneuses d'embryons de notre échantillon sont inscrites au Herd Book Charolais.

Certains animaux, introduits dans le lot traité, ont été exclus avant la collecte : le critère d'exclusion était une petite taille des ovaires (à la palpation transrectale et / ou à l'échographie) le jour de la collecte, signant une absence de réponse au traitement de superovulation. Ces animaux n'ont pas été collectés.

## C – Protocole d'étude

### 1 – Les traitements de superovulation

#### a – Nature de la préparation de FSH et doses administrées

Sur la période étudiée, différentes préparations de FSH ont été utilisées (tableau 19). Elles diffèrent par leur origine et par le rapport pFSH/pLH.

Tableau 19 : Origine et composition des différentes préparations de FSH utilisées dans cette étude.

Période	Produit utilisé	Provenance	Composition
Janvier 1989 à Janvier 1996	FSH-P RIGAUX <sup>ND</sup>	Schering-Plough, Levallois-Perret, France	pFSH : 0,70 mg pLH : 1,26 mg 0,2 < pFSH/pLH < 0,5
Février 1996 à Décembre 1996	SUPER-OV <sup>ND</sup>	Ausa, Tyler, Texas, USA	pFSH : non communiqué pLH : 0,01 mg / dose de pFSH
Janvier 1997 à Juillet 1997	Prémélange Pr BECKERS	Liège, Belgique	non communiqué
Août 1997 à Décembre 1999	STIMUFOL <sup>ND</sup>	Mérial, Lyon, France	pFSH : 0,5 mg pLH : 0,1 mg pFSH/pLH = 5
	+ pLH Pr BECKERS	Liège, Belgique	pLH : 0,2 mg

Mis à part la spécialité SUPER-OV<sup>ND</sup> (Ausa, Tyler, USA), qui était administrée 2 fois par jour pendant 3 jours à doses constantes (12,5 UI à chaque injection), les autres préparations ont été injectées 2 fois par jour pendant 4 jours avec des doses dégressives. Les valeurs de ces doses dégressives pour la période allant du mois d'août 1997 au mois de décembre 1999 sont présentées dans le tableau 20. Pour cette période, 200 µg de pLH (Pr BECKERS, Liège, Belgique) sont ajoutés au STIMUFOL<sup>ND</sup> (Merial, Lyon, France) afin de diminuer le rapport pFSH/pLH de la préparation finale utilisée pour le traitement de superovulation et l'adapter à la race Charolaise (NIBART, 1991).

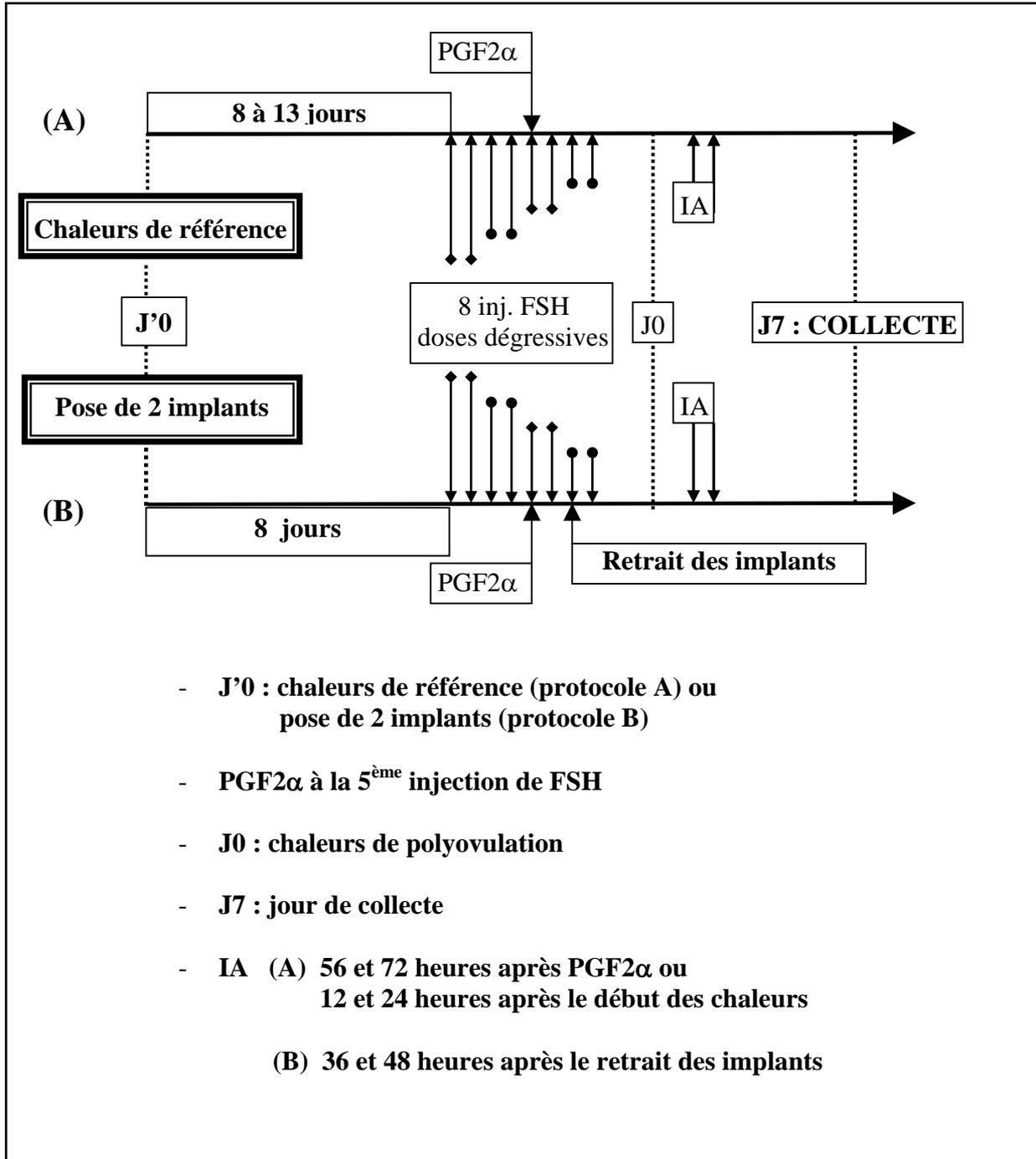
**Tableau 20 : Traitement de superovulation utilisé d'août 1997 à décembre 1999 – Valeurs des doses dégressives de pFSH et de pLH**

Produits utilisés	Dose totale administrée		Protocole		
			Jour	Dose (en µg) injectée matin et soir par voie IM	
				pFSH	pLH
STIMUFOL <sup>ND</sup> (pFSH/pLH = 5) + pLH Pr BECKERS (200 µg)	Vache	500 µg pFSH 300 µg pLH pFSH/pLH = 1,66	J1	94	56
			J2	78	47
			J3	47	28
			J4	31	19
	Génisse	320 µg pFSH 264 µg pLH pFSH/pLH = 1,21	J1	60	50
			J2	50	41
			J3	30	25
			J4	20	16

### **b – Présentation des différents protocoles utilisés**

En règle générale, le traitement de superovulation a débuté pendant un cycle naturel, après observation d'une chaleur de référence. Dans ce cas, la donneuse devait avoir présenté un cycle normal avant la mise en place du traitement (figure 1A). Dans certains cas, soit pour des raisons pratiques, soit pour collecter des donneuses préalablement en anœstrus, le traitement a été instauré au cours d'un cycle maîtrisé par les progestagènes (figure 1B). Le traitement de superovulation a donc débuté 8 à 13 jours après la détection de chaleurs de référence ou 8 jours après la pose simultanée de 2 implants CRESTAR<sup>ND</sup> (Intervet, Angers, France) laissés en place 11 jours. Une injection de prostaglandines F2 alpha (PGF2α), DINOLYTIC<sup>ND</sup> (Pharmacia & Upjohn, St Quentin, France) ou ESTRUMATE<sup>ND</sup> (Schering-Plough, Levallois-Perret, France), a été réalisée en même temps que la 5<sup>ème</sup> injection du produit choisi pour la superovulation.

Figure 1 : Description des deux protocoles de traitement de superovulation utilisés dans cette étude.



Dans tous les cas, deux inséminations artificielles en sperme congelé ont été réalisées. Les inséminations ont été réalisées de façon systématique 56 et 72 heures après l'injection de PGF2 $\alpha$  ou 12 et 24 heures après le début des chaleurs dans le cas d'un traitement après chaleurs de référence, 36 et 48 heures après le retrait de l'implant lors de cycle maîtrisé.

## **2 – La collecte des embryons**

La grande majorité des collectes est réalisée à la ferme du Marault où sont regroupées toutes les installations indispensables à leur bon déroulement. Les autres collectes sont réalisées dans l'élevage propriétaire de la donneuse.

La collecte des embryons est réalisée par voie cervicale au 7<sup>ème</sup> jour du cycle suivant les chaleurs de polyovulation. Le matériel utilisé est le suivant :

- ✓ un dilatateur de col,
- ✓ une sonde de récolte (sonde à 3 voies, I.M.V., L'Aigle, France) avec chemise sanitaire,
- ✓ deux récipients en verre contenant le milieu de collecte avant et après la récolte,
- ✓ une enceinte thermostatée à 20-25°C contenant les deux récipients.

Tout le matériel non jetable est d'abord lavé avec un détergent non toxique, rincé dans de l'eau distillée, séché et enveloppé pour la stérilisation.

Le milieu de collecte et de conservation des embryons est un milieu tamponné au phosphate de sodium (milieu PBS (Phosphate Buffered Saline) ; pH = 7,2 ; pression osmotique = 290 milli-Osmoles ; I.M.V., L'Aigle, France).

La donneuse d'embryons est systématiquement placée dans une cage de contention surélevée dans sa partie antérieure et reçoit une injection épidurale basse d'un anesthésique local (6 à 10 ml de LUROCAINE<sup>ND</sup> ; Vétoquinol, Lure, France). Le rectum est vidé de son contenu et la région vulvaire est soigneusement lavée, désinfectée et essuyée.

La collecte consiste en un rinçage des cornes utérines avec le milieu de collecte. Une fois le col passé, l'extrémité de la sonde est placée dans la corne correspondant à l'ovaire qui a le mieux répondu au traitement (détermination par palpation transrectale avant la collecte), à la jonction entre le premier et le deuxième tiers de la corne. Le ballonnet situé à l'extrémité de la sonde rigide est alors gonflé : il permet de fixer la sonde dans la corne et évite le reflux du liquide de collecte. La sonde souple est progressivement dépliée jusqu'au fond de la corne et le rinçage commence. Après avoir injecté, en plusieurs fois, 350 à 400 ml de PBS préalablement placé dans l'enceinte thermostatée, la sonde souple est progressivement retirée, le ballonnet est dégonflé et la même opération est réalisée dans l'autre corne (NIBART, 1991).

## **3 – Recherche et appréciation de la viabilité des embryons**

La recherche et l'examen des embryons dans le liquide de collecte sont faits avec du matériel stérile dans des conditions de température constantes, au laboratoire de la ferme du Marault. Après filtration du liquide de collecte, le filtrat est examiné à la loupe binoculaire (grossissement x10 pour une première recherche rapide). Les embryons sont alors pipetés et déposés dans un milieu de conservation (milieu F1 ; I.M.V., L'Aigle, France).

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons sont exclusivement morphologiques (intégrité de la zone pellucide, taille et homogénéité de la masse cellulaire, formation du blastocœle et du bouton embryonnaire) et suivent les recommandations faites par l'IETS (International Embryo Transfer society) (ROBERTSON et NELSON, 1998).

## **D – Données recueillies**

### **1 – Par l’intermédiaire de Charolais Embryons**

Les informations archivées par Charolais Embryons ont constitué le point de départ dans l’élaboration du fichier informatique support de cette étude. A l’issue de chaque collecte, un registre est soigneusement tenu à jour ; les informations relevées dans ce registre et qui seront exploitées dans cette étude sont :

- ✓ le nom de l’élevage propriétaire de la donneuse,
- ✓ l’identification de la donneuse,
- ✓ la date de la collecte,
- ✓ le nombre de structures par collecte,
- ✓ le nombre d’embryons viables par collecte.

### **2 – Par l’intermédiaire du Herd Book Charolais**

L’objectif de cette étude étant d’analyser les facteurs de variation des résultats de collecte d’embryons, de plus amples informations étaient nécessaires, en particulier des paramètres individuels concernant les donneuses d’embryons. Ces données nous ont été fournies par le Herd Book Charolais à partir de la liste de numéros nationaux des donneuses provenant de Charolais Embryons. Les informations recueillies sont en grande partie celles figurant sur la Fiche Carrière de chaque vache. Toutes n’ont pas été utilisées ; celles que nous avons retenues sont :

#### **□ Concernant l’animal**

- ✓ le nom de l’élevage naisseur,
- ✓ le nom de l’élevage propriétaire,
- ✓ la date de naissance,
- ✓ les jumelles à la naissance (si cette naissance était gémellaire),
- ✓ les dates de vêlages,
- ✓ les notes de 1 à 5 de facilité de vêlage (1 : sans aide ; 2 : aide facile ; 3 : avec vèleuse ; 4 : extraction forcée ; 5 : césarienne – DUCROT, 1992),
- ✓ les pointages adultes (développement musculaire, développement squelettique, qualités fonctionnelles, état),
- ✓ les index génotypiques (facilité de naissance, croissance, développement musculaire, développement squelettique, sevrage, allaitement, valeur maternelle au sevrage)
- ✓ la qualification.

#### **□ concernant son ascendance**

- ✓ la qualification du père,
- ✓ la qualification de la mère.

A l'intérieur de chaque race, les valeurs génétiques des vaches pour l'aptitude au vêlage, la valeur laitière et la conformation au sevrage sont estimées à partir des performances de leurs veaux. Après prise en compte du plus grand nombre d'effets du milieu, des *index* sont calculés pour quatre critères : le poids de naissance (composante de *l'index facilité de naissance*), le poids à 120 jours (composante de *l'index allaitement*), les *développements musculaires et squelettiques au sevrage*. Ces *index* sont exprimés en unité de caractère (kg pour les poids, points pour les pointages) par rapport à la moyenne de la race. Ils sont publiés chaque année sur une fiche individuelle, la Fiche Carrière, qui rapporte également le détail de la production de chaque année en valeurs brutes et corrigées ainsi que les informations synthétiques disponibles sur les ascendants.

La *qualification des vaches* (annexe 1) s'appuie sur un *pointage adulte* réalisé sous l'autorité du Herd Book Charolais lorsque les vaches ont sevré au moins un veau. Les valeurs de *développements squelettique* (DS) et *musculaire* (DM) obtenues, après correction pour l'état d'engraissement, permettent de classer les vaches dans les *types Elevage (E)*, *Viande (V)* ou *Souche (S)*. Les performances de reproduction (vêlages faciles et réguliers) sont appréciées de façon implicite par l'intervalle vêlage-vêlage et à travers la longévité. La valeur de productivité est, elle, appréciée au travers des *index*. Les vaches qualifiées *Reproductrices Reconnues* (niveau 1 et 2) et surtout *Reproductrices Recommandées* (niveau 3 et 4) sont les meilleures de la race. Elles représentent environ 15000 animaux de la base de sélection. Les différents critères permettant d'attribuer la qualification aux femelles sont présentés dans l'annexe 1.

Les performances des veaux jusqu'au sevrage permettent d'apprécier de façon fiable son potentiel de croissance et sa conformation bouchère. Ces informations sont disponibles en valeur brute (poids et pointage) mais surtout en valeur corrigée (exprimée en pourcentage des contemporains) pour les poids. Elles sont utilisées pour accorder *la qualification aux jeunes mâles*.

## E – Présentation des variables

Ci-dessous sont présentées toutes les variables qualitatives et quantitatives qui seront utilisées dans l'étude statistique. Certaines données ont été utilisées « brutes », d'autres ont été combinées ou mises en classes afin de créer de nouvelles variables exploitables dans l'analyse.

### 1 – Variables « individuelles »

- Pointages adultes et index génotypiques de la donneuse (tableau 21)

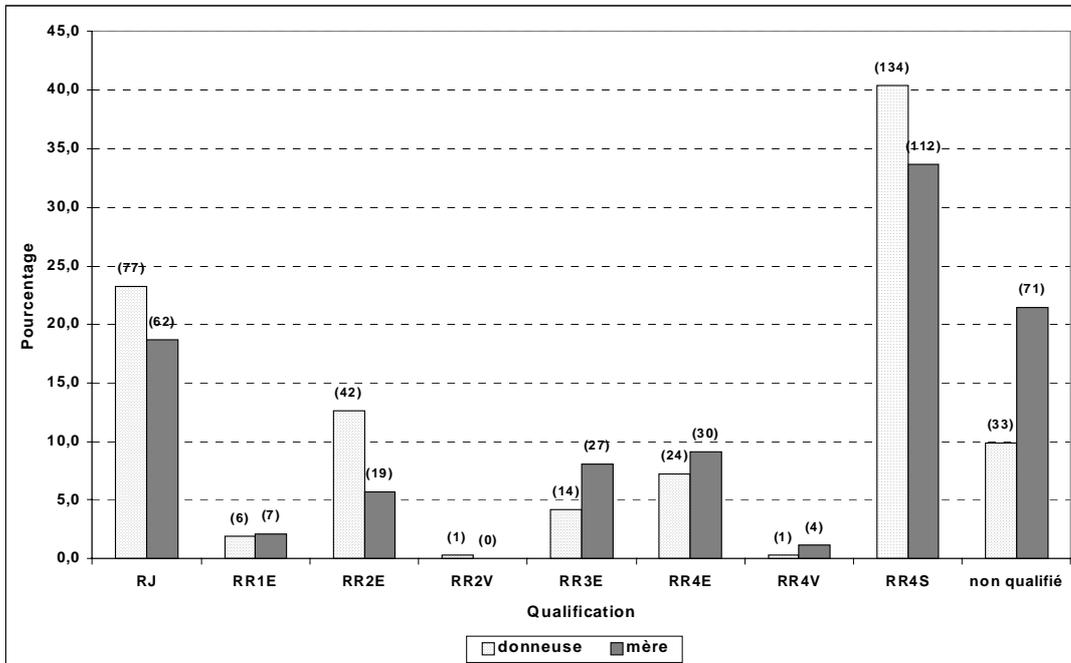
**Tableau 21 : Description des variables *pointages adultes* et *index génotypiques* pour le premier traitement**

Variable		Effectif	$m \pm \sigma$	min.	max.
Pointages Adultes	Développement musculaire	284	$70,2 \pm 8,7$	45	93
	Développement squelettique	284	$79,9 \pm 6,8$	58	97
	Qualités fonctionnelles	284	$76,7 \pm 6,3$	58	93
	Etat	284	$5,8 \pm 1,2$	3	9
Index Génotypiques	Développement musculaire	186	$99,4 \pm 6,2$	81	118
	Développement squelettique	186	$103,9 \pm 8,4$	83	128
	Croissance	185	$99,9 \pm 8,1$	84	122
	Synthèse Sevrage	144	$101,1 \pm 6,1$	89	120
	Allaitement	185	$102,6 \pm 5,3$	89	120
	Facilité de naissance	188	$95,8 \pm 8,9$	69	121
	Valeur maternelle au sevrage	144	$101,7 \pm 7,1$	87	119

□ Qualification de la donneuse et de son ascendance

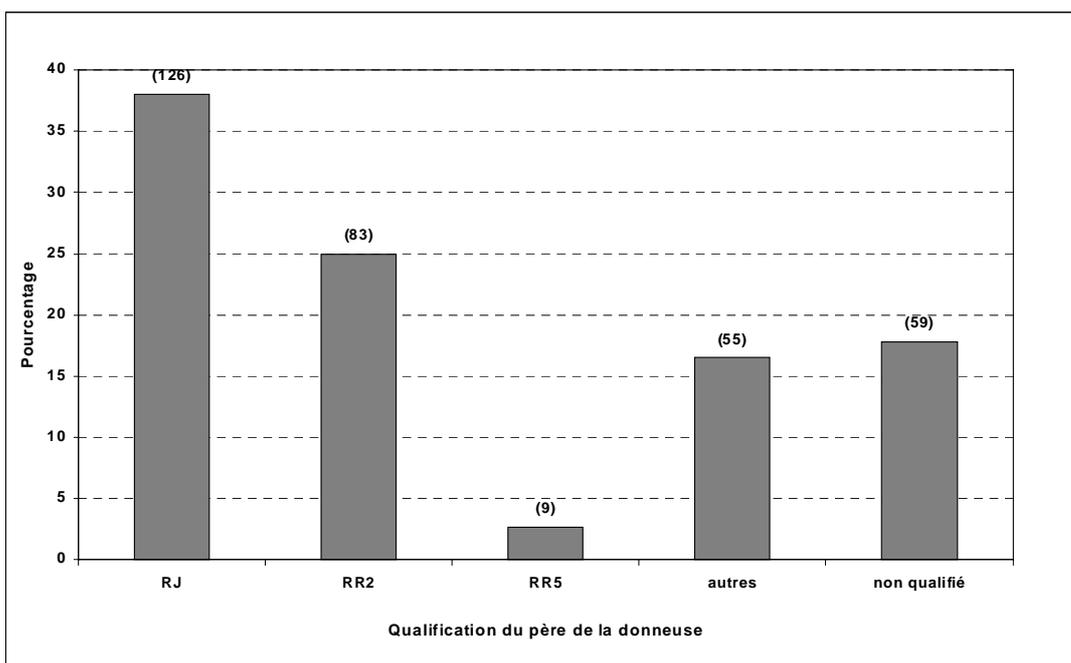
**Figure 2 : Répartition des qualifications de la donneuse d'embryons et de sa mère (n = 332)**

Les chiffres indiqués au sommet des colonnes correspondent au nombre de donneuses pour chaque qualification.



**Figure 3 : Répartition des qualifications du père de la donneuse d'embryons (n = 332)**

Les chiffres indiqués au sommet des colonnes correspondent à l'effectif de père de la donneuse pour chaque qualification.



□ Donneuse jumelle à la naissance

Malgré un effectif très réduit (moins de 2% de l'effectif total), la variable *donneuse jumelle* a été conservée pour l'étude statistique (tableau 22).

**Tableau 22 : Description de la variable *donneuse jumelle* (n = 332)**

Variable	Modalités	Génisse	Vache	Total (%)
Donneuse jumelle	Oui	2	4	6 (1,8 %)
	Non	81	245	326 (98,2 %)

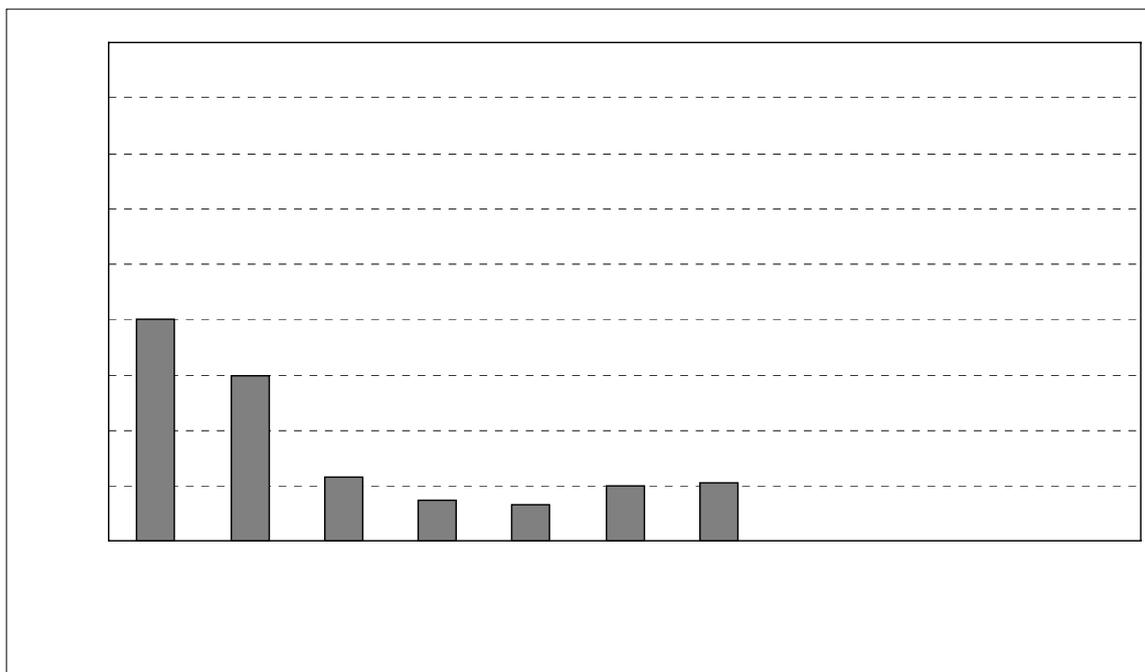
## 2 – Variables liées à la collecte

□ Année de collecte

Cette étude regroupe les résultats de 11 années de collectes d'embryons (1989 – 1999). Le nombre de traitements de superovulation effectués chaque année est présenté sur la figure 4.

**Figure 4 : Répartition du nombre de traitements de superovulation par année (n = 927)**

Les chiffres à l'intérieur des colonnes correspondent aux pourcentages relatifs de traitement de rang 1 et de traitements de rangs supérieurs à 1 pour chaque année.

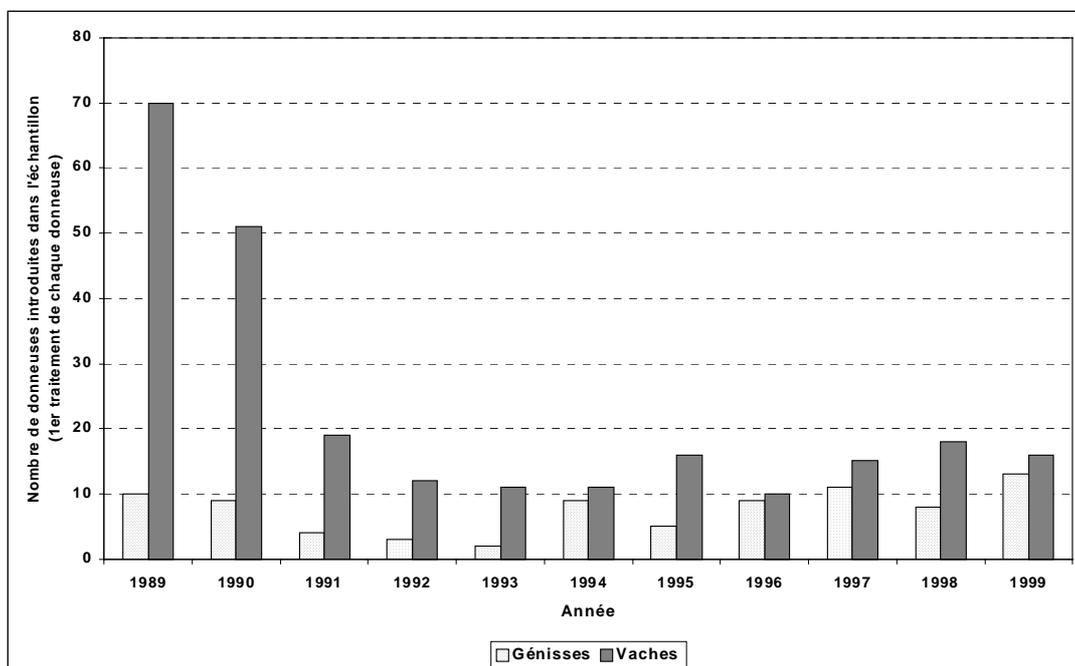


13 génisses (45 %) et 16 vaches (55 %). La tendance actuelle est donc au renouvellement des anciennes donneuses et ce, non plus par des vaches mais par des génisses.

**Tableau 23 : Effectif de donneuses d'embryons introduites chaque année dans l'échantillon d'étude**

Année	Génisses n = 83 (%)	Vaches n = 249 (%)	Total n = 332
1989	10 (12,5)	70 (87,5)	80
1990	9 (15,0)	51 (85,0)	60
1991	4 (17,4)	19 (82,6)	23
1992	3 (20,0)	12 (80,0)	15
1993	2 (15,4)	11 (84,6)	13
1994	9 (45,0)	11 (55,0)	20
1995	5 (23,8)	16 (76,2)	21
1996	9 (47,4)	10 (52,6)	19
1997	11 (42,3)	15 (57,7)	26
1998	8 (30,8)	18 (69,2)	26
1999	13 (44,8)	16 (55,2)	29

**Figure 5 : Répartition du nombre de donneuses d'embryons (génisses et vaches) introduites chaque année dans l'échantillon (n = 332)**

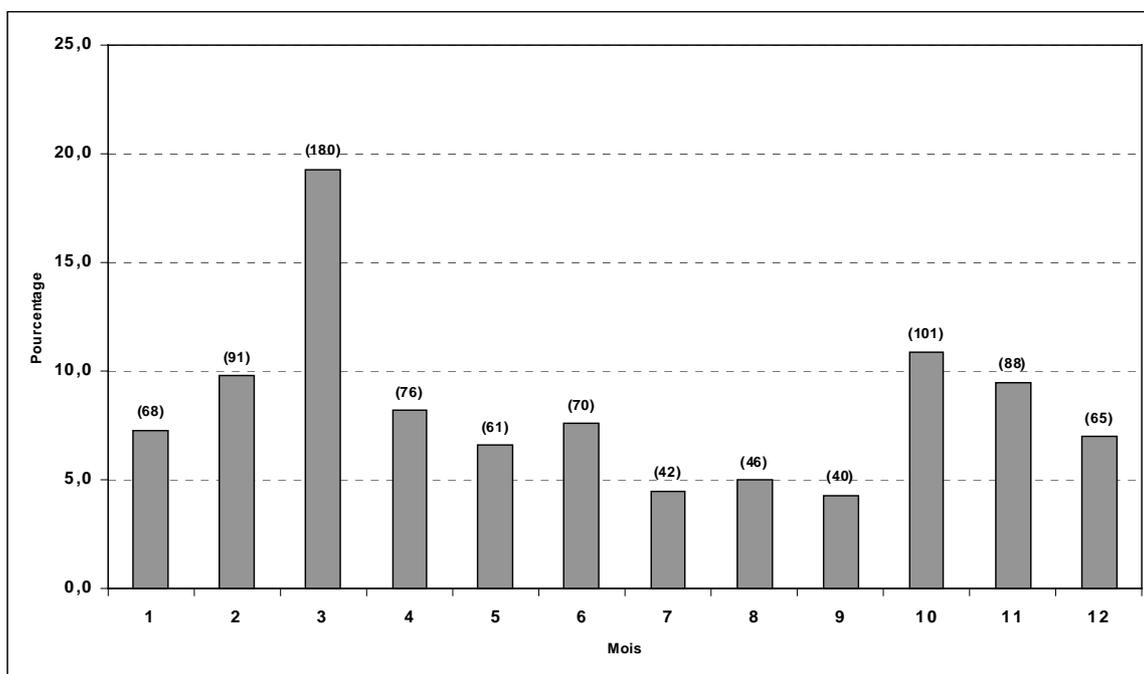


□ Mois de collecte

La figure 6 donne la répartition de l'activité en fonction du mois de l'année. C'est au mois de mars qu'est réalisée la plus forte proportion de traitements de superovulation (19,3 % soit 179 sur un total de 927 traitements).

**Figure 6 : Répartition du nombre de traitements de superovulation par mois (n = 927)**

Les chiffres indiqués au sommet des colonnes correspondent au nombre de traitements effectués chaque mois.



La variable *Mois de collecte* a été mise en classe selon deux modalités : les collectes réalisées de décembre à avril (saison d'hivernage) et celles réalisées de mai à novembre (saison de pâturage). La nouvelle variable *Saison de collecte* est présentée dans le tableau 24.

**Tableau 24 : Présentation de la variable *Mois de collecte* mise en classes**

Variable	Classe	n	%
Saison de collecte	Décembre à Avril	479	51,7
	Mai à Novembre	448	48,3

- Variables *Age, Parité, Note de difficulté de vêlage et Intervalle vêlage-traitement*

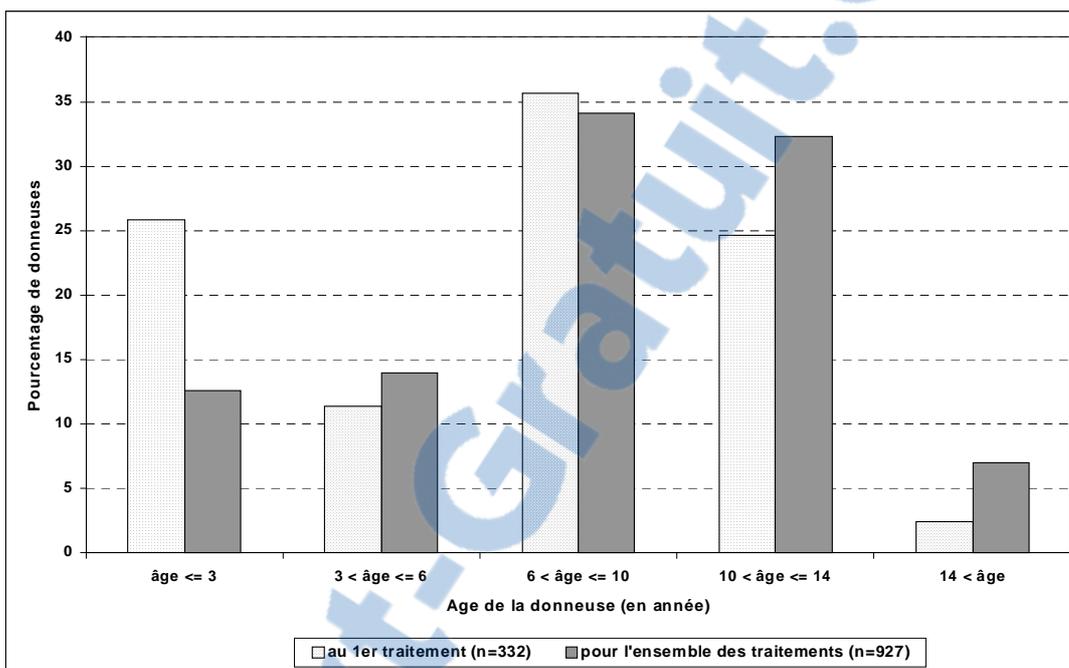
**Tableau 25 : Description des variables quantitatives pour le premier traitement *Age, Parité, Note de difficulté de vêlage et Intervalle vêlage-traitement***

Variable	Génisses n = 83	Vaches n = 249	Total n = 332
Age (en années)	1,8 ± 0,5	8,9 ± 2,9	7,1 ± 4,0
Parité	0	5,6 ± 2,6	4,2 ± 3,3
Note de difficulté de vêlage précédant le traitement	/	1,4 ± 0,8	/
Intervalle vêlage – traitement (en jours)	/	335,3 ± 296,0	/

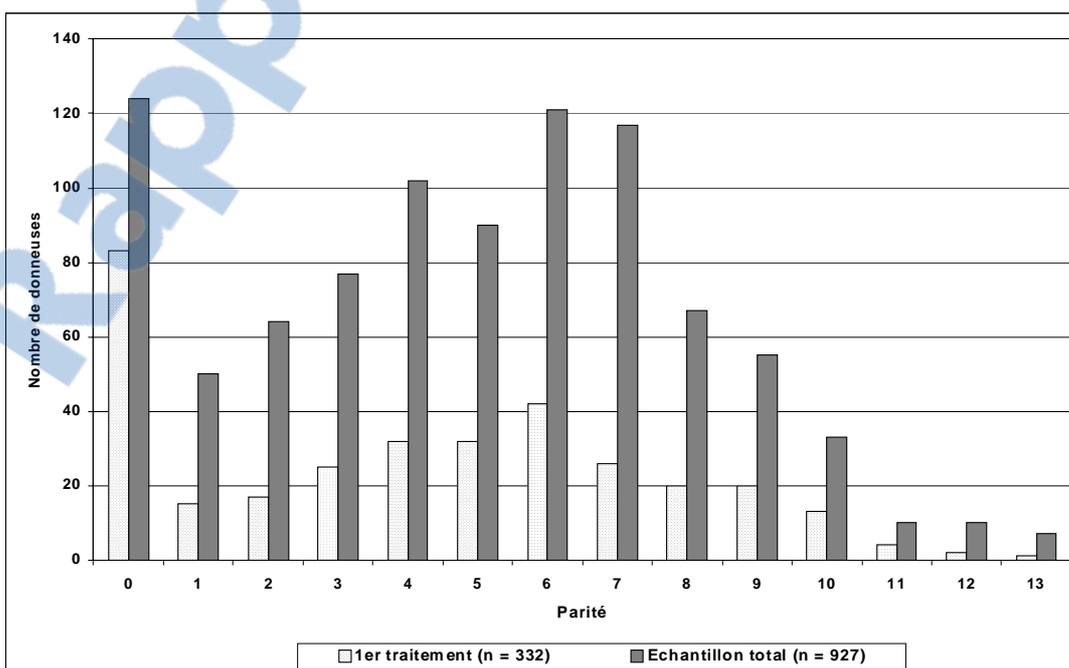
Plus de 90 % des vaches sont collectées après un vêlage sans aide (note 1) ou avec aide facile (note 2).

Les figures 7, 8 et 9 donnent les répartitions des variables quantitatives *Age*, *Parité* et *intervalle vêlage-1<sup>er</sup> traitement*.

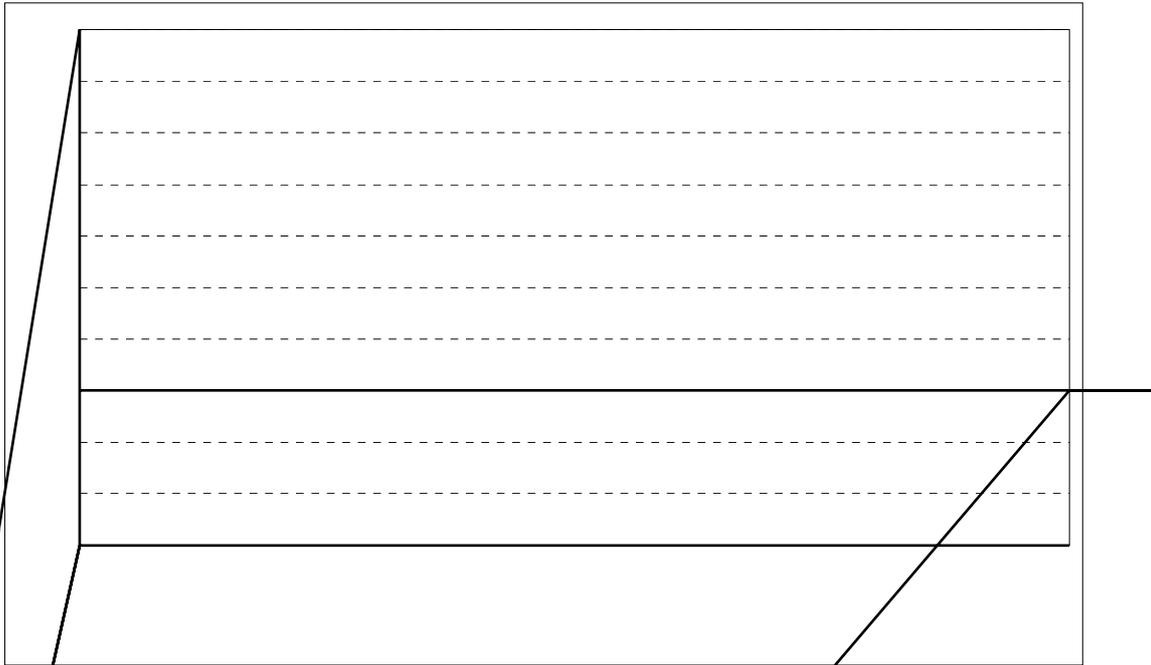
**Figure 7 : Répartition de la variable *Age* (en années) pour le premier traitement de chaque donneuse (n=332) et pour l'échantillon total (n=927)**



**Figure 8 : Répartition de la variable *Parité* pour le premier traitement de chaque donneuse (n = 332) et pour l'échantillon total (n = 927)**



**Figure 9 : Répartition de la variable *Intervalle vêlage-traitement* (en jours) pour le premier traitement de chaque vache (n = 249)**



**Tableau 27 : Description de la variable Rang de traitement intralactation**

Variable	m ± σ	min.	max.
Rang de traitement intralactation	2,6 ± 2,4	1	18

Cette variable mise en classes est présentée dans le tableau 28 ; les effectifs concernent l'échantillon total (927 traitements de superovulation). Deux mises en classes différentes ont été utilisées.

**Tableau 28 : Présentation de la variable Rang de traitement intralactation mise en classes**

Variable	Classe	n	%
Rang de traitement intralactation (1)	= 1	430	46,4
	> 1	497	53,6
Rang de traitement intralactation (2)	= 1	430	46,4
	= 2 ou 3	296	31,9
	> 3	201	21,7

### 3 – Variables réponses

Les variables réponses doivent permettre d'apprécier, quantitativement mais aussi qualitativement, la réponse ovarienne au traitement de superovulation : il s'agit du *Nombre total de structures par collecte* et du *Nombre d'embryons viables (ou transférables) par collecte*.

Le *Nombre total de structures par collecte* correspond à la somme du nombre d'embryons viables, du nombre d'embryons dégénérés et du nombre d'ovocytes non fécondés par collecte. Le *Nombre d'embryons viables par collecte* est donc le résultat du tri et de l'appréciation de la qualité des embryons par l'opérateur. Ces variables seront présentées dans la partie II – Résultats.

## F – Analyses statistiques

### 1 – Analyse univariée

L'objectif de cette analyse est de mettre en évidence les variables qui influencent de façon significative les deux variables réponses (ou variables expliquées) à savoir le *Nombre total de structures par collecte* et le *Nombre d'embryons viables par collecte*. Ces deux variables sont quantitatives.

Dans un premier temps, la normalité de la répartition des variables réponses a été vérifiée. Dans le cas où cette répartition était non normale, la transformation la plus adéquate a été utilisée. Dans un second temps, l'association entre la variable expliquée et les variables explicatives a été étudiée individuellement. Les tests statistiques utilisés dans cette analyse ont été :

- Le test t pour les variables qualitatives à deux modalités,
- L'analyse de la variance pour les variables qualitatives à plus de deux classes,
- Le test de corrélation pour les variables quantitatives.

Seules les variables significatives au seuil de 15 % ( $p < 0,15$ ) seront conservées pour l'analyse multivariée.

La liste des variables retenues pour l'analyse univariée est rappelée ci dessous.

□ Variables individuelles

- ✓ *Le pointage adulte développement musculaire*
- ✓ *Le pointage adulte développement squelettique*
- ✓ *Le pointage adulte qualités fonctionnelles*
- ✓ *L'index génotypique développement musculaire*
- ✓ *L'index génotypique développement squelettique*
- ✓ *L'index génotypique croissance*
- ✓ *L'index génotypique synthèse sevrage*
- ✓ *L'index génotypique allaitement*
- ✓ *L'index génotypique facilité de naissance*
- ✓ *L'index génotypique valeur maternelle au sevrage*
- ✓ *La qualification de la donneuse*
- ✓ *La qualification de la mère de la donneuse*
- ✓ *La qualification du père de la donneuse*
- ✓ *La variable donneuse jumelle à la naissance*

□ Variables liées à la collecte

- ✓ *L'année*
- ✓ *Le mois*
- ✓ *La saison (variable mois de collecte mise en classes)*
- ✓ *L'âge*
- ✓ *La parité*
- ✓ *La parité mise en classes*
- ✓ *La note de difficultés de vêlage*
- ✓ *L'intervalle vêlage – traitement*
- ✓ *L'intervalle vêlage – traitement mis en classes*
- ✓ *Le rang de traitement intralactation*
- ✓ *Le rang de traitement intralactation mis en classes (1)*
- ✓ *Le rang de traitement intralactation mis en classes (2)*

□ Variables réponses

- ✓ *Le nombre total de structures par collecte*
- ✓ *Le nombre d'embryons transférables par collecte*

## 2 – Analyse multivariée

L'objectif de cette analyse est de modéliser les variables réponses en tenant compte des interactions entre variables explicatives. Dans les modèles multivariés, les effets de chaque facteur sont ajustés pour les effets des autres facteurs introduits dans le modèle.

Nous avons procédé de la façon suivante :

- Mise en évidence des variables explicatives liées à la variable à expliquer grâce aux tests statistiques cités plus haut.
- Sélection des facteurs explicatifs dont  $p$  est inférieur ou égal à 0,15 et inclusion de tous ces facteurs dans le modèle multivarié.
- Elimination progressive des facteurs non significatifs pour ne garder que les facteurs significatifs au seuil de 5 %.
- Sélection du modèle le plus adéquat comportant le plus grand nombre de facteurs significatifs.

Afin de tenir compte du fait que nous disposons de plusieurs collectes pour chaque vache, nous avons introduit un *effet* « *animal* » *aléatoire* dans tous les modèles multivariés.

Certaines variables explicatives, très liées ou redondantes, ont été introduites dans des modèles différents. Par exemple, le *rang de traitement intralactation* a été introduit sous la forme de variable qualitative, sous la forme de variable en classe à deux modalités et sous la forme de variable en classe à trois modalités dans des modèles différents. Ainsi, il est possible que plusieurs modèles donnent une description satisfaisante de la variable à expliquer.

L'analyse multifactorielle a été réalisée à l'aide de la procédure MIXED du logiciel SAS (SAS Institute Inc., 1996).

Les analyses ont été réalisées sur deux échantillons différents :

- ✓ l'échantillon complet de toutes les collectes,
- ✓ le sous-échantillon des vaches.

Cette démarche a été utilisée pour pouvoir prendre en compte notamment des facteurs qui ne concernent que les vaches, comme *l'intervalle vêlage – collecte* et la *note de difficulté de vêlage* précédant la collecte.

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ( $m$ )  $\pm$  écart type ( $\sigma$ ) dans l'analyse descriptive et univariée et sous la forme moyenne ajustée ( $lsmeans$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (s.e.) dans l'analyse multivariée.

## II – RESULTATS

### A – Analyse descriptive

#### 1 – Taux global de superovulation après traitement

L'objectif des traitements de superovulation suivis des collectes d'embryons est d'obtenir après collecte au minimum deux embryons viables. En effet, il semble logique de considérer qu'un animal a superovulé à partir du moment où il a produit au minimum deux embryons viables par collecte. Ainsi, afin d'évaluer le taux global de superovulation après stimulation ovarienne, il faut exclure de l'échantillon initial deux catégories d'animaux :

- ✓ les animaux stimulés mais non collectés (animaux stimulés mais exclus avant la collecte),
- ✓ les animaux stimulés et collectés mais ayant produit moins de deux embryons viables.

Ainsi, on peut estimer qu'un peu plus de 2 animaux sur 10 traités n'ont pas répondu au traitement de superovulation (tableau 29).

Tableau 29 : Réponse au traitement de superovulation (332 animaux ; 927 traitements)

		<b>Génisses n = 83</b>	<b>Vaches n = 249</b>	<b>Total n = 332</b>
A	Nombre de traitements	124	803	927
B	Nombre de collectes	122	751	873
<b>D = B/A</b>	<b>Taux de collecte après traitement</b>	<b>98,4 %</b>	<b>93,5 %</b>	<b>94,2 %</b>
C	Nombre de collectes avec au minimum 2 embryons viables	100	607	707
E = C/B	Taux de collecte avec au minimum 2 embryons viables par collecte	82,0 %	80,1 %	81,0 %
<b>F = C/A</b>	<b>Taux global de superovulation après traitement</b>	<b>80,6 %</b>	<b>75,6 %</b>	<b>76,3 %</b>

#### 2 – Résultats moyens par collecte

Le tableau 30 présente les variables réponses : le *nombre total de structures par collecte* et le *nombre d'embryons viables par collecte*. Les résultats sont exprimés en nombre de structures ou d'embryons par collecte (et non pas par traitement de superovulation) ; ce rappel est nécessaire puisque tous les animaux traités n'ont pas été collectés, le taux de collecte après traitement étant de 94,2 %.

**Tableau 30 : Résultats des collectes d'embryons**

<b>Variable</b>	<b>Génisses n = 122</b>	<b>Vaches n = 751</b>	<b>Total n = 873</b>
Nombre total de structures par collectes	9,0 ± 5,2	12,7 ± 7,9	12,2 ± 7,7
Nombre d'embryons viables par collecte	5,7 ± 4,8	6,8 ± 5,9	6,7 ± 5,8
Pourcentage d'embryons viables par collecte	66,0 %	54,6 %	55,8 %

### **3 – Corrélations entre variables**

Les résultats des tests de corrélation entre les variables explicatives et les variables réponses seront présentées dans la partie « analyse univariée ». Nous ne présenterons ici que les corrélations entre les deux variables réponses et les corrélations entre certaines variables explicatives.

- Corrélation entre les deux variables réponses

Les variables *Nombre total de structures par collecte* et *Nombre d'embryons viables par collecte* sont fortement corrélées ( $r = 0,68$  ;  $p = 0,0001$  ;  $n = 856$ ). Le nombre d'embryons viables par collecte augmente avec le nombre total d'embryons par collecte.

- Corrélations entre variables explicatives

La variable *Age* est corrélée avec trois autres variables. Ces corrélations sont présentées dans le tableau 31.

**Tableau 31 : Corrélations entre la variable Age et les autres variables explicatives**

<b>Variabes corrélées à l'âge</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Parité	927	0,89	0,001
Intervalle vêlage-traitement	803	0,48	0,001
Rang de traitement intralactation	803	0,38	0,001

Les variables *Intervalle vêlage – traitement* et *Rang de traitement intralactation* sont également corrélées entre elles ( $n = 803$  ;  $r = 0,68$  ;  $p = 0,0001$ ).

## **B – Facteurs de variation du Nombre total de structures par collecte et du Nombre d'embryons viables par collecte**

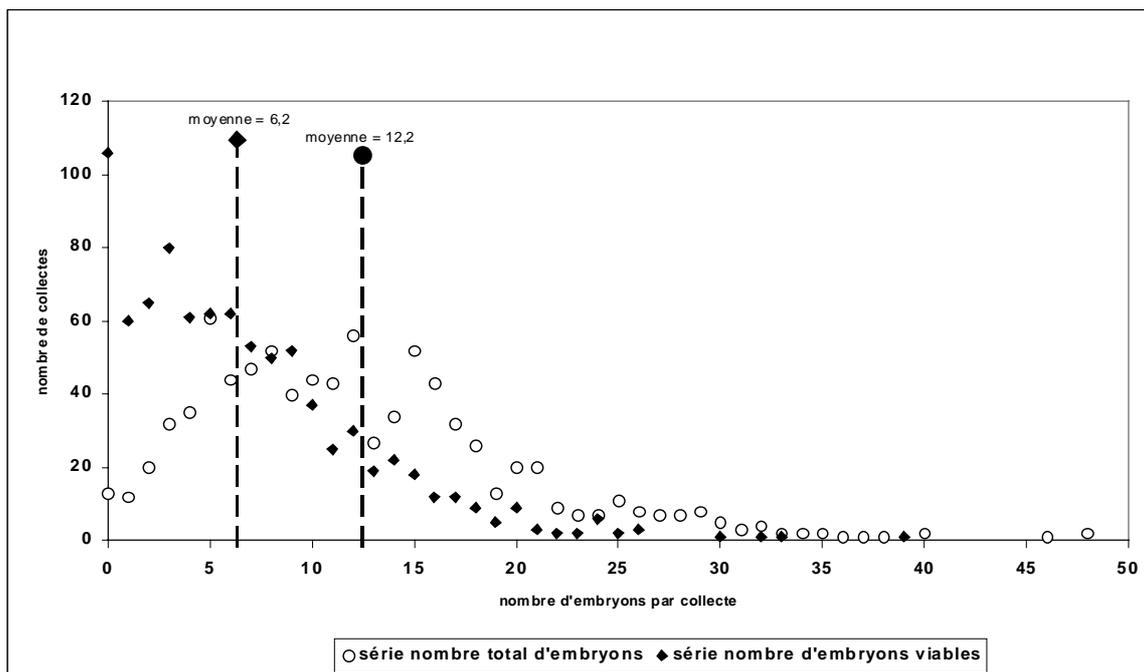
### **1 – Analyse sur l'échantillon total**

#### **a – Analyse univariée**

##### **α – Distribution des variables réponses**

La figure 10 donne la répartition des variables *Nombre total de structures par collecte* et *Nombre d'embryons viables par collecte* dans l'échantillon total.

**Figure 10 : Répartition des variables *Nombre total de structures par collecte* et *Nombre d'embryons viables par collecte* sur l'échantillon total.**



L'analyse univariée (et la figure 10) montre que les distributions des variables réponses *Nombre de structures par collecte* (STR) et *Nombre d'embryons viables par collecte* (UTIL) ne suivent pas une loi normale. Nous avons donc décidé de travailler sur deux nouvelles variables réponses (LSTR et LUTIL) dérivées des précédentes et qui se rapprochent plus d'une distribution normale :  $LSTR = \ln (STR + 1)$  et  $LUTIL = \ln (UTIL + 1)$ .

### $\beta$ – Variables explicatives

Les effets des variables quantitatives et qualitatives (dont la liste récapitulative est présentée page 57) ont été testés sur le *Nombre total de structures par collecte* et sur le *Nombre d'embryons viables par collecte*. Seuls les facteurs significatifs au seuil de 15 % ont été retenus et serviront à construire le modèle pour l'analyse multivariée.

- Variables explicatives du *Nombre total de structures par collecte* (tableau 32)

**Tableau 32 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon total (n = 927) – Variables explicatives du *Nombre total de structures par collecte* (p<0,15)**

<b>Variable</b>	<b>Test</b>	<b>p</b>
Année de collecte	Analyse de la variance	0,0463
Saison de collecte	Test t	0,1200
Rang de traitement intralactation	Analyse de la variance	0,0016
Rang de traitement intralactation en classes (1)	Test t	0,0013
Rang de traitement intralactation en classes (2)	Analyse de la variance	0,0001
Parité	Analyse de la variance	0,0094
Parité en classes	Analyse de la variance	0,0001
Index allaitement	Test de corrélation	0,0907 (r = 0,0766)
Index valeur maternelle au sevrage	Test de corrélation	0,0324 (r = 0,1049)

- Variables explicatives du *Nombre d'embryons viables par collecte* (tableau 33)

**Tableau 33 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon total (n = 927) – Variables explicatives du *Nombre d'embryons viables par collecte* (p<0,15)**

<b>Variable</b>	<b>Test</b>	<b>p</b>
Age	Test de corrélation	0,1355 (r = - 0,0505)
Saison de collecte	Test t	0,0753
Rang de traitement intralactation	Analyse de la variance	0,0381
Rang de traitement intralactation en classes (1)	Test t	0,0004
Rang de traitement intralactation en classes (2)	Analyse de la variance	0,0016
Index allaitement	Test de corrélation	0,0486 (r = 0,0881)
Index valeur maternelle au sevrage	Test de corrélation	0,1359 (r = 0,0725)

Pour les autres variables, aucun effet significatif n'a été mis en évidence.

plus, l'écart entre la meilleure et la moins bonne année de collecte est accentué par rapport au modèle précédent (3,9 structures entre 1989 et 1999).

**Tableau 35 : Modèle multivarié n°2 pour la variable *Nombre total de structures collectées* (échantillon total)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Parité	0	7,11	0,07	<0,001
	1 à 5	10,60	0,04	
	6 et plus	10,07	0,04	
Rang de traitement intralactation en classes (2)	1	10,60	0,04	<0,001
	2 ou 3	9,48	0,04	
	> 3	8,57	0,06	
Année	89	7,17	0,07	<0,05
	90	8,93	0,06	
	91	8,73	0,07	
	92	10,28	0,10	
	93	10,18	0,12	
	94	9,02	0,08	
	95	10,46	0,08	
	96	7,36	0,09	
	97	9,38	0,08	
	98	9,57	0,08	
	99	11,07	0,09	

### **$\beta$ – Modélisation de la variable réponse *Nombre d'embryons viables par collecte***

Toutes les variables explicatives ( $p < 0,15$ ) du *Nombre d'embryons viables par collecte* présentées dans le tableau 33 ont été introduites dans le modèle multivarié initial. Pour chacun des modèles ci-dessous, sont présentées les variables significatives au seuil de 5%.

□ Modélisation avec la variable *Rang de traitement intralactation en classes* (1)

➤ - Modèle n°1

Avec ce modèle, aucune variable ne présente un effet significatif sur le *Nombre d'embryons viables par collecte*. Seules sont observées des tendances pour les variables *Saison de collecte* et *Index allaitement* (tableau 36).

**Tableau 36 : Modèle multivarié n°1 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon total)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Saison	Mai à Nov.	4,69	0,06	= 0,11
	Déc. à Avril	5,43	0,06	

Malgré une tendance ( $p = 0,06$ ) pour l'*Index allaitement*, la relation avec le *Nombre d'embryons viables par collecte* reste faible puisque le coefficient de corrélation est égal à 0,09 ( $p < 0,05$ ,  $n = 501$ ).

➤ - Modèle n° 2

Ce modèle met en évidence un effet significatif de la variable *Rang de traitement intralactation en classes (1)* sur le *Nombre d'embryons viables par collecte* et une tendance pour la variable *Saison* de collecte (tableau 37). La différence d'embryons viables par collecte entre la saison de pâture et la saison d'hivernage reste faible (inférieure à 1 embryon viable par collecte en faveur de la période d'hivernage). Le premier traitement est significativement plus productif en terme d'embryons viables que les suivants.

**Tableau 37 : Modèle multivarié n°2 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon total)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Saison	Mai à Nov.	4,26	0,05	= 0,07
	Déc. à Avril	4,88	0,04	
Rang de traitement intralactation en classes (1)	= 1	5,16	0,04	<0,001
	> 1	3,99	0,05	

□ Modélisation avec la variable *Rang de traitement intralactation en classes (2)*

➤ - Modèle n° 3

Dans ce modèle, par rapport au précédent, l'effet du *Rang de traitement intralactation* n'est défavorable qu'à partir du quatrième traitement. On retrouve également les tendances concernant l'effet *Saison* et l'effet *Index allaitement* (tableau 38).

**Tableau 38 : Modèle multivarié n°3 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon total)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Saison	Mai à Nov.	4,41	0,06	= 0,09
	Déc. à Avril	5,15	0,06	
Rang de traitement intralactation en classes (2)	= 1	5,33	0,06	<0,05
	= 2 ou 3	5,33	0,08	
	> 3	3,79	0,10	

➤ - Modèle n° 4

C'est dans ce modèle que l'effet défavorable de l'augmentation du *Rang de traitement intralactation* sur le *Nombre d'embryons viables par collecte* est le plus marqué et il se fait ressentir dès le deuxième ou troisième traitement contrairement au modèle précédent (tableau 39).

**Tableau 39 : Modèle multivarié n°4 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon total)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Saison	Mai à Nov.	4,00	0,05	= 0,07
	Déc. à Avril	4,56	0,05	
Rang de traitement intralactation en classes (2)	= 1	5,16	0,05	<0,001
	= 2 ou 3	4,24	0,06	
	> 3	3,54	0,07	

## $\chi$ – Bilan

Les différents modèles montrent que le *Nombre total de structures par collecte* est significativement plus élevé chez les vaches par rapport aux génisses ( $p < 0,001$ ), décroît significativement quand le *Rang de traitement intralactation* augmente ( $p < 0,001$ ) et qu'il est significativement influencé par l'*Année de collecte*.

Par contre, le *Rang de traitement intralactation* est la seule variable qui influence de façon significative le *Nombre d'embryons viables par collecte* ; selon les modèles, le *Nombre d'embryons viables par collecte* diminue dès le deuxième traitement ou seulement à partir du quatrième. Une tendance est aussi observée pour l'effet *Saison* : le *Nombre d'embryons viables par collecte* est légèrement supérieur en période d'hivernage par rapport à la période de pâturage.

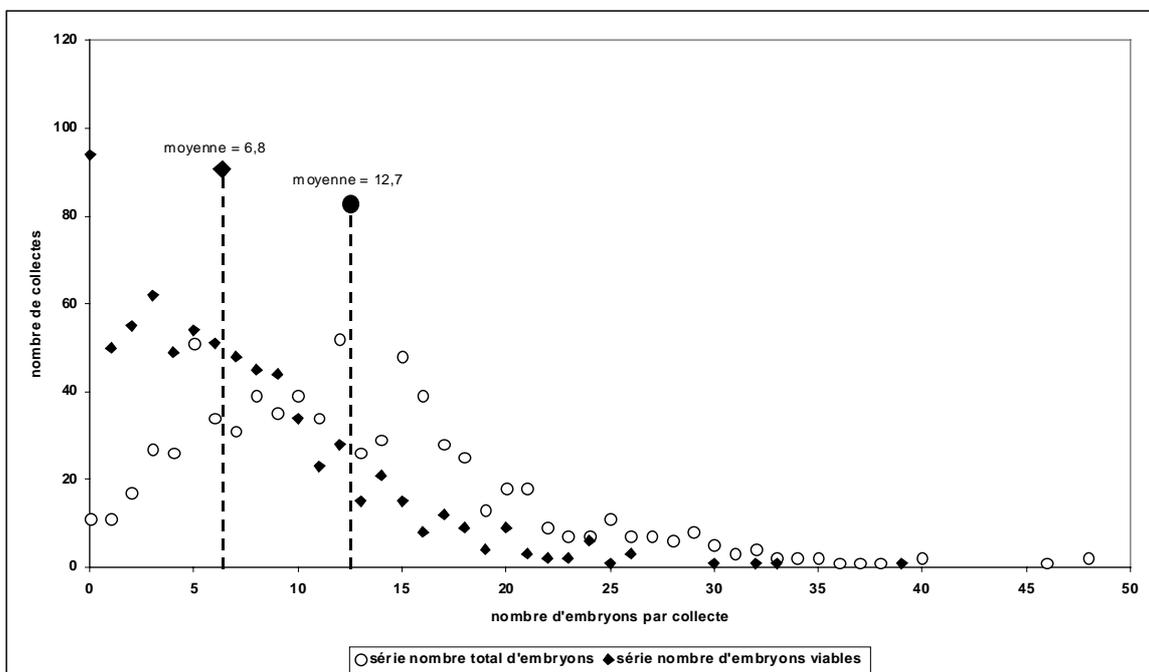
## 2 – Analyse sur le sous-ensemble des vaches

### a – Analyse univariée

#### $\alpha$ – Distribution des variables réponses

Les distributions des variables *Nombre total de structures par collecte* et *Nombre d'embryons viables par collecte* sont données dans la figure 11.

**Figure 11 : Répartition des variables *Nombre total de structures par collecte* et *Nombre d'embryons viables par collecte* sur l'échantillon des vaches.**



De la même façon que dans l'analyse sur l'échantillon total, les deux variables réponses ont été transformées de façon à ce que leur distribution se rapproche d'une distribution normale. La transformation est la même, à savoir :  $LSTR = \ln (STR + 1)$  et  $LUTIL = \ln (UTIL + 1)$ .

## β – Variables explicatives

- Variables explicatives du *Nombre total de structures par collecte* (tableau 40)

**Tableau 40 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon vaches (n = 803) – Variables explicatives du *Nombre total de structures par collecte* (p<0,15)**

<b>Variable</b>	<b>Test</b>	<b>p</b>
Age	Test de corrélation	0,0001 (r = -0,1619)
Parité en classes	Analyse de la variance	0,07
Rang de traitement intralactation	Analyse de la variance	0,0072
Rang de traitement intralactation en classes (1)	Test t	<0,0001
Rang de traitement intralactation en classes (2)	Analyse de la variance	0,0001
Intervalle vêlage – traitement	Test de corrélation	0,0001 (r = -0,2122)
Intervalle vêlage – traitement en classes	Analyse de la variance	0,0001
Donneuse jumelle	Test t	0,0042
Pointage adulte qualités fonctionnelles	Test de corrélation	0,1177 (r = -0,0580)
Index facilité de naissance	Test de corrélation	0,0840 (r = -0,0843)
Index allaitement	Test de corrélation	0,1430 (r = 0,0716)
Index sevrage	Test de corrélation	0,0958 (r = 0,0629)
Index valeur maternelle au sevrage	Test de corrélation	0,0096 (r = 0,1370)

- variables explicatives du *Nombre d'embryons viables par collecte* (tableau 41)

**Tableau 41 : Résultats de l'analyse univariée sur l'échantillon vaches (n = 803) – Variables explicatives du *Nombre d'embryons viables par collecte* (p<0,15)**

<b>Variable</b>	<b>Test</b>	<b>p</b>
Saison de collecte	Test t	0,1314
Age	Test de corrélation	0,0028 (r = -0,1091)
Rang de traitement intralactation	Analyse de la variance	0,0381
Rang de traitement intralactation en classes (1)	Test t	0,0001
Rang de traitement intralactation en classes (2)	Analyse de la variance	0,0016
Intervalle vêlage – traitement	Test de corrélation	0,0001 (r = -0,1445)
Intervalle vêlage – traitement en classes	Analyse de la variance	0,0002
Pointage adulte qualités fonctionnelles	Test de corrélation	0,1436 (r = -0,0538)
Index allaitement	Test de corrélation	0,0451 (r = 0,0967)
Index valeur maternelle au sevrage	Test de corrélation	0,1273 (r = 0,0803)

## **b – Analyse multivariée**

### **α – Modélisation de la variable réponse *Nombre total de structures par collecte***

Toutes les variables explicatives (p<0,15) du *Nombre total de structures par collecte* présentées dans le tableau 40 ont été introduites dans le modèle multivarié initial. Pour chacun des modèles ci-dessous, sont présentées les variables significatives au seuil de 5%.

#### ➤ Modèle n°1

Ce premier modèle montre que le *Nombre total de structures par collecte* est significativement influencé par les variables *Age* (p = 0,0001) et *Parité* (p = 0,0001). L'analyse univariée a montré que les corrélations entre ces variables et le *Nombre total de structures par collecte* sont négatives (r = -0,18 et p<0,001 pour l'Age). Le *Nombre total de structures par collecte* diminue donc quand l'Age et la Parité augmentent. De plus, nous avons déjà vu que les deux variables *Age* et *Parité* sont fortement corrélées (r = 0,89 ; p = 0,0001 ; n = 803)

#### ➤ Modèle n°2 (tableau 42)

L'effet significatif de l'Age est à nouveau présent dans ce modèle et il est associé à un effet significatif du *Rang de traitement intralactation en classes (2)*.

**Tableau 42 : Modèle multivarié n°2 pour la variable *Nombre total de structures par collecte* (échantillon des vaches)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Rang de traitement intralactation en classes (2)	= 1	11,40	0,04	< 0,01
	= 2 ou 3	10,38	0,04	
	> 3	8,80	0,06	

Le *Nombre total de structures par collecte* diminue donc quand l'Age et le *Rang de traitement* augmentent ; une différence d'un peu plus d'un embryon par collecte est observée entre le premier et les deux traitements qui suivent ; cette différence est supérieure à 2,5 embryons par collecte quand on dépasse trois traitements.

➤ Modèle n°3 (tableau 43)

**Tableau 43 : Modèle multivarié n°3 pour la variable *Nombre total de structures par collecte* (échantillon des vaches)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Rang de traitement intralactation en classes (1)	= 1	11,51	0,04	< 0,01
	> 1	9,73	0,04	
Age en classes	=< 9,5	11,31	0,04	<0,05
	> 9,5	9,90	0,04	

➤ Modèle 4 (tableau 44)

Ce modèle met en évidence un effet significatif de l'*Intervalle vêlage–traitement* : le *Nombre total de structures par collecte* diminue lorsque l'*Intervalle vêlage–traitement* augmente ( $p < 0,001$ ). Ce modèle est aussi le seul dans lequel apparaît un effet de la variable *Pointage adulte Qualités fonctionnelles*.

**Tableau 44 : Modèle multivarié n°4 pour la variable *Nombre total de structures par collecte* (échantillon des vaches)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Pointage adulte Qualités Fonctionnelles	≤ 80	10,77	0,03	= 0,0681
	> 80	9,33	0,06	
Intervalle vêlage–collecte (IVC) en classes	IVC < 240 j	12,22	0,05	< 0,001
	240 j ≤ IVC < 380 j	11,22	0,05	
	380 j ≤ IVC < 750 j	9,54	0,06	
	IVC ≥ 750 j	7,69	0,06	

### **β – Modélisation de la variable réponse *Nombre d'embryons viables par collecte***

Toutes les variables explicatives ( $p < 0,15$ ) du *Nombre d'embryons viables par collecte* présentées dans le tableau 41 ont été introduites dans le modèle multivarié initial. Pour chacun des modèles ci-dessous, sont présentées les variables significatives au seuil de 5%.

□ Modélisation avec le *Rang de traitement intralactation* en classes (1)

➤ Modèle n°1

Dans ce modèle, les deux variables qui influencent significativement le *Nombre d'embryons viables par collecte* sont l'*Intervalle vêlage-traitement* ( $p < 0,01$ ) et l'*Age* ( $p = 0,05$ ). Le tableau 45 rappelle les corrélations entre ces variables et le *Nombre d'embryons viables par collecte*.

**Tableau 45 : Modèle multivarié n°1 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon des vaches)**

Variable	n	r	p
Intervalle vêlage-traitement	751	- 0,16	0,0001
Age	751	- 0,14	0,0002

Les corrélations étant négatives, le *Nombre d'embryons viables par collecte* diminue significativement quand augmentent l'*Intervalle vêlage – collecte* et l'*Age*.

➤ Modèle n°2

L'effet de l'*Intervalle vêlage-traitement*, après avoir été mis en classes, apparaît de nouveau mais son effet est moins prononcé que dans le modèle précédent ; de plus, le *Nombre d'embryons viables par collecte* est significativement supérieur pour le premier traitement par rapport aux suivants ( $p < 0,01$ ) (tableau 46).

**Tableau 46 : Modèle multivarié n°2 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon des vaches)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Intervalle vêlage-traitement en classes	< 380	5,02	0,05	= 0,0785
	≥ 380	4,25	0,06	
Rang de traitement intralactation en classes (1)	1	5,25	0,06	<0,01
	>1	4,06	0,05	

□ Modélisation avec le *Rang de traitement intralactation* en classes (2)

➤ Modèle n°3

Sont observés dans ce modèle, des effets significatifs pour les variables *Rang de traitement intralactation* en classes (2) ( $p < 0,001$ ) et *Age* ( $p < 0,05$ ) (tableau 47). Rappelons que la corrélation entre l'*Age* et le *Nombre d'embryons viables par collecte* est négative ( $r = - 0,014$  ;  $p = 0,0002$ ) : le *Nombre d'embryons viables par collecte* diminue quand l'*Age* de la donneuse augmente.

**Tableau 47 : Modèle multivarié n°3 pour la variable *Nombre d'embryons viables par collecte* (échantillon des vaches)**

Variable	Classe	lsmeans	s.e.	p
Rang de traitement intralactation en classes (2)	= 1	5,28	0,05	<0,01
	= 2 ou 3	4,23	0,06	
	> 3	3,65	0,09	

## $\chi$ – Bilan

Dans l'échantillon des vaches, les différents modèles montrent que le *Nombre total de structures par collecte* et le *Nombre d'embryons viables par collecte* diminuent significativement quand augmentent l'Age, le *Rang de traitement intralactation* et l'*Intervalle vêlage-traitement*. Une baisse du *Nombre total de structures par collecte* est également significativement associée à une augmentation de la *Parité* de la donneuse. Enfin, une tendance est observée pour le *Pointage adulte qualités fonctionnelles* : le *Nombre total de structures par collecte* diminue quand augmente le *Pointage adulte qualités fonctionnelles*.

## III – DISCUSSION

### A– Méthodologie

#### 1 – Population d'étude

Les collectes présentées dans notre étude ont été effectuées à la demande d'éleveurs par un vétérinaire praticien. Il ne s'agit donc pas de collectes effectuées par un centre d'inséminations artificielles au sein du noyau de sélection d'une race. Les animaux compris dans cet échantillon ne correspondent pas à ceux traditionnellement collectés par les équipes de transfert des coopératives d'insémination. Les critères de décision d'entreprendre une collecte sur une femelle ne sont pas exactement les mêmes. En effet, les éleveurs de cette zone souhaitent multiplier la descendance des vaches bien classées dans les concours de la race, laquelle descendance présente souvent une valeur marchande importante et supérieure à la moyenne du troupeau.

Les génisses, les vaches de parité 1 et 2, et les vaches de parité supérieure ou égale à 3 représentent respectivement 25%, 9,6% et 65,4% des donneuses introduites dans l'échantillon sur la période étudiée. La forte proportion de vaches de parité supérieure ou égale à 3 s'explique par le fait que ce sont les vaches qualifiées par le Herd Book Charolais qui sont prioritairement introduites dans l'échantillon. Or, ces qualifications ne sont accordées qu'aux vaches de parité supérieure ou égale à 3 (parité supérieure ou égale à 3 pour la qualification vache Jeune Reproductrice Reconnue et parité supérieure ou égale à 5 pour la qualification vache Adulte Reproductrice Recommandée) (annexe 1).

Les génisses sont sélectionnées sur la valeur de leur ascendance et sur leurs propres performances (croissance et conformation). Sur les 83 génisses introduites dans l'échantillon, 50,6% ne seront traitées qu'une seule fois et 21,7% le seront au moins 3 fois ; de plus, seulement 18% d'entre elles seront à nouveau traitées après leur premier vêlage. Plus de la moitié des génisses introduites dans l'échantillon ne sont donc traitées qu'une seule fois, et ce avant leur première mise à la reproduction. Nous constatons d'ailleurs que l'âge moyen des génisses, à leur premier traitement, est faible ( $1,8 \pm 0,5$  années). La collecte des embryons est donc, dans ce cas, un moyen de multiplier très tôt la descendance des animaux, avant même leur première gestation, ce qui permet aux éleveurs de vendre des génisses de renouvellement tout en conservant dans l'élevage, par l'intermédiaire des embryons, le potentiel génétique de ces animaux. De ce fait, depuis 1994, la tendance est au recrutement de plus en plus important de génisses (tableau 23). En 1999, elles représentaient 44,8% des animaux introduits dans l'échantillon.

## **2 – Le protocole**

Cette étude présente l'avantage de ne pas être biaisée par la multiplicité des opérateurs : en effet, la prescription des traitements de stimulation ovarienne, la réalisation des collectes et l'appréciation de la viabilité des embryons ont toujours été réalisées par un seul et même opérateur. Le protocole est donc parfaitement standardisé.

## **3 – Les données recueillies**

Le fichier de départ incluant les résultats de collectes de Charolais Embryons était sous forme manuscrite. La transcription de ces données en un fichier informatique pour une utilisation statistique a donc été complexe, longue et laborieuse. La quasi-totalité du fichier « résultats » de Charolais Embryons a été exploitée. Seuls quelques résultats de collectes réalisées sur des races autres que la race Charolaise ont été exclus du fichier.

Nous avons enregistré les résultats de collecte de 11 ans d'activité de Charolais Embryons, ce qui a permis d'inclure 873 collectes, avec peu de données manquantes. L'importance de cet effectif a permis une analyse statistique complexe, et en particulier une analyse multivariée.

Par contre, les données transmises par le Herd Book Charolais n'ont pas été exploitées dans leur totalité, en particulier celles concernant la descendance des donneuses d'embryons. En effet, cette étude avait également, au départ, comme objectif secondaire de comparer trois populations de veaux : les veaux nés de saillie naturelle ayant pour mère la donneuse d'embryons, les veaux nés par transfert d'embryons et ayant pour mère cette même donneuse et la population totale des veaux de race charolaise. Or ces trois populations sont difficilement comparables, et ce pour plusieurs raisons. L'effet « receveuse » sur les performances du veau est difficile à évaluer et de plus, leur environnement est différent : les veaux nés par transfert bénéficient de la part des éleveurs d'un traitement particulier (soins, alimentation, conduite d'élevage dans son ensemble). A ce sujet, il est intéressant de remarquer que, jusqu'à ce jour, les veaux nés par transfert ne sont pas pris en compte pour l'indexation des mères donneuses.

Enfin, la variable *Intervalle entre 2 traitements successifs*, bien que disponible, n'a pas été étudiée et pourra l'être ultérieurement. Son analyse doit être faite sur un échantillon différent des deux échantillons utilisés dans cette étude, à savoir le sous-ensemble des animaux qui ont été traités au moins deux fois pour un même rang de traitement intralactation.

## **B – Activité de collecte de Charolais Embryons**

### **1 – Evolution de l'activité sur la période d'étude (1989-1999)**

Les figures 12 et 13 présentées dans l'annexe 2 montrent que l'évolution de l'activité de l'équipe de transplantation embryonnaire de Charolais Embryons est comparable à celle observée au niveau national : l'année 1990 correspond à un pic d'activité suivi, dans les deux cas, d'une baisse importante jusqu'en 1993. Depuis 1993, le nombre de collectes par année, réalisées par Charolais Embryons, oscille entre 60 et 80 collectes. Au niveau national, l'activité a globalement augmenté entre 1993 et 2000 ; elle se stabilise maintenant entre 6500 et 7000 collectes par an, ce qui place la France au premier rang européen pour la production d'embryons *in vivo*. Depuis 1997, dans certains pays européens, en particulier aux Pays-Bas, mais pas encore en France, une diminution de l'activité de collecte d'embryons est concomitante du développement de la production d'embryons *in vitro* après prélèvements

d'ovocytes par ponction folliculaire échoguidée (OPU). Cette activité se substitue, pour une partie, à l'activité classique de transfert embryonnaire (PONSART, 2000).

## **2 – Evolution de l'activité au cours de l'année**

Globalement, sur la période étudiée (1989-1999), le nombre de donneuses traitées par mois (figure 6) augmente du mois de janvier au mois de mars (mois de l'année où l'activité est maximale ; 19,4% du total des traitements de superovulation). Du mois d'avril au mois de septembre, l'activité diminue globalement. Un second pic d'activité est observé au mois d'octobre (10,9% du total des traitements de superovulation). Ce second pic est suivi d'une nouvelle baisse de l'activité jusqu'au mois de décembre. Cette évolution de l'activité sur l'année est la conséquence d'une organisation du travail souhaitée par l'opérateur, qui doit concilier l'activité de transplantation embryonnaire à son activité de vétérinaire praticien, mais aussi par les éleveurs. En effet, le pic observé en mars correspond à la fin de la période de vèlage et précède la saison de pâturage. Le pic observé en octobre précède le début de la nouvelle période de vèlage.

## **B – Les résultats**

### **1 – Taux global de superovulation**

Dans notre étude, afin de calculer le taux global de superovulation après traitement (76,3% au total ; 75,6% pour les vaches ; 80,6% pour les génisses), nous avons considéré qu'un animal a superovulé à partir du moment où il a produit, après la collecte, au minimum 2 embryons viables. Ce calcul ne tient pas compte du fait que l'opérateur ne parvient pas forcément à collecter tous les embryons produits par la donneuse. Une mesure plus précise du taux global de superovulation serait donc donnée par le nombre de corps jaunes comptés à l'échographie le jour de la collecte, lequel comptage est difficile à réaliser en pratique courante.

### **2 – Taux de collecte après traitement et résultats moyens par collecte**

En moyenne, 94 % des femelles sont collectées après un traitement de stimulation ovarienne. 81 % des femelles collectées (76,3 % des femelles traitées) produisent au minimum 2 embryons viables par collecte. Le taux de collecte après traitement dans notre étude est comparable à celui obtenu dans les statistiques nationales (tableau 48).

Le nombre total de structures par collecte et le nombre d'embryons viables par collecte (respectivement  $12,2 \pm 7,7$  et  $6,7 \pm 5,8$  en moyenne sur la période 1989-1999) sont élevés par rapport aux statistiques nationales (tableau 48). Les écarts les plus importants entre Charolais Embryons et les résultats nationaux sont de 5,1 structures par collecte (en 1992) et de 3,1 embryons viables par collecte (en 1993). Les résultats nationaux incluent toutes les races et surtout une forte proportion de collectes réalisées sur des donneuses de race laitière. L'effet « race » explique sans doute en partie les différences observées ; la supériorité des races allaitantes par rapport aux races laitières, en terme de production d'embryons, avait déjà été signalée par SHARPIN et al (2000). De plus, la race Charolaise présente naturellement un taux de polyovulation plus élevé que les autres races (Institut de l'élevage, 1998).

Le nombre total de structures par collecte rapporté par SERRE (1999), en race Charolaise, est identique à celui obtenu dans notre étude par Charolais Embryons pour la période 1993-1997, à savoir, en moyenne, 12,3 structures par collecte. Par contre, le nombre d'embryons transférables par collecte et le pourcentage d'embryons transférables par collecte

obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux publiés par SERRE (1999) (respectivement 7,2 *versus* 6,0 et 58,4 % *versus* 48,3 %) (tableau 49). Les résultats des deux études diffèrent donc par la qualité des embryons produits qui est globalement meilleure pour Charolais Embryons.

**Tableau 49 : Comparaison des résultats de Charolais Embryons et de ceux publiés par SERRE (1999) pour la période 1993 – 1997**

		1993	1994	1995	1996	1997
Nombre de collectes	Charolais Embryons	41	72	69	57	69
	SERRE (1999)	383	389	388	361	315
Nombre total de structures par collecte	Charolais Embryons	13,4	11,9	13,8	10,2	12,6
	SERRE (1999)	12,26	13,05	12,32	12,47	11,63
Nombre d'embryons transférables par collecte	Charolais Embryons	7,8	7,2	7,7	6,5	6,9
	SERRE (1999)	5,23	6,20	5,82	6,66	5,99
Pourcentage d'embryons transférables par collecte	Charolais Embryons	58,2	60,5	55,8	63,7	54,8
	SERRE (1999)	42,7	47,5	47,2	53,6	51,5

### 3 – Facteurs de variation des résultats de collecte

#### a – L'âge et la parité

L'effet de la parité sur le nombre total de structures par collecte confirme les observations faites par HASLER et al (1981, 1983), DETTERER et al (1997) et MENARD et MARTINEZ (1997), à savoir que le nombre total de structures par collecte est plus faible chez les génisses que chez les vaches (lsmeans  $\pm$  se : 7,11  $\pm$  0,07 chez les génisses *versus* 10,60  $\pm$  0,04 chez les vaches jusqu'à 5 lactations et 10,07  $\pm$  0,04 pour les vaches à 6 lactations et plus ;  $p < 0,001$ ). La différence que nous observons ici entre les génisses et les vaches, de l'ordre de 3 structures par collecte, est comparable à celle observée dans les autres études. De plus, comme pour DONALDSON (1984c) et HASLER et al (1983), la production commence à diminuer à partir de la 6<sup>ème</sup> lactation (vaches âgées d'environ 9 ans). Par contre, dans notre étude, l'effet de la parité sur la production d'embryons viables n'a été mis en évidence que dans l'analyse de l'échantillon vaches et pas sur l'analyse de l'échantillon total (vaches et génisses).

Deux hypothèses peuvent expliquer la diminution de la production d'embryons lorsque la parité et l'âge augmentent. L'importance du pool de follicules primordiaux influence le nombre de follicules qui le quitte chaque jour. Or, la diminution du stock de réserves avec l'âge est concomitante à la baisse du nombre de follicules entamant chaque jour leur croissance (DRION et al, 1996). La diminution du stock de follicules susceptibles de répondre à un traitement de stimulation ovarienne pourrait donc expliquer la diminution de la production d'embryons constatée quand augmentent l'âge et la parité, mais cette hypothèse est très peu probable. L'autre hypothèse prend en compte les corrélations entre les variables âge, parité et rang de traitement intralactation (tableau 31) : le rang de traitement intralactation augmente avec l'âge et la parité. Or la répétition des traitements par la PMSG est à l'origine d'une production d'anticorps anti-PMSG par les animaux traités (DRION et al, 2001). Ce phénomène d'auto-immunisation n'est pas encore démontré pour les traitements par la FSH mais il est suspecté depuis longtemps (DONALDSON et PERRY, 1983 ; NIBART, 1991) ; il pourrait être à l'origine de la diminution de la production d'embryons constatée quand augmentent l'âge et le rang de traitement intralactation.

**Tableau 48 : Production d'embryons – Résultats Nationaux (1989-2000) et de Charolais Embryons (1989-1999)**

Tableau établi d'après les résultats de Charolais Embryons (J. Manière, communication personnelle) et des données annuelles fournies par l'Association Européenne de Transfert Embryonnaire (Proceedings des meetings de l'A.E.T.E. de 1990 à 2001)

Année		1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Nombre de donneuses traitées	Résultats Nationaux	7598	8756	8630	7316	6033	6314	7139	/	/	/	/	/
	Charolais Embryons	130	167	102	51	44	73	77	62	72	81	69	/
Nombre de donneuses collectées	Résultats Nationaux	7022	8034	7896	6679	5496	5890	6680	6657	/	6675	7331	6716
	Charolais Embryons	120	156	96	47	41	72	69	57	69	81	66	/
Taux de collecte après traitement (%)	Résultats Nationaux	92,4	91,8	91,5	91,0	91,1	93,3	94,0	/	/	/	/	/
	Charolais Embryons	92,3	93,4	94,1	92,2	93,2	98,6	89,6	91,9	95,8	100	95,6	/
Nombre moyen de structures par collecte	Résultats Nationaux	8,4	8,6	8,0	8,5	9,2	9,4	9,0	8,5	/	9,6	9,3	9,3
	Charolais Embryons	10,9	12,0	11,5	13,6	13,4	11,9	13,8	10,2	12,6	13,6	13,0	/
Nombre moyen d'embryons transférables par collecte	Résultats Nationaux	4,9	5,0	4,5	4,5	4,7	4,9	4,6	4,9	/	5,5	5,5	5,4
	Charolais Embryons	6,5	6,5	4,9	6,8	7,8	7,2	7,7	6,5	6,9	7,5	6,5	/
Taux d'embryons transférables par collecte (%)	Résultats Nationaux	57,0	58,0	56,0	53,0	51,4	52,7	54,0	57,0	/	57,0	58,0	58,0
	Charolais Embryons	59,4	54,4	42,7	52,0	66,9	60,1	56,3	64,0	55,2	56,0	53,4	/

## **b – Le rang de traitement intralactation**

Dans notre étude, l'augmentation du rang de traitement intralactation a influencé les résultats (à la fois sur l'échantillon total et sur l'échantillon des vaches) : une diminution du nombre de structures par collecte et du nombre d'embryons viables par collecte est observée quand augmente le rang de traitement intralactation (respectivement  $10,60 \pm 0,04$  et  $5,16 \pm 0,05$  *versus*  $9,48 \pm 0,04$  et  $4,24 \pm 0,06$  *versus*  $8,57 \pm 0,06$  et  $3,54 \pm 0,07$  pour les rangs de traitement 1 *versus* 2 et 3 *versus* supérieur à 3).

Cet effet du rang de traitement est comparable, en terme d'embryons viables, à celui déjà observé par DE RUIGH et al (1995) et par GOVIGNON et al (2000) ; cependant, pour ces derniers, la diminution du nombre d'embryons viables par collecte n'était pas associée à une diminution du nombre de structures par collecte mais à une augmentation du nombre d'ovocytes non fécondés.

## **c – L'intervalle vêlage-traitement de superovulation**

L'intervalle moyen vêlage-traitement pour le premier traitement de chaque donneuse est très long ( $335,3 \pm 296,0$  jours). Pour 59,4 % de ces animaux, l'intervalle vêlage-traitement est supérieur à 240 jours. La présence dans l'échantillon de donneuses permanentes, sans impératif de production de veaux, explique en partie la valeur moyenne élevée de cet intervalle.

L'intervalle vêlage-traitement divisé en 4 classes (tableau 44) influence de façon significative ( $p < 0,001$ ) le nombre total de structures par collecte. L'effet de cet intervalle sur le nombre d'embryons viables par collecte n'a été retrouvé que lorsque l'intervalle est divisé en 2 classes (tableau 46) ; il est moins prononcé que sur le nombre total de structures par collecte ( $p = 0,0785$ ). L'augmentation de l'intervalle vêlage-traitement a donc un effet négatif sur le nombre total de structures par collecte et sur le nombre d'embryons viables par collecte. Cet effet est très lié au rang de traitement intralactation dans notre échantillon ( $r = 0,68$  ;  $p = 0,0001$ ).

L'effet significatif observé sur le nombre de structures par collecte et la tendance sur le nombre d'embryons viables par collecte pourraient être liés à l'état d'engraissement de ces femelles qui ne sont plus en lactation. En effet, FRERET et al (2000) citent des effets négatifs d'un état corporel trop élevé sur la qualité des embryons.

## **d – L'année et la saison**

Le nombre de structures par collecte a varié entre  $7,17 \pm 0,07$  et  $11,07 \pm 0,09$  selon l'année de collecte. Par contre, l'année n'a pas influencé le nombre d'embryons viables par collecte.

Les donneuses traitées entre mai et novembre ont eu tendance à produire moins d'embryons viables que celles traitées entre décembre et avril (respectivement  $4,41 \pm 0,06$  *versus*  $5,15 \pm 0,06$  ;  $p = 0,09$ ). Par contre, la saison n'a pas influencé le nombre total de structure par collecte.

Des résultats contradictoires existent sur l'effet de la saison sur la production d'embryons. HUPKA et al (2000) n'ont pas mis en évidence d'effet significatif de la saison sur la production d'embryons. Par contre, pour HARVENGT et al (1998), le mois influence seulement le nombre d'embryons viables par collecte. Ainsi, comme dans notre étude, il semblerait que ce soit la qualité des embryons qui soit influencée par la saison ; les variations dans le régime alimentaire (fourrage sec / fourrage vert) pourraient expliquer en partie cette observation.

#### **4 – Variables sans influence significative sur la production d'embryons**

La variable *donneuse jumelle* à la naissance n'a pas eu d'influence sur la production d'embryons. Cependant, l'effectif de donneuses jumelles dans notre étude (6 vaches sur 332) est faible, limitant la puissance de l'analyse statistique.

Le niveau génétique des animaux de l'échantillon, estimé par les index génotypiques n'a pas influencé de façon significative la production d'embryons, de même que les pointages adultes et les qualifications de la donneuse et de son ascendance.

## **CONCLUSION**

La production d'embryons par des donneuses de race Charolaise est élevée. La variabilité de la réponse à un traitement de superovulation est du même ordre de grandeur que celle observée dans les races laitières. Les facteurs de variation de la production d'embryons déjà identifiés dans les races laitières (âge, parité, rang de traitement) sont confirmés dans cet échantillon. L'intervalle vêlage–traitement observé dans notre étude est, en moyenne, particulièrement long par rapport à celui généralement décrit ; l'augmentation de cet intervalle au-delà de 380 jours est préjudiciable à une production optimale d'embryons. Enfin, les effets observés sur le nombre de structures collectées ne se retrouvent pas tous sur le nombre d'embryons viables collectés. Les facteurs influençant ces deux paramètres semblent donc différents. Cette étude a fait l'objet de deux publications (MANIERE, 2001 ; LAURIERE et al, 2001 ; annexe 3).

La variabilité de la réponse aux traitements de superovulation reste l'inconvénient majeur de la production d'embryons *in vivo*. Cette variabilité est due à la non maîtrise des résultats de superovulation, malgré les essais de différentes hormones ou d'astuces thérapeutiques. La ponction folliculaire échoguidée (collecte des ovocytes dans les follicules afin de produire des embryons *in vitro*) peut se faire sans mettre en œuvre un traitement de superovulation. Pour l'instant, cette technique connaît un développement limité. En effet, il est impossible de congeler les ovocytes ponctionnés ; ils doivent donc être acheminés le plus rapidement possible dans un laboratoire de fécondation *in vitro*. De plus, les embryons produits *in vitro* transférés après congélation ne donnent pas des taux de gestation satisfaisants. Enfin, cette technique nécessite un équipement lourd, et en particulier un laboratoire de fécondation *in vitro*. La ponction folliculaire est donc réservée, pour l'instant, aux femelles d'élite des noyaux de sélection et n'est pas encore adaptée à l'utilisation par un vétérinaire dans le cadre de son exercice habituel.



## **BIBLIOGRAPHIE**

ALBERIO R., CABODEVILA J., IOVANNITTI B., TOQUATI S. – 1994 – Superovulation performed on cyclic cows during progesterone treatment. – *In : Proceedings 10<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 9-10 septembre 1994* : 142.

ALFURAJI M.M., ATKINSON T., BROADBENT P.J., HUTCHINSON J.S.M. – 1993 – Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. – *Anim.Reprod.Sci.*, 33 : 99-109.

ALMEIDA A.P. – 1987 – Superovulation in cattle : a combined treatment using Synchronate B with either PMSG or FSH. – *Theriogenology*, 27 : 329-335.

AURICH CHR., HAHN J. – 1993 – Male effects on in vivo and in vitro production of bovine embryos. – *In : Proceedings 9<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 10-11 septembre 1993* : 117-124.

BENYEI B. – 1997 – Superovulation reponse of Holstein-Frisian cattle – born and grown up in mid-Europe – in tropical environment. – *In : Proceedings 13<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 12-13 septembre 1997* : 130.

BERGFELT D.R., BO G.A., MAPLETOFT R.J., ADAMS G.P. – 1997 – Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. – *Anim.Reprod.Sci.*, 49 : 1-12.

BO G.A., PIERSON R.A., MAPLETOFT R.J. – 1991 – The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. – *Theriogenology*, 36 : 169-183.

BO G.A., HOCKLEY D.K., NASSER L.F., MAPLETOFT R.J. – 1994 – Superovulatory reponse to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. – *Theriogenology*, 42 : 963-975.

BO G.A., ADAMS G.P., CACCIA M., MARTINEZ M., PIERSON R.A., MAPLETOFT R.J. – 1995 – Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. – *Anim.Reprod.Sci.*, 39 : 193-204.

BOLAND M.P., GOULDING D., ROCHE J.F. – 1991 – Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. – *Theriogenology*, 35 : 5-17.

BREUEL K.F., BAKER R.D., BUTCHER R.L., TOWNSEND E.C., INSKEEP E.K., DAILEY R.A., LERNER S.P. – 1991 – Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory reponse of beef cows. – *Theriogenology*, 36 : 241-255.

BUNGARTZ L., NIEMANN H. – 1994 – Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy suitable for superovulation by a single ultrasound examination. – *J.Reprod.Fert.*, 101 : 583-591.

CABODEVILA J., ALBERIO R., IOVANNITTI B., PALMA G. – 1994 – Superovulatory treatment in anestrus postpartum multiparous beef cows. – *In : Proceedings 10<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 9-10 septembre 1994* : 162.

DARROW M.D., LINDNER G.M., GOEMANN G.G. – 1982 – Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows. – *Theriogenology*, 17 : 84.

DE RUIGH L., PEARSON R.E., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW J.A.M. – 1995 – Are “permanent donor cows” permanent donor cows ? – *In : Proceedings 11<sup>th</sup> AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995* : 158.

DE RUIGH L., MULLAART E. – 1999 – Removal of dominant follicle of heifers prior to superovulation. – *In : Proceedings 15<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 10-11 septembre 1999* : 226.

DETTERER J., SCHMIDT T., HARLIZIUS B. – 1997 – Factors influencing the variability in superovulation results in German Holstein cattle. – *Theriogenology*, 47 : 169.

DONALDSON L.E. – 1984a – Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. – *Theriogenology*, 21 : 1013-1018.

DONALDSON L.E. – 1984b – The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. – *Theriogenology*, 22 : 97-99.

DONALDSON L.E. – 1984c – Effect of age of donor on embryo production. – *Theriogenology*, 21 : 963-967.

DONALDSON L.E. – 1990 – 3 x 1 superovulation in cattle. – *In : Proceedings 6<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 7-8 septembre 1990* : 136.

DONALDSON L.E., PERRY B. – 1983 – Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. – *Theriogenology*, 20 : 163-168.

DOVGOPOL V., OSTASHKO F., ISSACHENKO V. – 1995 – Preparation “prolongone” for superovulation in cows by embryo transfer. – *In : Proceedings 11<sup>th</sup> AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995* : 166.

DRION P.V., BECKERS J.F., ECTORS F.J., HANZEN C., HOUTAIN J.Y., LONERGAN P. – 1996 – Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atrophie. *Point Vét.*, 28 : 881-891.

DRION P.V., DE ROOVER R., HOUTAIN J.Y., McNAMARA E.M., REMY B., SULON J., BECKERS J.F. – 2001 – Increase of plasma eCG binding rates after administration of repeated high dose of eCG to cows. – *Reprod.Nutr.Dev.*, 41(3) : 207-215

DUCROT C. – 1992 – Vêlage et infécondité des vaches allaitantes. *In : Les rendez-vous de l'écopathologie*, Villeurbanne : Centre d'Ecopathologie Animale, 40p.

DUFFY P., BAGUISI A., DOBRINSKY J.R., OVERSTROM F.W., ROCHE J.F., BOLAND M.P. – 1994 – Effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on superovulation in heifers not detected in oestrus prior to FSH. – *In : Proceedings 10<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 9-10 septembre 1994* : 164.

- DUFOUR R., CHOUVET C., ECTORS F., FRANK M., MASSIP A., PARISOT P., ROULET C., BECKERS J.F. – 1990 – La superovulation chez les bovins par l'emploi de Stimufol. Caractéristiques principales du produit et résultats des essais. – *In : Proceedings 6<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 7-8 septembre 1990* : 140.
- EDE P., FLORIN B., KHODJA S., PONSART C., HUMBLLOT P. – 1999 – Effect of the puncture of the largest follicle on embryo yield after superovulation in dairy cattle. – *In : Proceedings 9<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 10-11 septembre 1999* : 148.
- FRERET S., GRIMARD B., PONTER A., HUMBLLOT P. – 2000 – Variation du niveau d'apport nutritionnel et production d'ovocytes et d'embryons chez les ruminants: étude bibliographique. – *El&Ins.*, 297 : 3-25.
- FREYTAG A., LANGE H., GEHRMEYER D., JONGELING C. – 1995 – Effect of temperature, atmospheric pressure and relative humidity on the response of superovulation in cattle. – *In : Proceedings 11<sup>th</sup> AETE meeting, Hannover, 8-9 september 1995* : 170.
- GINTHER O.J., KASTELIC J.P., KNOPF L. – 1989 – Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. – *Anim.Reprod.Sci.*, 20 : 187-200.
- GONG J.G., BRAMLEY T., WEBB R. – 1991 – The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers : follicular populations and peripheral hormones. – *Biol.Reprod.*, 45 : 941-949.
- GONG J.G., BRAMLEY T.A., WEBB R. – 1993 – The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J.Reprod.Fert.*, 97 : 247-254.
- GOULDING D., WILLIAMS D.H., DUFFY P., BOLAND M.P., ROCHE J.F. – 1990 – Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. – *Theriogenology*, 34 : 767-778.
- GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P. – 1991 – Superovulation in heifers using either PMSG or FSH during the mid-luteal stage of the estrus cycle. – *Theriogenology*, 36: 949-958.
- GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P. – 1994 – Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen. *J.Reprod.Fert.*, 100 : 505-510.
- GOULDING D., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F., BOLAND M.P. – 1996 – Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. – *Theriogenology*, 45 : 765-776.
- GOVIGNON A., ROHOU A., PONSARD C., DELCROIX P., HUMBLLOT P. – 2000 – Sources of variation of embryo production after superovulation in Prim Holstein dairy cows. – *In : Proceedings 16<sup>th</sup> AETE meeting, Santander, 08-09 septembre 2000* : 158.
- GRASSO F., GUILBAULT L.A., ROY G.L., MATTON P., LUSSIER J.G. – 1989a – The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulation treatment on superovulatory responses in cattle. – *Theriogenology*, 31 : 199.

GRASSO F., GUILBAULT L.A., ROY G.L., LUSSIER J.G. – 1989b – Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. – *Theriogenology*, 31 : 1209-1220.

GUERIN B. – 2001 – Embryo Transfer Activity in 2000 : France – *In : Proceedings 17<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 07-08 Septembre 2001* : 33.

GUILBAULT L.A., GRASSO F., LUSSIER J.G., ROUILLIER P., MATTON P. – 1991 – Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. – *J.Reprod.Fert.*, 91 : 81-89.

HARVENGT A., CHAPAUX P., SPRONCK C., HANZEN C., MICHAUX C. – 1998 – Analyse de facteurs d'environnement influençant la récolte d'embryons. – *In : Renc.Rech.Rum.*, 5 : 87.

HASLER J.F., BROOKE G.P., McCAULEY A.D. – 1981 – The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. – *Theriogenology*, 15 : 109.

HASLER J.F., McCAULEY A.D., SCERMERHORN E.C., FOOTE R.H. – 1983 – Superovulatory responses of Holstein cows. – *Theriogenology*, 19 : 83-99.

HERRLER A., FARRIES E., NIEMANN H. – 1990 – A trial to stimulate insulin like growth factor I levels to improve superovulatory response in dairy cows. – *Theriogenology*, 33 : 248.

HILL B.R., KUEHNER L.F. – 1996 – Follicle aspiration prior to superovulation in cattle : a field study. – *Theriogenology*, 45 : 324.

HOCKLEY D.K., BO G.A., PALASZ A.T., DEL CAMPO M.R., MAPLETOFT R.J. – 1992 – Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin-V in the cow : effect of dose and site of injection. – *Theriogenology*, 37 : 224.

HUHTINEN M., RAINIO V., AALTO J., BREDBACKA P., MAKI-TANIILA A. – 1992 – Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. – *Theriogenology*, 37 : 457- 463.

HUMBLOT P., RODRIGUES J.L., NIBART M., SILVESTRINI TIEZZI F.L., JEANGUYOT N., THIBIER M. – 1994 – Effet du mode de synchronisation des cycles sexuels sur la réponse hypophysaire et la fonction ovarienne après superovulation chez la vache. – *El.&Ins.*, 261 : 7-18.

HUPKA S., MEINECKE-TILLMANN S., DETTERER J., MEINECKE B. – 2000 – Variables influencing embryo collection results in superovulated German Holstein cattle. – *In : Proceedings 16<sup>th</sup> AETE meeting, Santander, 08-09 septembre 2000* : 166.

INSTITUT DE L'ELEVAGE – 1998 – CR n°2850, Institut de l'élevage Ed., 79p.

JAKOB CH., BUCHER P., BINDER H., DOBELI M., RUSCH P. – 1996 – Effects of follicular ponction with ovum pick up on the superovulatory response in cows. – *In : Proceedings 12<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 13-14 septembre 1996* : 144.

KAFI M., McGOUWAN M.R., KIRKLAND P.D., JILLELLA D. – 1997 – The effect of bovine pestivirus infection on the superovulatory response of Friesian heifers. – *Theriogenology*, 48:985-996.

KO J.C.H., KASTELIC J.P., DEL CAMPO M.R. – 1991 – Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers. *J.Reprod.Fert.*, 91 : 511-519.

LACAZE S., COUPET H., BLATTES M., GARREAU S., HENNEQUIN M. – 1991 – Influence du nombre d'inséminations artificielles sur le pourcentage d'embryons utilisables après traitement de superovulation. – In : *Proceedings 7<sup>th</sup> AETE meeting, Cambridge, 14-15 septembre 1994* : 156.

LAURIERE P., MANIERE J., CHASTANT S., GRIMARD B. – 2001 – Facteurs de variation de la production d'embryons chez les vaches Charolaises superovulées en région Bourgogne. – *Renc.Rech.Rum.*, 8 : 361-364.

LINSELL C.E., MURPHY B.D., MAPLETOFT R.J. – 1986 – Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. – *Theriogenology*, 26 : 209-219.

LOONEY C.R., BOUTTE B.W., ARCHBALD L.F., GODKE R.A. – 1981 – Comparaison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. – *Theriogenology*, 15: 13-22

LUCAS-HAHN A., NIEMANN H. – 1991 – Aspects of bovine embryo production in vivo and in vitro. - In : *Proceedings 7<sup>th</sup> AETE meeting, Cambridge, 14-15 septembre 1991* : 63-75.

LUSSIER J.G., CARRUTHERS T.D. – 1989 – Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovine follicular fluid. – *Theriogenology*, 31 : 779-794.

MAPLETOFT R.J., NASSER L.S., BO G.A., DEL CAMPO M.R. – 1992 – The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. In : *Proceedings 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, The Hague, 1992* : 1 : 237-239.

MANCIAUX L., NIBART M., HUMBLLOT P. – 1997 – Effect of AI sire on embryo production in the Montbeliard breed. – In : *Proceedings 13<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 12-13 septembre 1997* : 174.

MANCIAUX L., PONSARD C., GRISOUARD D., HUMBLLOT P. – 1999 – Paternal influence on embryo yield following superovulation in the Montbeliard breed. – In : *Proceedings 15<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 10-11 septembre 1999* : 200.

MANCIAUX L., PONSARD C., GRISOUARD D., HUMBLLOT P. – 2000 – Sources of variation in embryo production following superovulation in the Montbeliard breed. – *Theriogenology*, 53 : 502.

MANIERE J. – 2001 – Les Charolaises sont de bonnes donneuses d'embryons. – *La Semaine Vétérinaire*, 1037 : 28.

MARIANA J.C., GIRARD P., CHUPIN D. – 1977 – Différences intraraces de réponse ovarienne à un traitement de superovulation par PMSG chez des vaches de race charolaise. Fréquence des naissances gémellaires. – *Ann. Zootech.*, 26 (3) : 345-353.

MENARD D.P., MARTINEZ D. – 1997 – We can identify our better donor cows by collecting them as heifers. – *In : Proceedings 13<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 12-13 septembre 1997* : 178.

MONGET P. – 1993 – Importance des facteurs paracrines dans l'ovaire. - *In : Proceedings 9<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 10-11 septembre 1993* : 75-85.

MONNIAUX D., CHUPIN D., SAUMANDE J. – 1983 – Superovulatory responses of cattle. – *Theriogenology*, 19 : 55-81.

NIBART M. – 1991 – Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées : bissection et sexage. – *Rec.Méd.Vét.*, 167 (3/4) : 261-290.

NIBART M. – 1992 – Compte-rendu du 12<sup>ème</sup> congrès ICAR, La Haye, 23-27 août 1992. – *El.&Ins.*, 255 : 19-23.

PEREZ O., BOEDIONO A., FERGUSON E., AIRHART C., RICHARD R., GODKE R. – 2001 – Oocyte and embryo production from FSH-treated postpartum beef cows shortly after calving. – *Theriogenology*, 55 : 516.

PONSART C. – 2000 – Evolution de l'activité de transfert embryonnaire et d'Ovum Pick Up en France et en Europe depuis 1995. – *El&Ins.*, 298 : 18-25.

PONSART C., GOVIGNON A., ROHOU A., MANCIAUX L., DELCROIX P., GRISOUARD D., HUMBLLOT P. – 2001 – Effects of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the Prim'Holstein and Montbeliarde breeds. *Theriogenology*, 55 : 369.

RAJAMAHENDRAN R., CANSECO R.S., DENBOW C.J. – 1987 – Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in holstein cows. – *Theriogenology*, 28 : 59-65.

RIEGER D., DESAULNIER D., GOFF A.K. – 1988 – Ovulatory response and embryo yield in superovulated holstein heifers given a priming dose of FSH-P at day 2 of the estrous cycle. – *Theriogenology*, 30 : 695-699.

RIEGER D., WALTON J.S., GOODWIN M.L., JOHNSON W.H. – 1991 – The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated holstein heifers. – *Theriogenology*, 35 : 863-868.

ROBERTSON I., NELSON R.E. – 1998 – Certification and identification of the embryo. – *In: Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3<sup>rd</sup> ed., Savoy : I.E.T.S., 103-134.

ROCHE J.F., BOLAND M.P. – 1991 – Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. – *Theriogenology*, 35 : 81-90.

ROY F., MAUREL M.C., COMBES B., VAIMAN D., CRIBIU E.P., LANTIER I. et al. – 1999 – The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. – *Biol.Reprod.*, 60 : 805-813.

SAS Institute Inc. – 1996 – *SAS/STAT User's guide, changes and enhancements through release 6.11*. – Cary, NC : SAS Institute Inc., 1044p.

SATOH H., NUMABE T., TAKADA T., OIKAWA T., KIFUNE A., WATANABE G., TAYA K. – 1996 – Superovulation in Japanese beef cows using polyvinylpyrrolidone as the vehicle for porcine FSH. – *Theriogenology*, 45 : 332.

SAUMANDE J. – 1995 – La production d'embryons chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? – *INRA Prod.Anim.*, 8 (4) : 275-283.

SAUMANDE J., PROCUREUR R., CHUPIN D. – 1984 – Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. – *Theriogenology*, 21 : 727-731.

SERRE M. – 1999 – *Intérêt de la transplantation embryonnaire en race bovine Charolaise*. Thèse Méd.Vét., Lyon, n°23, 69p.

SHARPIN R.K.C., GREANEY K.B., ROGERSON A.R. – 2000 – Application of Ovagen in superovulation of dairy and beef cows in USA. – *In : Proceedings 16<sup>th</sup> AETE meeting, Santander, 08-09 septembre 2000* : 208.

SHAW D.W., GOOD T.E. – 2000 – Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. – *Theriogenology*, 53 : 1521-1528.

SLIMANE W., NIBART M., THUARD J.M., KEITA J.B., HUMBLLOT P. – 1995 – Effect of controlling the moment of AI with a field LH kit on the number and quality of embryos collected from superovulated cows. – *In : Proceedings 11<sup>th</sup> AETE meeting, Hannover, 8-9 septembre 1995*: 240.

TOUATI K., BECKERS J.F., ECTORS F. – 1991 – Hormonal control of folliculogenesis in the bovine : better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment. – *Theriogenology*, 35 : 285.

WEBB R., GONG J.G., LAW A.S. – 1992 – Control of ovarian function in cattle. *J.Reprod.Fert.*,45 : 141-156.

YAAKUB H., O'CALLAGHAN D., DUFFY P., ROCHE J.F., BOLAND M.P. – 1996 – Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to treatment with gonadotrophin on superovulation, embryo yield and quality in beef heifers. - *In : Proceedings 12<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 13-14 septembre 1996* : 214.

YAMAMOTO M., OOE M., KAWAGUCHI M., SUZUKI T. – 1994 – Superovulation in the cow with a single injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. – *Theriogenology*, 41 : 747-755.



## **ANNEXES**



## ANNEXE 1

### EVALUATION DES INDIVIDUS (d'après le Herd Book Charolais)

#### EVALUATION DES JEUNES FEMELLES

Dénomination	Base de référence	Croissance 0 – 210 jours	Conformation individuelle	
			DM	DS
Reproductrice Jeune RJ	Contemporains de l'élevage	% élevage > 98	> 62	> 63

#### EVALUATION DES VACHES JEUNES REPRODUCTRICES RECONNUES (NIVEAU 1 ET 2)

Dénomination	Productivité	Aptitude à l'allaitement (valeur laitière et croissance veaux (kg))	Conformation individuelle adulte (valeurs corrigées)		Conformation descendance (index valeur maternelle)	
			DM (pts)	DS (pts)	DM (pts)	DS (pts)
RR1E	3 ou 4 veaux	≥ 0	≥ 60	≥ 65	≥ 0	≥ 0
RR1V	3 ou 4 veaux	≥ 0	≥ 70	≥ 65	≥ 1,5	
RR2E	3 ou 4 veaux	≥ 1,5	≥ 60	≥ 70	≥ 0	≥ 0,45
RR2V	3 ou 4 veaux	≥ 1,5	≥ 70	≥ 65	≥ 1,5	

#### EVALUATION DES VACHES ADULTES REPRODUCTRICES RECOMMANDEES (NIVEAU 3 ET 4)

Dénomination	Productivité	Aptitude à l'allaitement (valeur laitière et croissance veaux (kg))	Conformation individuelle adulte (valeurs corrigées)		Conformation descendance (index valeur maternelle)	
			DM (pts)	DS (pts)	DM (pts)	DS (pts)
RR3E	5 veaux ou +	≥ 0	≥ 60	≥ 65	≥ 0	≥ 0
RR3V	5 veaux ou +	≥ 0	≥ 70	≥ 65	≥ 1,5	
RR4E	5 veaux ou +	≥ 1,5	≥ 60	≥ 70	≥ 0	≥ 0,45
RR4V	5 veaux ou +	≥ 1,5	≥ 70	≥ 65	≥ 1,5	
RR4S	5 veaux ou +	≥ 3	≥ 70	≥ 70	≥ 0	≥ 0,85

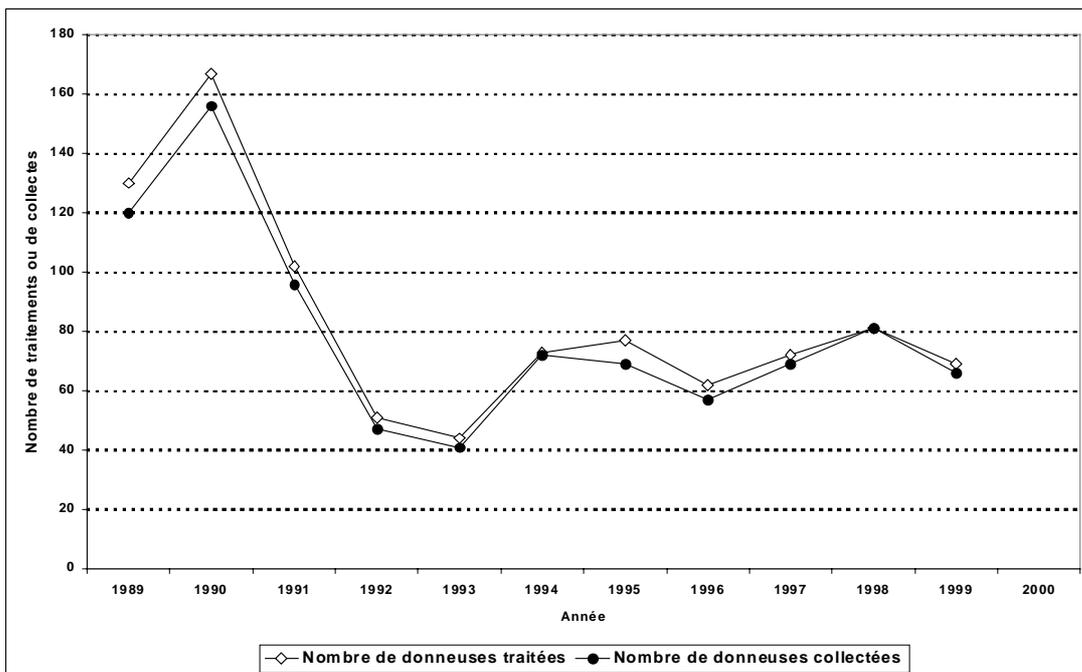


## ANNEXE 2

**Figure 12 : Evolution de l'activité de collecte d'embryons en France – Résultats nationaux (d'après l'A.E.T.E., 1989-2000)**



**Figure 13 : Evolution de l'activité de collecte d'embryons de Charolais Embryons (1989-1999)**





**ANNEXE 3**

**PUBLICATIONS**

Rapport-Gratuit.com



## ETUDE DES FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ LA VACHE CHAROLAISE EN CLIENTELE

**LAURIERE Pierre, Olivier**

**RESUME** : L'objectif de l'étude était d'identifier les facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache de race Charolaise. Dans le département de la Nièvre et ses départements limitrophes, 927 traitements de superovulation ont été réalisés entre le 09/01/89 et le 20/12/99 sur 83 génisses et 249 vaches (résultats Charolais Embryons). Suite à ces traitements, 873 collectes ont été réalisées, soit un taux de collecte de 94,2%. Les effets de l'âge de la donneuse, de son rang de lactation, du niveau génétique de l'animal (estimé par les index IBOVAL), de l'année et de la saison de collecte et du rang de traitement intralactation ont été testés sur les variables réponse nombre de structures par collecte et nombre d'embryons transférables par collecte. Sur le sous-échantillon des vaches (245 animaux et 751 collectes), les effets des difficultés de vêlage et de l'intervalle vêlage-traitement ont été testés. Les analyses statistiques ont été réalisées par analyse de la variance en utilisant des modèles multivariés et en introduisant un effet aléatoire de la vache pour tenir compte de la répétition des observations pour un même animal. Les rendements ont été supérieurs aux moyennes nationales (établies principalement à partir de vaches laitières). Le nombre de structures par collecte a été de  $12,2 \pm 7,7$ . Il a été plus faible chez les génisses que chez les vaches ( $p < 0,001$ ), a diminué avec le rang de traitement intralactation ( $p < 0,001$ ) et a été influencé par l'année de collecte ( $p < 0,05$ ). Sur le sous-ensemble des vaches, les effets de la parité et du rang de traitement intralactation ont été retrouvés. Le nombre de structures par collecte a diminué avec l'augmentation de l'intervalle vêlage-traitement ( $p < 0,001$ ) mais cet effet n'est important que lorsque l'intervalle dépasse 380 jours. Le nombre d'embryons viables par collecte a été de  $6,7 \pm 5,8$ . Il a diminué avec l'augmentation du rang de traitement intralactation ( $p < 0,05$ ). Une tendance a été observée pour l'effet de la saison de collecte (plus d'embryons viables entre décembre et avril qu'entre mai et novembre ;  $p = 0,09$ ). Sur le sous-échantillon des vaches, le nombre d'embryons viables par collecte a eu tendance à être plus faible pour les intervalles vêlage-traitement supérieurs à 380 jours que pour les intervalles inférieurs ( $p = 0,07$ ). Le niveau génétique et les conditions de vêlage n'ont pas influencé les variables réponse. En conclusion, la production d'embryons a été élevée mais très variable dans cet échantillon. Les facteurs de variation identifiés sont similaires à ceux retrouvés chez la vache laitière. La grande variabilité des résultats reste un des inconvénients majeurs de la production d'embryons *in vivo*.

**Mots-Clés** : bovin allaitant, Charolais, superovulation, embryon, transplantation embryonnaire

### **JURY** :

Président :

Directeur : Madame CHASTANT-MAILLARD – Maître de Conférences à l'E.N.V.A.

Assesseur : Madame GRIMARD-BALLIF – Maître de Conférences à l'E.N.V.A.

### **Adresse de l'auteur** :

Lagut, 24 400 Saint-Front-de-Pradoux

## **STUDY OF VARIATION FACTORS OF EMBRYO PRODUCTION IN CHAROLAIS BEEF COWS IN VETERINARY PRACTICE.**

**LAURIERE Pierre, Olivier**

**SUMMARY** : The aim of this study was to identify variation factors of embryo production in the Charolais breed. In the county of Burgundy, 83 Charolais heifers and 249 Charolais cows were superovulated (n=927 treatments) between the 9<sup>th</sup> January, 1989 and the 20<sup>th</sup> December, 1999. Embryos were recovered from 873 females (873/927 = 94,2 %). The effect of age of donor, parity, genetic merit, season of embryo collection, rank of treatment during lactation were tested on the total number of embryos/ova recovered (TER) and on the number of good quality embryos recovered (GER) using multivariate models of analysis of variance including a random effect of the female to take into account multiple collection on the same cow. Additionally, the effect of calving conditions and of calving-to-embryo-collection interval were tested using the same models in a sub-sample of cows. Yields were superior to national results (which are mainly established with dairy cows). The TER was  $12,2 \pm 7,7$ . It was lower for heifers than for cows ( $p < 0,001$ ), decreased with rank of collection ( $p < 0,001$ ) and was influenced by the year of collection ( $p < 0,05$ ). The same effects were observed in cows (n=249 cows and 751 embryo collections). In this sample, the TER decreased with calving-to-collection interval ( $p < 0,001$ ), however this effect was only significant when the interval was higher than 380 days. The GER was  $6,7 \pm 5,8$  and was only significantly influenced by the rank of treatment ( $p < 0,05$ ). A trend was observed for a season effect (higher GER between December and April than between May and November,  $p = 0,09$ ). In the sample of cows, a trend for a calving-to-collection interval effect was observed on GER (higher GER for intervals inferior to 380 days than for intervals superior to 380 days,  $p = 0,07$ ). Genetic merit and calving conditions did not influence TER or GER in this sample. In conclusion, embryo production was high but highly variable in Charolais females. Identified variation factors in this study are the same as those identified for dairy cows. The important variability of results remain a major disadvantage of *in vivo* embryo production.

**KEY WORDS** : beef cow, Charolais cattle, superovulation, embryo, embryo transfer

**JURY** :

President :

Director : Mrs CHASTANT-MAILLARD

Assessor : Mrs GRIMARD-BALLIF

**Author's Address** : Lagut, 24 400 Saint-Front-de-Pradoux.