

TRANSFERT EMBRYONNAIRE EN RACE CHAROLAISE EN CLIENTELE : ETUDE DES FACTEURS DE REUSSITE LIES A LA RECEVEUSE ET A L'EMBRYON

Table des Matières.....	1
Liste des Tableaux.....	13
Liste des Figures.....	15
Abréviations.....	17
Introduction.....	19
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
I) Etude des facteurs de variation liés à l'embryon.....	23
 A. Facteurs liés aux caractéristiques de l'embryon.....	24
1. Stade embryonnaire	24
a) <i>Identification du stade</i>	24
b) <i>Influence du stade de développement sur la réussite du transfert.....</i>	25
2. Qualité des embryons.....	26
a) <i>Evaluation de la qualité des embryons</i>	26
b) <i>Influence de la qualité sur la réussite du transfert</i>	27
 B. Facteurs liés au mode de conservation de l'embryon.....	29
1. Le cryoprotecteur	30
a) <i>Utilisation du glycérol</i>	30
b) <i>Utilisation du DMSO</i>	33
c) <i>L'éthylène glycol.....</i>	34

i.	Choix du glycol.....	34
ii.	Concentration optimale en glycol	35
2.	Le mode de congélation.....	37
a)	<i>Le refroidissement progressif.</i>	37
b)	<i>La vitrification d'embryons bovins.</i>	39
i.	Choix des composants de la solution de vitrification	40
ii.	Temps d'équilibration.....	41
3.	Le mode de décongélation.	42
II)	Etude des facteurs de variation liés à la receveuse	44
B.	La sélection des animaux.....	46
1.	La race.....	46
2.	Les antécédents des animaux.....	46
3.	La parité	46
4.	L'état général des animaux.....	47
5.	L'examen de l'appareil génital.	48
6.	Aspect sanitaire.....	48
C.	Le regroupement des animaux et leur préparation.....	50
1.	La nutrition	50
a)	<i>L'apport énergétique.</i>	50
i.	avant le transfert.....	50
ii.	au moment du transfert	51
iii.	en fin de gestation	51
b)	<i>L'apport azoté.....</i>	52
c)	<i>L'apport de minéraux.</i>	52
d)	<i>Les apports en eau.....</i>	52
e)	<i>La régularité des apports.....</i>	53
2.	L'environnement.....	53
3.	Les critères de santé.....	53
4.	Le mode de synchronisation des chaleurs.....	54
a)	<i>Differentes techniques.....</i>	54
i.	Une double injection de prostaglandines.....	54
ii.	Utilisation des progestagènes.....	55
b)	<i>Influence du mode de synchronisation sur la réussite du transfert.</i>	57
c)	<i>Facteurs de réussite des traitements de synchronisation</i>	57
d)	<i>Amélioration des résultats</i>	58
i.	Par des traitements complémentaires.....	58

ii.	En améliorant la détection des chaleurs.....	58
D.	Facteurs liés à l'évaluation des receveuses au moment du transfert.	59
1.	L'échographie	59
2.	Le dosage de la progestérone.....	60
3.	La synchronisation entre l'embryon et la receveuse.....	62
4.	Traitement de la receveuse après transfert.....	64
a)	<i>Utilisation du GnRH</i>	64
b)	<i>utilisation de l'hCG</i>	65

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE RETROSPECTIVE 71

I)	Matériel et Méthodes.....	71
A.	Présentation de Charolais Embryons.	71
B.	Population d'étude.....	72
C.	Protocole d'étude	72
1.	Préparation des paillettes contenant les embryons.	72
a)	<i>Matériel nécessaire.....</i>	73
b)	<i>Méthode</i>	74
i.	Préparation pour transfert en frais	74
ii.	congélation dans de l'éthylène glycol.....	75
iii.	congélation dans du glycérol	76
2.	La décongélation des embryons.....	76
a)	<i>Cas des embryons congelés dans du glycérol.....</i>	76
i.	matériel nécessaire.....	77
ii.	technique de décongélation et de montage des paillettes de transfert.	78
a)	<i>Cas des embryons congelés dans de l'éthylène glycol.</i>	79
3.	La préparation des receveuses	79
4.	Réalisation du transfert.	80
B.	Données recueillies.....	80
1.	Par l'intermédiaire de l'éleveur	80
2.	Lors du transfert.....	80
3.	Après le transfert.....	81

C. Présentation des variables.....	81
1. Les variables concernant l'embryon	81
2. Les variables concernant la receveuse	83
3. Analyse statistique	87
a) <i>analyse univariée</i>	87
b) <i>analyse multivariée</i>	87
II) Résultats.....	88
A. Analyse univariée.....	88
1. Influence de l'embryon sur la réussite du transfert.....	88
a) <i>Influence de la qualité de l'embryon</i>	88
b) <i>Influence du stade de l'embryon</i>	89
c) <i>Influence du mode de conservation de l'embryon</i>	89
2. Influence de la receveuse sur la réussite du transfert.....	90
a) <i>Age de la receveuse</i>	90
b) <i>Parité de la receveuse</i>	91
c) <i>Mode de synchronisation des chaleurs</i>	91
d) <i>Qualité du corps jaune</i>	92
e) <i>Mois de transfert</i>	92
f) <i>Etat d'engraissement</i>	93
g) <i>Rang de transfert</i>	93
B. Analyse multivariée	94
III) Discussion.	95
A. Méthodologie.....	95
B. Résultats.....	96
1. Taux de gestation moyen.	96
2. Facteurs de variation du taux de gestation.....	96
a) <i>La qualité de l'embryon</i>	96
b) <i>Le mode de conservation de l'embryon</i>	97
c) <i>L'âge et la parité de la receveuse</i>	98
3. Variables sans influence mise en évidence sur la réussite du transfert.....	98

a) <i>Variables concernant l'embryon</i>	98
b) <i>Variables concernant la receveuse</i>	99
Conclusion	101
Bibliographie	101
Annexes	110
Annexe 1.....	113
Annexe 2.....	113
Annexe 3.....	116

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Taux de gestation et qualité d'embryons, d'après Hasler et al. (2001).	28
Tableau 2: Nombre d'embryons de chaque type transférés.....	81
Tableau 3: Nombre d'embryons de chaque qualité transférés.....	82
Tableau 6 : Méthode de synchronisation des chaleurs.	84
Tableau 7: Nombre de transferts par mois.....	85
Tableau 9: Parité des receveuses incluses dans l'étude.	86
Tableau 10: Age des receveuses incluses dans l'étude.....	86
Tableau 11: Rang de transfert des receveuses incluses dans l'étude.....	87
Tableau 12: Effet de la qualité de l'embryon sur le taux de gestation.....	88
Tableau 13: Effet du stade de l'embryon sur le taux de gestation.....	89
Tableau 14: Mode de conservation de l'embryon et taux de gestation.	89
Tableau 15 : Influence de l'âge de la receveuse (années) sur le taux de gestation.....	90
Tableau 16: Effet de la parité des receveuses sur le taux de gestation.	91
Tableau 17: Effet du mode de synchronisation des chaleurs sur le taux de gestation....	91
Tableau 18: Effet de la qualité du corps jaune sur le taux de gestation.....	92
Tableau 19: Effet du mois de transfert sur le taux de gestation.....	92
Tableau 20: Effet de la note d'état corporel sur le taux de gestation.....	93
Tableau 21: Effet du rang de transfert sur le taux de gestation.	93
Tableau 22 : Facteurs de variation du taux de gestation des receveuses d'embryons : analyse multivariée.	94

Liste des Figures

Figure 1 : Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant du glycérol.....	26
Figure 2 : Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant de l'éthylène glycol, d'après Voelkel et al. (1992a).....	30
Figure 3: Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, Contenant la solution VSED (d'après Ishimori et al., 1993).....	35
Figure 4 : Configuration d'une paillette pour un transfert direct.....	69

Abréviations

BLV : Bovine Leukemia Virus

bTP-1 : bovine Trophoblast Protein-1

BSA : Bovine Serum Albumin

BVD : Bovine Diarrhoea Virus

CJ : Corps Jaune

D.M.S.O.: Dimethylsulfoxide

E2 : concentration plasmatique en œstrogènes

EPSI : Endometrium Prostaglandin Synthetase Inhibitor

FSH : Folliculo Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

hCG : human Chorionic Gonadotropin

IBR : Infectious Bovine Rhinotracheitis

IA : insémination artificielle

I.E.T.S. : International Embryo Transfer Society

IM : Intra-Musculaire

IPI : Infecté Permanent Immunotolérant (s'applique au virus BVD)

LH : Luteinising Hormone

P₄ : concentration plasmatique en progestérone.

pH : potentiel Hydrogène

PBS : Phosphate Buffer Solution

PVP : polyvinylpyrrolidone

Introduction

Le transfert d'embryons est au point dans l'espèce bovine depuis un trentaine d'années. A cette époque, la récolte et le transfert des embryons collectés se faisaient par voie chirurgicale. Aujourd'hui, ces opérations ont lieu par voie transcervicale et plus de la moitié des embryons collectés est congelée pour un transfert ultérieur (Hasler, 2001).

Un transfert d'embryons consiste à prélever des embryons produits sur une vache donneuse et à les transférer chez des receveuses qui mèneront les gestations à leur terme. Les donneuses d'embryons subissent généralement un traitement de superovulation, ce qui permet d'obtenir de l'ovulation de plusieurs ovocytes simultanément. Une insémination artificielle est alors réalisée sur ces femelles et une semaine plus tard, la récolte d'embryons au stade morula ou blastocyste peut avoir lieu. Ces embryons sont ensuite soit réimplantés directement (transfert en frais) sur des receveuses dont le cycle sexuel a été synchronisé avec celui des donneuses, soit congelés dans de l'azote liquide pour une utilisation ultérieure.

Sur le plan de la sélection, l'intérêt de cette technique est de permettre la diffusion du progrès génétique par la voie femelle : l'insémination artificielle, mise au point bien antérieurement, a permis d'avoir un grand nombre de descendants du même mâle, mais on ne pouvait avoir plus d'un descendant d'une femelle par campagne de reproduction. C'est ce qu'a permis le transfert embryonnaire : augmenter par unité de temps le nombre de descendants d'une même femelle.

Pour l'éleveur, le transfert d'embryons présente plusieurs avantages : il peut à la fois accélérer le progrès génétique du troupeau et commercialiser les produits de ce progrès en conservant le potentiel génétique dans son élevage. L'éleveur peut par exemple vendre un animal femelle de haute valeur génétique tout en conservant son potentiel sous forme d'embryons congelés.

De telles opérations sont aujourd'hui couramment pratiquées. Il existe en France une trentaine d'équipes de transfert embryonnaire agréées. Au cours de l'année 2001, on a recensé dans notre pays près de 33000 embryons transférés après fécondation *in vivo* (Guérin, 2002), et la simplification des manipulations permet maintenant à des vétérinaires praticiens de pouvoir proposer à leurs clients cette nouvelle technique.

L'objectif de ce travail est d'étudier les facteurs qui influencent la réussite d'un transfert d'embryons chez la Charolaise en prenant le taux de gestation comme témoin de la réussite de cette opération. Une première partie bibliographique présente d'abord les facteurs de réussite liés à l'embryon lui-même, puis ceux liés à la receveuse de cet embryon. Dans une seconde partie, nous présenterons une étude rétrospective des résultats obtenus par un vétérinaire praticien en région Bourgogne sur 360 transferts d'embryons de race Charolaise.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

**FACTEURS DE REUSSITE DU
TRANSFERT EMBRYONNAIRE
CHEZ LES BOVINS**

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude a pour but de présenter, à la lumière de la bibliographie, les facteurs susceptibles d'influencer la réussite d'un transfert d'embryons chez les bovins. Nous présenterons d'abord les facteurs relatifs à l'embryon, puis ceux relatifs à la receveuse.

I) Etude des facteurs de variation liés à l'embryon.

La réussite d'un transfert est mesurée le plus souvent par le taux de gestation des receveuses. Ce taux est le plus souvent calculé à partir d'un diagnostic de gestation obtenu par palpation transrectale ou par échographie entre 30 et 40 jours après le transfert. On considérera qu'un transfert est réussi si le diagnostic de gestation est positif à ce stade, sans tenir compte d'un éventuel avortement tardif de la receveuse.

Nous avons vu que les embryons pouvaient être soit transférés en frais, soit congelés et conservés pour un transfert ultérieur. Ces opérations permettant la conservation de l'embryon sont à l'origine de défauts de développement de l'embryon après décongélation. Bracke et Niemann (1995) ont ainsi observé une différence significative entre le nombre de cellules de blastocystes frais et de blastocystes congelés et décongelés. On constate également une dégradation des taux de gestation après transfert d'embryons frais ou transfert d'embryons congelés : un transfert en frais donne en général un taux de gestation de l'ordre de 70 à 80%, alors que des embryons congelés ne permettent pas de dépasser un taux de 60 à 70%. Spell et al (2001) ont ainsi obtenu un taux de gestation de 82,9% pour des embryons frais contre 69% pour des embryons congelés dans du glycérol ($p=0,01$). De la même façon, il est important de noter que les différentes techniques de congélation n'auront pas les mêmes résultats et qu'elles pourront conduire à des différences importantes dans le taux de gestation mesuré après transfert. On ne pourra donc juger de l'influence d'autres facteurs intrinsèques à l'embryon que pour un mode de transfert et de congélation donné.

Ceci fera l'objet d'une première partie de l'étude bibliographique : nous présenterons l'influence de la qualité et du stade de l'embryon sur la réussite d'un transfert en frais.

Nous verrons dans une seconde partie comment les différentes techniques de conservation influencent la réussite d'un transfert d'embryons.

A. Facteurs liés aux caractéristiques de l'embryon.

Après la collecte, l'embryon est observé au microscope avant d'être mis en paillette pour un transfert immédiat ou pour être congelé. C'est au cours de cette phase qu'une évaluation est possible. Les seuls critères dont on dispose sur le terrain sont des critères morphologiques qui permettent d'évaluer son stade de développement et sa qualité, c'est-à-dire la disposition et l'aspect des cellules qui le composent.

Après avoir présenté les critères permettant de les évaluer, nous présenterons leur influence sur le taux de gestation.

1. Stade embryonnaire

a) Identification du stade

La morphologie générale des embryons bovins est la suivante : diamètre compris entre 150 et 190 µm dont une zone pellucide de 12 à 15 µm. Ce diamètre reste constant du stade zygote au stade du blastocyste épanoui. On donne l'âge de l'embryon en fonction du nombre de cellules qui le composent jusqu'au stade 16 cellules. Ensuite, le comptage des cellules devient plus difficile et d'autres critères morphologiques sont nécessaires. On distingue les stades suivants (l'âge est donné en prenant pour repère l'œstrus comme jour zéro) :

- Le stade morula (5 jours) où les blastomères sont difficilement identifiables. La masse des cellules occupe tout l'espace périvitellin.
- Le stade morula compacte (6 jours) où des blastomères ont fusionné, formant une masse compacte. L'embryon n'occupe plus que 60 à 70% de l'espace périvitellin.
- Le stade jeune blastocyste (7 jours) où une cavité commence à se former. Il est possible de voir une différence entre les cellules de la masse cellulaire interne et les cellules trophoblastiques (à l'extérieur).

- Le stade blastocyste (7 jours) avec une nette différence entre les cellule du trophoblaste et les cellules de la masse cellulaire interne, plus sombres. L'embryon occupe la presque totalité de l'espace périvitellin.
- Le stade blastocyste épanoui (8 jours) où le diamètre total de l'embryon augmente beaucoup (de 20 à 50 %) avec un amincissement de la zone pellucide jusqu'à un tiers de son épaisseur initiale. Les embryons récoltés à ce stade sont en général aplatis à cause d'une disparition du blastocôle.
- Le stade blastocyste éclos (9 jours) : l'embryon quitte ou a quitté sa zone pellucide. Il peut être plus difficile à reconnaître lors d'une collecte.

Une récolte à un jour donné ne contient pas toujours que des embryons du même stade, il existe une certaine variabilité : six jours après les chaleurs, ce sont surtout des embryons au stade morula qui sont récoltés, mais il peut arriver que des blastocystes soient également récoltés à ce stade (Saha et al., 1983).

L'aspect des principaux stades d'embryons transférables est présenté en annexe 3 (Le Guienne et al., 1990).

b) Influence du stade de développement sur la réussite du transfert.

En ce qui concerne les transferts en frais, Lindner et al. (1983) n'observent pas d'influence significative du stade de développement de l'embryon sur la réussite du transfert. Pour les embryons congelés, Niemann et al. (1985) ont observé l'évolution de la morphologie d'embryons au stade morula ou blastocyste après dépôt dans une solution de glycérol 1,4M et équilibration une quinzaine de minutes. Après une forte diminution du volume des cellules, l'aspect redevenait similaire à celui que les embryons avaient avant l'immersion dans le glycérol. Cependant, les morulas ont montré plus de modifications à l'échelle cellulaire (zone pellucide endommagée, blastomères éparpillés) que les blastocystes, et le taux de gestation obtenus après congélation et décongélation était plus faible pour les morulas (46,2%) que pour les blastocystes (54,2%).

Bracke et Niemann (1995) ont observé que la survie in vitro après décongélation dans un bain à 30°C était meilleure pour les blastocystes que pour les morulas (84,5% contre

49,5%, $p<0,01$). Par contre, le taux de gestation après transfert était comparable pour les deux stades d'embryons.

Hasler (2001) n'a pas non plus trouvé de différence significative entre les taux de gestation obtenus après transferts d'embryons de différents stades, dans une étude réalisée aux Etats-Unis et portant sur plus de 14000 embryons transférés. Par contre, dans une autre étude qu'il a réalisée aux Pays-Bas, il a mis en évidence que les jeunes blastocytes donnaient un taux de gestation supérieur ($p<0,05$) à celui obtenu avec des morulas ou des blastocytes plus tardifs (59,7% contre 54,3 et 52,1%). Ces résultats ont été obtenus pour un même mode de congélation et décongélation utilisant du glycérol comme cryoprotecteur.

Il semble donc que pour ce mode de conservation, le stade à privilégier est le stade du jeune blastocyste, même si toutes les études n'en apportent pas la preuve formelle.

2. Qualité des embryons

a) Evaluation de la qualité des embryons

L'évaluation de la qualité des embryons se fait par l'intermédiaire de la taille, de la couleur, du nombre et de la compacité des cellules, de la taille de l'espace périvitellin, du nombre de cellules dégénérées, et du nombre et de la taille des vésicules. L'IETS donne une définition précise de quatre qualités différentes (Robertson et Nelson, 1994). Les embryons sont observés au grossissement 200 pour évaluer leur qualité. On distingue quatre classes de qualité embryonnaire :

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

- Médiocre (qualité 3) : anomalies visibles, nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes et des vésicules grosses et nombreuses.
- Mort ou dégénéré (qualité 4) : anomalies graves, arrêt de développement à un stade précoce avec des cellules dégénérées.

Nous allons à présent voir si ces différentes qualités d'embryons sont à l'origine de variations dans le taux de gestation observé après transfert.

b) Influence de la qualité sur la réussite du transfert.

Comme nous l'avons déjà vu, l'étude des facteurs influençant un transfert ne peut se faire que pour des embryons conservés dans les mêmes conditions.

Farin et al. (1999) ont cherché à savoir si le classement en différentes qualités était un jugement fiable ou si chaque observateur portait un jugement différent.

Six observateurs expérimentés ont analysé des images vidéo des même 15 embryons produits *in vivo*, et ils les ont classés en qualité 1, 2, 3, ou 4 (non transférables). Les images ont été obtenues au grossissement 60 et transférées sur un moniteur vidéo. Chaque observateur avait préalablement observé au moins 500 embryons bovins dans les mêmes conditions.

Le nombre d'embryons classés dans chaque qualité (1, 2 ou 3) était significativement différent pour chacun des observateurs. Les proportions pour chacune des trois qualités (1, 2 ou 3) étaient respectivement de 20 à 53%, 20 à 53% et de 4 à 47%. Il n'y avait par contre pas de différence significative pour juger des embryons de qualité 4. Sachant que cette quatrième catégorie regroupe les non-transférables, on se rend compte que l'avis de tous les observateurs concorde quand il s'agit de juger si un embryon est transférable ou non.

La question est ensuite de savoir si le taux de gestation est influencé par la qualité de l'embryon. Dans leur étude, Farin et al (1999) ont obtenu les taux de gestation suivants, pour des embryons collectés à J7 et transférés en frais : 66 à 76 % pour des embryons de qualité 1, 62 à 69% pour des embryons de qualité 2 et 54 à 60 % pour des embryons de qualité 3. Leur protocole ne comportait cependant pas suffisamment d'embryons pour que ces différences soient significatives.

Des études portant sur des effectifs plus importants ont donné des résultats plus précis. Farin et Farin (1995) ont obtenu un taux de gestation global de 79%, mais ils n'ont transféré que des embryons de qualité 1 ou 2. Aucune différence dans la probabilité de survie d'un embryon en fonction de sa qualité n'a été mise en évidence.

Par contre, une étude réalisée par Hasler (2001) portant sur 9023 transferts d'embryons frais a montré des taux de gestation significativement liés à la qualité de l'embryon (tableau 1).

Tableau 1 : Taux de gestation et qualité d'embryons, d'après Hasler et al. (2001).

Qualité de l'embryon	Nombre de transferts	Taux de gestation (%)
1	4163	73,2
2	3156	68,3
3	1641	56,3
4	61	47,5

Les taux de gestation sont significativement différents entre eux ($p<0,05$).

Nous voyons donc que la qualité de l'embryon semble avoir une influence sur la réussite du transfert, surtout quand on considère la différence entre des embryons de qualité 1 ou 2 et des embryons de qualité 3, comme le confirment Lindner et al. (1983). Sur 783 transferts en frais, ils obtiennent, pour des embryons de qualité 1, 2 et 3 des taux de gestation de 45%, 44% et 27% respectivement.

Ces études présentent l'influence de la qualité de l'embryon observée au moment de la collecte. Le devenir de l'embryon (congélation ou non) peut dépendre de cette qualité, car L'IETS précise que si les embryons de qualité 1 à 3 sont transférables en frais, seuls les embryons de qualité 1 sont congelables.

L'influence de la qualité après congélation et décongélation est plus difficile à évaluer puisque dans de nombreux cas, il s'agit de transferts directs, donc sans observation de l'embryon avant sa mise en place.

La principale caractéristique intrinsèque à l'embryon qui joue un rôle dans la variation du taux de gestation après transfert est donc la qualité de l'embryon transféré. Nous allons à présent étudier l'influence du mode de conservation de l'embryon sur la réussite du transfert embryonnaire.

B. Facteurs liés au mode de conservation de l'embryon

La conservation à température ambiante des embryons de bovins ne peut se faire qu'au cours d'une durée très limitée, sous peine de voir le taux de gestation chuter après transfert. Otter cité par Hasler (2001) rapporte une chute du taux de gestation si des embryons sont conservés plus de deux heures à température ambiante. Hasler (2001), lui, n'a pas observé de chute du taux de gestation pour des embryons conservés jusqu'à trois heures à une température inférieure à 28°C.

La conservation des embryons de bovins ne se fait plus que par congélation dans de l'azote liquide (-196°C). Des études avaient été faites il y a une quinzaine d'années sur la possibilité de réfrigérer à 0°C des embryons pour les conserver, mais les taux de survie étaient très faibles . La nécessité de l'emploi d'un cryoprotecteur est vite apparue : l'eau en gelant se dilate et cristallise, ce qui provoque l'éclatement des cellules. Il faut donc déshydrater la cellule avant de la congeler pour que l'augmentation de volume lié à la congélation se fasse dans des proportions supportables par les membranes cellulaires, et éviter la formation de cristaux. C'est le rôle du cryoprotecteur.

Nous allons présenter tout d'abord les caractéristiques recherchées chez un cryoprotecteur, ainsi que les molécules couramment utilisées et l'influence qu'elles peuvent avoir sur le taux de gestation. Nous verrons ensuite en quoi le mode de congélation et de décongélation peut lui aussi avoir une influence sur la réussite du transfert d'embryons.

1. Le cryoprotecteur

De nombreuses molécules ont été l'objet d'expériences pour évaluer leurs aptitudes en tant que cryoprotecteurs. L'effet recherché est toujours le même : une molécule qui entre dans les cellules pour remplacer l'eau mais qui ne cristallise pas en refroidissant. La difficulté la plus grande consiste à trouver des molécules qui ne soient pas toxiques pour les embryons.

Il y a deux principales catégories de cryoprotecteurs utilisables :

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

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

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

a) Utilisation du glycérol

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

Niemann et al. (1985) ont comparé les taux de gestation obtenus avec deux méthodes de cryoconservation différentes : soit plonger directement des embryons dans une solution de glycérol à 1,4 M (méthode A, 64 embryons), soit les placer dans cinq solutions de concentration croissante, de 0,2 jusqu'à 1,0M (méthode B, 53 embryons).

Tous les embryons étaient des morulas ou des blastocytes de bonne ou excellente qualité. La congélation s'est effectuée de la même façon. Pour la décongélation, les embryons de l'expérience A ont été d'abord placés dans une solution de 0,7M de glycérol et 0,7M de saccharose, puis dans du saccharose uniquement. Les embryons de l'expérience B ont subi le même traitement mais dans des solutions à 0,5M de glycérol et de saccharose.

Dans le premier cas, les auteurs ont observé une baisse importante du volume des cellules, mais au bout de 15 minutes, elles reprenaient un volume normal, sans différence morphologique observable par rapport à leur aspect avant expérience. Un taux de gestation de 51% a été obtenu après 49 transferts. En ce qui concerne la méthode B, elle a conduit à une proportion moitié moindre d'embryons avec une zone pellucide endommagée (13,2 contre 26,6%), mais le taux de gestation obtenu après 37 transferts n'était que de 40,5%. La différence observée n'est pas significative, mais ceci montre qu'une zone pellucide endommagée n'empêche pas d'avoir un taux de gestation important, du moment que les blastomères restent intacts.

Les auteurs ont donc conclu que l'utilisation d'une solution à 1,4M de glycérol était possible et avait l'avantage de simplifier les procédures de congélation.

L'inconvénient lié à ce cryoprotecteur est que la décongélation doit, pour les mêmes raisons, avoir lieu en plusieurs étapes, ce qui demande beaucoup de temps.

Au départ, la procédure demandait 6 étapes pour une solution de PBS avec 1,33 M de glycérol (Elsden et al, 1982). Cela demande beaucoup de manipulations et une solution plus simple a été mise au point, utilisant du saccharose pour limiter le nombre de dilutions : le fait de placer l'embryon dans un milieu contenant peu de glycérol (donc de pression osmotique moindre que celle qui règne à l'intérieur de la cellule) risque de provoquer un éclatement de la cellule à cause de la différence de pression osmotique. On a donc ajouté au milieu de dilution une molécule osmotiquement active mais ne pouvant traverser les membranes cellulaires. L'effet est d'augmenter la pression osmotique à l'extérieur de la cellule, ce qui limite le différentiel de pression sans gêner la sortie du glycérol.

On est ainsi arrivé, comme l'expose Nivot (1998), à trois bains successifs. Les embryons sont placés 5 minutes dans chaque bain avant d'être déposés dans un milieu de transfert. Ces bains ont tous pour point commun une solution de PBS additionnée de sérum albumine bovine (BSA) à 4 g/l, et de saccharose à la concentration de 0,3M. Le

premier bain contient en plus 6% de glycérol, le deuxième 3% et le dernier n'en contient pas.

En 15 minutes, on obtient donc des embryons correctement décongelés et placés dans un milieu de transfert. Ils sont prêts à être montés dans une paillette et transférés dans une receveuse.

Leibo et al. (1984) ont mis au point une technique pour éviter d'avoir à pratiquer des dilutions successives des embryons afin d'en faire sortir le glycérol. Les embryons pris en compte dans leur études ont été congelés dans une solution de PBS contenant 1,5M de glycérol. L'originalité de leur décongélation et de la dilution est qu'elles ont toutes les deux lieu à l'intérieur de la pipette. La solution de saccharose pour la dilution est en effet présente à côté de l'embryon, séparée par une bulle d'air comme le montre la figure 1.

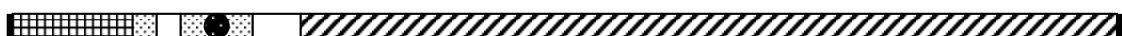


Figure 1 : Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant du glycérol.

Légende : ■ Bouchon de coton

■ Solution de dilution (PBS avec 1,08M de saccharose)

■ Air

■ Solution de PBS avec glycérol 1,5M.

● Embryon

■ Bouchon de plastic

Après réchauffement à température ambiante, on secoue la paillette en la tenant par le côté opposé au bouchon de coton. L'air migre au bout de la paillette et le milieu de congélation est dilué par la solution de saccharose. On peut pratiquer directement l'insémination sans avoir besoin de sortir l'embryon ni de le rincer dans plusieurs bains avant de le monter dans une nouvelle paillette.

Cette méthode a été testée sur une étude de terrain comportant 332 transferts. Le taux de gestation moyen obtenu a été de 34,9%. C'est un taux assez bas mais la méthode permet d'éviter d'utiliser un microscope sur le terrain. C'est un premier essai de transfert direct, mais qui n'a pas eu de très bons résultats sans doute à cause des manipulations sur la paillette car les résultats variaient énormément en fonction du technicien qui pratiquait le transfert. Cette méthode a été déposée sous le nom de « One-Step™».

Nous verrons que d'autres cryoprotecteurs donnent de meilleurs résultats en transfert direct aujourd'hui.

b) Utilisation du DMSO.

Cette molécule a été utilisée assez précocement comme cryoprotecteur dans les opérations de congélation d'embryon. Comme le glycérol, il s'agit d'une grosse molécule qui traverse lentement les cellules et demande des manipulations assez longues lors de sa mise en contact avec l'embryon, pour éviter les chocs osmotiques. Elle n'est plus que très peu utilisée aujourd'hui, car elle présente peu d'intérêt comparée au glycérol, alors qu'elle a les mêmes désavantages.

Bouyssou et Chupin (1982) ont comparé le taux de survie des embryons après utilisation de deux cryoprotecteurs pour la congélation/décongélation de 65 blastocytes bovins : le DMSO et le glycérol.

Les blastocystes ont été séparés en deux groupes et ont subi deux traitements différents. Ceux du premier groupe ont été placés dans un milieu PBS contenant 1,5M de DMSO, ceux du second dans un milieu PBS contenant 1,4 M de glycérol. Les cryoprotecteurs ont été ajoutés en trois étapes. Après décongélation, ils ont été dilués en six étapes de dix minutes chacune.

Le DMSO donnait de moins bons résultats que le glycérol : il y avait plus d'embryons anormaux (27% contre 16%, p<0,05) et plus d'embryons avec une zone pellucide endommagée (26% contre 14%, p<0,02). Le DMSO, une des molécules phares du transfert embryonnaire il y a une quinzaine d'années, est devenue aujourd'hui obsolète.

c) L'éthylène glycol.

Le glycérol a comme inconvénient de nécessiter une décongélation en trois temps minimum pour en laver les embryons au moment de la décongélation. Ces trois étapes sont rendues nécessaires par la faible perméabilité des membranes embryonnaires au glycérol.

Depuis une dizaine d'années, on a découvert des molécules auxquelles les embryons sont plus perméables : les glycols. Leur intérêt est de permettre des transferts directs, c'est-à-dire en plaçant directement la paillette décongelée dans le pistolet de transfert, sans passer par une étape d'observation de l'embryon au microscope avant de le transférer. Szell et al. (1989) cités par Voelkel et Hu (1992a) ont montré que, placés dans une solution d'éthylène glycol à 2 M, des morulas et des blastocytes perdaient 20% de leur volume, alors que dans la même concentration de glycérol, ils perdaient 45% de leur volume.

Les glycols forment une large famille de molécules au sein de laquelle il a fallu choisir la plus performante.

i. Choix du glycol

Dochi et al. (1998) ont comparé l'efficacité de deux glycols différents, le propylène glycol et l'éthylène glycol. Ils ont utilisé un lot d'embryons congelés dans du glycérol comme témoin.

Les embryons sont dans cette expérience congelés dans du PBS contenant du sérum de veau fœtal et du propylène glycol à la concentration de 1,6M ou de l'éthylène glycol à la concentration de 1,8M. La solution de glycérol avait, elle, une concentration de 1,4M. Les résultats ont montré que le propylène glycol donnait un taux de gestation significativement plus faible que le glycérol et l'éthylène glycol. Ces deux derniers ont

conduit à des taux de gestation semblables (48,5 et 44,7 % respectivement, contre 36% pour le propylène glycol).

Les auteurs ont également remarqué que le taux de gestation baissait significativement si plus de 11 minutes s'écoulaient entre la décongélation et le transfert, l'embryon supportant mal d'être conservé à température ambiante dans un cryoprotecteur comme l'éthylène glycol.

Maintenant que nous avons déterminé quel était la molécule la plus performante, nous allons chercher à savoir à quelle concentration il faut l'utiliser.

ii. Concentration optimale en glycol

Voelkel et al. (1992a) ont essayé trois concentrations différentes d'éthylène glycol : 1,25M, 1,5M, 1,75M. Ils ont placé des embryons dans chacune de ces trois solutions, les ont congelés puis décongelés et placés dans un milieu de culture. Quarante-huit heures plus tard, ils les ont observés pour voir si les différentes concentrations avaient une influence sur le taux de survie. Le meilleur résultat a été obtenu pour une concentration de 1,5M, mais les deux autres solutions n'ont pas donné de résultats significativement différents.

A partir de là, ils ont essayé de savoir s'il était possible d'améliorer les résultats obtenus avec l'éthylène glycol par rapport à ceux obtenus avec du glycérol. Pour cela, ils ont réalisé des paillettes avec deux milieux différents : de l'éthylène glycol et du tampon PBS (Figure 2).



Figure 2 : Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant de l'éthylène glycol d'après Voelkel et al.(1992a)

Légende : Bouchon de coton

Solution de dilution (PBS)

Air

Ethylène glycol 1,5M dans du PBS

Embryon

Bouchon de plastic

Un ratio d'un volume de solution d'éthylène glycol pour trois volumes de PBS a été maintenu constant. Le taux de gestation obtenu avec cette solution était un peu plus élevé qu'avec de l'éthylène glycol seul, mais la différence n'est pas significative. Les auteurs pensent que le milieu PBS a deux fonctions : il dilue le milieu dans lequel se trouve l'embryon, et limite la quantité d'éthylène glycol déposé dans les voies génitales femelles, ce qui peut réduire les effets locaux sur l'endomètre.

Mc Intosh et al. (1994) ont congelé 1962 embryons à J7 dans une solution d'éthylène glycol à 1,5M. Les embryons ont été placés dans des paillettes de 0,25ml, refroidies et plongées dans de l'azote liquide. Ils ont ensuite décongelé ces paillettes dans de l'eau à 20°C et observé les embryons dans un bain de PBS et BSA. Ils les ont ensuite transférés chez des receveuses. Sur 518 animaux ayant subi un transfert, 286 gestations ont été confirmées. Le taux de gestation obtenu est donc de 59%, ce qui montre que cette méthode de conservation est utilisable en routine. Comme elle est plus simple à mettre en œuvre que la congélation dans du glycérol, les auteurs déclarent l'utiliser exclusivement depuis 1994.

Cette série d'expériences nous montre que le transfert direct utilisant l'éthylène glycol est un progrès intéressant en matière de transplantation embryonnaire, puisqu'il conduit aux mêmes résultats que le glycérol, mais avec des manipulations beaucoup plus simples et rapides.

Maintenant que nous savons dans quels milieux la congélation pouvait se faire, nous allons étudier les différentes possibilités offertes pour la réalisation pratique de cette congélation.

2. Le mode de congélation

Nous avons vu que l'alternative au transfert en frais passait par la congélation des embryons dans de l'azote liquide pour assurer leur conservation à long terme dans de bonnes conditions.

Le refroidissement d'une température ambiante (environ 20°C) à une température de -196°C (celle de l'azote liquide sous 1 bar) doit se faire selon un protocole précis.

Deux principales modalités sont couramment décrites : soit on procède à un refroidissement lent et progressif avec des paliers bien définis, soit on procède à un refroidissement extrêmement rapide : la vitrification.

Nous commencerons par présenter les différents modalités de refroidissement lent envisageables, ainsi que leur influence sur la survie de l'embryon.

a) Le refroidissement progressif.

Si la conservation des embryons ne demande qu'une cuve isotherme contenant de l'azote liquide, il n'en est pas de même pour les opérations de refroidissement de l'embryon.

L'équipement le plus coûteux nécessaire à la conservation des embryons est le congélateur. La plupart utilisent les vapeurs d'azote pour faire chuter progressivement la température. Les paillettes sont alors placées dans un réceptacle muni de résistances chauffantes baignant dans des vapeurs d'azote liquide. Ces résistances chauffent les paillettes pour accompagner le refroidissement dû à l'azote. D'autres, moins onéreux,

fonctionnent avec un bain d'éthanol dans lequel les paillettes sont placées. Le refroidissement a lieu au moyen d'un compresseur. Il est préférable de n'utiliser que de l'éthanol absolu (99,6%) pour le bain et non des mélanges d'alcools parfois recommandés qui peuvent provoquer la dégénérescence des embryons (Niemann, 1991).

Une induction artificielle de la congélation est nécessaire pour éviter les problèmes de surfusion : on met en contact avec la paillette une tige préalablement placée dans de l'azote liquide pour provoquer le changement d'état des liquides contenus dans la paillette. C'est une opération qui doit se faire rapidement et pas à l'endroit de la paillette où se trouve l'embryon.

Les protocoles décrits sont tous semblables. On présentera ici celui proposé par Niemann (1991) .

Le refroidissement se fait entre 0,1 et 0,3°C/min jusqu'à -30 ou -35°C, avant l'immersion dans l'azote liquide. Le processus de congélation utilisé par les auteurs est le suivant :

- Passage des embryons dans une solution à 1,4M de glycérol pendant 20 minutes à température ambiante.
- Chargement des embryons dans une paillette de 0,25 ml entre deux bulles d'air elles mêmes entourées de deux bulles de solution.
- Immersion dans un bain d'éthanol à -7°C.
- Induction de cristallisation et période d'équilibration de cinq minutes, au moyen d'une spatule plongée préalablement dans l'azote liquide.
- Refroidissement lent de -7 à -28 °C à raison de 0,3°C /min.
- Refroidissement lent de -28 à -35°C à raison de 0,1 °C/min.
- Immersion dans de l'azote liquide à -196°C.

D'autres vitesses de refroidissement ont été testées, notamment par Elsden et al. (1982). Ils ont comparé trois modes de refroidissement différents, après induction de cristallisation à -7°C :

- à 0,3°C/min jusqu'à -35°C et maintien 30 min à cette température
- à 0,3°/min jusqu'à -38°C
- à 0,3°/min jusqu'à -35°C puis à 0,1°/min jusqu'à -38°C.

Les embryons étaient ensuite plongés dans de l'azote liquide.

Le meilleur résultat en terme de taux de gestation après transfert a été obtenu avec la troisième méthode ($p<0,01$).

Suzuki et al. (1990), quant à eux, n'ont pas trouvé de différence significative dans le taux de survie entre un refroidissement de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -30°C et un second de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Des techniques de refroidissement plus rapide ont été testées. Ainsi, des embryons bovins ont été refroidis rapidement à raison de $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -35°C avant d'être plongés dans de l'azote liquide. Mais le taux de survie après ce type d'opération est bas (33% à 50% environ). Il n'est donc pas utilisé chez les bovins. On peut noter cependant que les embryons de souris, de rat et de lapin supportent beaucoup mieux ces variations rapides de température (Niemann, 1991).

Une autre technique de refroidissement rapide a été mise au point chez les bovins. Les paillettes passent presque instantanément de la température ambiante à celle de l'azote liquide : c'est la vitrification.

b) La vitrification d'embryons bovins.

La vitrification est un processus thermodynamique de refroidissement au cours duquel la viscosité d'un fluide est augmentée de façon importante, jusqu'à lui donner les propriétés d'un solide.

Le problème associé à un refroidissement aussi brusque est la probabilité de formation de cristaux, incompatibles avec la survie des cellules. La probabilité de formation de ces cristaux est liée au volume de la solution et à sa viscosité. Plus la solution est visqueuse et de faible volume, moins les cristaux sont susceptibles de se former (Bautista, 1998) . La composition de la solution de vitrification est donc primordiale pour la survie des cellules.

i. Choix des composants de la solution de vitrification

Ali et Shelton (1993) ont présenté les principales caractéristiques d'une telle solution.

Une bonne solution de vitrification peut être obtenue facilement en utilisant un cryoprotecteur à forte concentration, mais c'est en général une solution qui est alors毒ique pour les embryons. On utilise donc des solutions contenant un mélange de cryoprotecteurs différents pour diminuer la toxicité de chacun, ainsi que des polymères de haut poids moléculaire qui permettent de réduire les concentrations de cryoprotecteurs. Les solutions de saccharose sont également utilisées, toujours parce qu'elles évitent la sortie d'eau trop rapide des cellules.

La capacité de différentes solutions à vitrifier a été étudiée en les plaçant dans des paillettes de 0,25ml et en les immergeant dans de l'azote liquide. Le but est de n'avoir de formation de cristaux ni lors du refroidissement, ni lors du réchauffement. Le DMSO et le glycérol vitrifient à 5 mol/l, l'éthylène glycol à 6,5 mol/l. Mais aucun ne reste complètement vitreux au cours du refroidissement. La raison proposée est qu'un noyau de glace se forme lors du refroidissement mais qu'il n'a pas le temps de grandir. Il reprend sa croissance au cours du réchauffement et forme de la glace visible macroscopiquement (Darvelid, 1994).

A l'inverse, des mélanges de cryoprotecteurs vitrifient convenablement (association d'éthylène glycol à 3,5 mol/l et de glycérol à 4,5 mol/l, par exemple). Ces mélanges ont été testés pour mesurer leur toxicité sur des embryons de souris.

Un mélange a été sélectionné pour son innocuité et est utilisé pour la congélation des embryons de mouton. Il se compose d'éthylène glycol à 5,5 mol/l et de saccharose à 1 mol/l (Ali et Shelton, 1993). Ces deux composants ne vitrifient pas séparément l'un de l'autre à ces concentrations, d'où l'utilité de les associer. L'éthylène glycol seul ne vitrifie et ne reste dans cet état au cours du réchauffement qu'à la concentration de 8 mol/l, qui est toxique pour les embryons de souris.

Certaines études ont montré que la toxicité des produits pouvait être réduite si la paillette était maintenue à une température basse, mais ceci demande un équipement important. Les tests réalisés ici ont tous été faits à température ambiante pour pouvoir être facilement applicables.

ii. Temps d'équilibration

Une étude a été menée par Ishimori et al. (1993) sur des morulas récoltées à six jours et demi et des blastocystes récoltés à sept jours et demi pour déterminer le temps optimal d'équilibration. Il s'agit du temps nécessaire à l'entrée des molécules de la solution de vitrification à l'intérieur de la cellule. Seuls les embryons de très bonne qualité ont été conservés et placés dans un milieu PBS avec 1% de sérum de veau.

La solution de vitrification (VSED) est composée de 25% d'éthylène glycol et de 25% de DMSO dans un milieu PBS supplémenté.

La solution d'équilibration est composée de la solution de vitrification diluée à 50% dans une solution de PBS. Les embryons sont placés une, deux ou cinq minutes dans cette solution, puis ils sont placés dans le milieu VSED et transférés dans une paillette comme le montre la figure 3.



Figure 3: Configuration d'une paillette de 0,25 ml avant congélation, contenant la solution VSED (d'après Ishimori et al., 1993)

Légende : Bouchon de coton

 Solution de dilution (0,5 mol/l de saccharose et PBS, 150 µl)

Air

 Solution VSED

● Embryon

Bouchon de plastic

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

La décongélation a lieu en plongeant la paillette 15 secondes dans de l'eau à 20°C.

Le taux de survie des embryons varie de 73 à 90% pour ceux qui sont restés une ou deux minutes dans le milieu d'équilibration, alors qu'il chute de manière significative ($p<0,05$) à 20% pour ceux qui y ont restés cinq minutes. Ceci peut être dû à la toxicité d'un ou des produits. Comme il s'agit de petites molécules qui traversent facilement les membranes, un temps de contact court est suffisant pour assurer une bonne cryoprotection sans engendrer de troubles par toxicité des produits.

L'avantage de ce protocole est que les opérations de congélation et de décongélation prennent très peu de temps, ce qui présente un avantage important par rapport aux techniques traditionnelles. Il permet également de se dispenser du congélateur.

Il semble que les blastocytes soient plus sensibles à la congélation que les morulas sans différence significative observable dans cette étude. De leur côté, Saha et al. (1994) estiment que le stade de la morula compacte est le plus à même de subir une vitrification.

3. Le mode de décongélation.

Le réchauffement des paillettes demande beaucoup moins de temps que le refroidissement. Elles sont directement placées à une température proche de la température de manipulation ultérieure dès leur sortie de la bomonne d'azote liquide. Nous ne présentons ici que l'influence de la décongélation sur l'embryon dans son milieu de conservation, c'est-à-dire du réchauffement de la paillette de -196°C à la température ambiante. Les procédés nécessaires à la dilution du cryoprotecteur sont envisagés dans la partie les concernant.

La question est de savoir s'il faut laisser les paillettes à l'air libre ou les immerger dans l'eau pour accélérer le réchauffement, et si oui à quelle température.

Bracke et Niemann (1995) ont ainsi comparé 5 procédés de décongélation :

- dans l'air à température ambiante (18 à 22°C)
- 10 secondes dans de l'eau à 20°C
- 10 secondes dans de l'eau à 30°C
- 10 secondes dans l'air puis 10 secondes dans de l'eau à 20°C
- 10 secondes dans l'air puis 10 secondes dans l'eau à 30°C.

L'efficacité des différents procédés a été jugée en considérant le développement *in vitro* de l'embryon pendant les 48 heures qui suivaient la décongélation. Une morula congelée devait évoluer vers le stade blastocyste épanoui, et un blastocyste congelé devait évoluer vers le stade blastocyste éclos. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les décongélations dans l'eau uniquement, mais sans que la différence avec les autres techniques ne soit significative.

Il ne semble pas qu'il y ait un procédé de décongélation des paillettes qui influence le taux de gestation. Les recommandations sont cependant toujours les mêmes : une décongélation rapide dans un bain d'eau maintenue à une température comprise entre 20 et 30°C. (Bracke et Niemann, 1995 ; Voelkel et Hu, 1992b).

A l'inverse, il est intéressant de noter que le temps pendant lequel on peut laisser les embryons dans le milieu de transfert après décongélation ne doit pas être trop long sous peine de faire chuter le taux de gestation après transfert. Ceci est surtout valable pour l'éthylène glycol, puisque dans le cas du glycérol, les embryons sont placés dans un milieu de transfert où ils peuvent rester plus longtemps sans dommage. Ainsi, Duchi et al. (1995) recommandent de ne pas laisser des embryons plus de onze minutes dans de l'éthylène glycol à température ambiante.

Ces nouvelles techniques de conservation permettent un gain de temps non négligeable ainsi qu'une réduction de l'investissement nécessaire à la congélation des paillettes. Nous avons cependant vu que le taux de survie des embryons était de 10 à 15% inférieur à celui obtenu avec des techniques traditionnelles.

Après avoir présenté l'influence du stade, de la qualité et du mode de conservation de l'embryon sur la réussite du transfert, nous allons à présent aborder l'influence des facteurs liés à la receveuse de cet embryon.

II) Etude des facteurs de variation liés à la receveuse

La receveuse d'embryons joue elle aussi un rôle primordial dans la réussite d'un transfert d'embryons de bovins. D'après broadbent et al. (1991), la receveuse est un des principaux facteurs qui conditionne la réussite d'un transfert. Il est donc important d'évaluer préocemment la qualité de cette receveuse, avant d'entreprendre des opérations de transfert d'embryons.

De nombreux critères cliniques permettent d'évaluer la capacité d'un animal à conduire à terme une gestation après transfert d'un embryon,

équipes de transfert demandent 8 receveuses par vache collectée. Il est toujours possible de congeler des embryons si le nombre de receveuses est insuffisant.

La maîtrise de la qualité des receveuses permet une diminution du prix de revient d'une gestation après transfert. D'après Broadbent et al. (1991), ce coût peut varier en fonction de la proportion des receveuses synchronisées qui ont été effectivement vues en chaleur, de la proportion des receveuses venues en chaleur et effectivement transférées, et de la proportion des receveuses transférées qui deviendront effectivement gestantes.

Ils précisent que l'augmentation de 85 à 95% de la proportion de vaches montrant effectivement un œstrus permet de faire baisser le coût d'une gestation de 6%, que l'augmentation de 80 à 90 % de la proportion d'animaux synchronisés permet de baisser le même coût de 7% et qu'une baisse du prix d'une gestation de 14% est possible si le taux de gestation augmente de 60 à 70%.

La réduction du coût d'une gestation passe en fait par une combinaison de l'amélioration de ces trois facteurs.

Il faut travailler à tous les niveaux de la sélection et de la préparation des receveuses pour essayer d'avoir la meilleure réussite possible. On peut distinguer trois étapes principales dans ce processus : le choix de l'animal en lui-même, les critères d'élevage jusqu'au jour du transfert et l'examen le jour du transfert.

Nous verrons tout d'abord quels critères génotypiques et phénotypiques il peut être judicieux de rechercher chez de potentielles receveuses, puis nous présenterons l'influence des critères d'élevage jusqu'au moment du transfert, et notamment le mode de synchronisation des animaux. Nous verrons enfin de quelle façon le tri des receveuses le jour du transfert peut influencer le taux de gestation futur.

B. La sélection des animaux.

Différents critères conduisent à la décision d'inclure ou d'exclure des animaux dans un programme de transfert embryonnaire.

1. La race

Les animaux choisis doivent être adaptés à l'environnement où a lieu le transfert, facilement disponibles et à un coût raisonnable. En Angleterre, d'après Broadbent et al. (1991), les animaux le plus souvent choisi sont des animaux de race laitière car ils sont plus habitués à être manipulés que les animaux de race allaitante et leur état corporel est en général modéré, ce qui est plus en faveur d'une meilleure fertilité et d'un transfert techniquement plus facile à accomplir.

D'après Donaldson (1984), les races où le taux de gestation est le plus important après transfert sont les races Hereford (75%), Salers (57%), Charolaise (53%) et Longhorn (52%).

Van Wangtendonk de Leeuw et al. (1997) ont quant à eux transféré 728 embryons de race blonde d'aquitaine sur des receveuses laitières, allaitantes ou mixtes. Ils n'ont pas trouvé d'influence significative du type de receveuse sur la réussite du transfert.

2. Les antécédents des animaux.

On ne choisira pas d'animaux ayant des antécédents de troubles de la reproduction, une vache infertiles à chaleurs normales (repeat-breeder), c'est-à-dire non gestantes après plus de trois IA, ou des animaux dont on sait que les voies génitales sont peu perméables à un pistolet de transfert. Des antécédents de métrite doivent aussi inciter à la prudence.

3. La parité

Broadbent et al. (1991) expliquent que les génisses sont préférables aux vaches car elles ne conduisent pas de lactation en même temps que la gestation, ce qui évite un stress nutritionnel potentiel. De plus un utérus vierge est plus compatible avec un

transfert embryonnaire : il n'a pas d'antécédents de gestation, de métrite ou de césarienne qui pourrait avoir provoqué des adhérences. Leurs inconvénients, toujours selon broadbent et al. (1991), est que le col peut être plus difficile à franchir et que la fréquence des dystocies est plus importante chez elles que chez les vaches.

Avant d'être mis à la reproduction, les animaux doivent bien sûr être cyclés, ce qui correspond au moment où ils ont atteint 40% de leur poids adulte. Il est couramment conseillé d'attendre qu'ils aient atteint 60% de leur poids adulte avant la mise à la reproduction. Ainsi, le poids moyen correspondant à 90% de cyclicité chez les génisses Charolaises est de 388kg (Rice, 1991).

Un dernier avantage des génisses est d'être d'un coût d'achat moindre que les vaches pour des animaux de qualité identique avec en plus une fertilité plus importante. De plus, elles ont des besoins alimentaires moins élevés que ceux d'une vache qui produit du lait.

Chagas e Silva et al (1999) ont observé que les génisses avaient un taux de gestation moyen de 53,7%, significativement supérieur à celui des vaches (40,2%, $p<0,01$). Ils ont également mis en évidence qu'il y a plus de transferts traumatiques chez les vaches que chez les génisses, en raison de la difficulté qu'il y a à manipuler des appareils génitaux de taille importante. Or la difficulté de transfert fait chuter le taux de gestation de façon importante ($p<0,01$, avec une chute de 17,7% entre un transfert facile et un difficile).

L'effet combiné de la parité et de la congélation de l'embryon montre que les génisses sont de bonnes receveuses, qu'il s'agisse de transferts d'embryons frais ou congelés (respectivement 59,3 et 49,9% de gestation), alors que les vaches ne donnent un taux de gestation acceptable qu'en cas de transfert en frais (48,9% de gestation). La congélation des embryons fait chuter le taux de gestation des vaches de façon significative (30,1% de gestation après transfert d'embryons congelés).

4. L'état général des animaux.

On ne choisira pas des animaux trop maigres, chétifs ou à l'inverse trop gras qui s'avèrent en général être de mauvaises receveuses (état corporel inférieur à 1,5 ou supérieur à 4). Les variations des performances reproductrices en fonction de l'état corporel des animaux sont présentées dans le paragraphe traitant de l'alimentation des receveuses.

Les critères que nous venons de voir sont évalués à la simple vue de l'animal et grâce aux renseignements de l'éleveur. Les critères suivants relèvent d'un examen clinique par le vétérinaire.

5. L'examen de l'appareil génital.

L'animal ne doit pas être gestant, ce qui peut arriver s'il a subi un transfert peu de temps auparavant. Il se peut en effet qu'un animal manifeste des chaleurs en cours de gestation, ce qui peut conduire à une erreur de diagnostic (Escouflaire, 1998b).

La receveuse subit ensuite un examen plus poussé pour évaluer la qualité de son appareil génital. Un cathétérisme du col utérin peut être réalisé. Il permet de vérifier la perméabilité des voies génitales de la femelle. On exclut ainsi les animaux porteurs d'anomalies congénitales, ou les animaux chez lesquels les transferts précédents ont pu laisser des séquelles. Les anomalies sont fréquentes chez les free-martins : corne utérine atrophiée, simple raccourcissement des cornes utérines, vagin aveugle. Ces animaux peuvent être introduits par accident dans l'élevage, à la suite d'un achat par l'éleveur qui ne disposait pas de suffisamment de receveuses.

Il convient également de vérifier que l'animal exprime correctement ses chaleurs et peut subir un traitement de synchronisation des chaleurs.

Un examen au spéculum est également recommandé pour vérifier l'absence de signes de métrite.

Il faut enfin prendre garde de ne pas chercher à sélectionner des animaux trop tôt après le vêlage (moins de 50 jours), l'endomètre n'ayant pas retrouvé son état normal.

6. Aspect sanitaire.

De manière générale, le journal officiel du 11 août 1994 précise les conditions sanitaires que doivent remplir les receveuses d'embryons. Elles doivent avoir séjourné pendant 6 mois au moins dans un cheptel bovin indemne de toute MLRC, notamment la brucellose, la tuberculose et la leucose bovine enzootique. Ce cheptel ne doit pas avoir connu de signes d'IBR-IPV depuis un an au moins. Ces receveuses doivent également

« avoir satisfait à un examen clinique préalable à la mise en place des embryons ». La BVD et L'IBR sont deux maladies non réputées contagieuses dont il faut savoir se prémunir lors de transfert d'embryons, à cause du risque d'avortement qu'elles font encourir au lot de receveuses.

Il est préférable de choisir des animaux positifs au virus BVD mais virologiquement négatifs (Escofflaire, 1998b). Une vaccination contre le virus BVD est recommandée, même si la protection du fœtus n'est pas totale. Elle a l'avantage de prévenir des avortements en série sur un lot de receveuses sérologiquement négatives au moment du transfert (Chastant et Maillard, 1999).

Il faut aussi prendre en compte les risques de transmission du virus IBR. Les receveuses qui sont achetées uniquement pour le transfert sont susceptibles d'être porteuses de ce virus. Soit ces animaux sont des porteurs latents qui sont susceptibles de réexcréter du virus sans signe clinique, soit ils viennent d'être contaminés par un autre porteur latent, au cours du transport, par exemple (la transmission se faisant de « naseau à naseau » ou sur de très courtes distances par aérosolisation de gouttelettes de mucus nasal). Il y a un risque d'avortement uniquement en cas de virémie consécutive à une infection primaire. Une virémie issue d'une recirculation virale n'est pas considérée comme un risque d'avortement (Thiry, 1997). Il peut être intéressant de pratiquer un test sérologique sur des animaux non certifiés indemnes de L'IBR dans un délai de 15 jours après le délai de livraison, en sachant qu'un animal infecté au cours du transfert pourra être encore négatif à cette date et qu'il n'aura des anticorps décelables qu'au bout de 20 à 35 jours (Lamblin, 1997).

Nous avons présenté ici les principaux facteurs conditionnant la réussite d'un transfert d'embryons, du moins en ce qui concerne le choix de la receveuse. Voyons à présent comment ces animaux doivent être entretenus et préparés à recevoir un embryon pour que le taux de gestation qui s'en suivra soit le meilleur possible.

C. Le regroupement des animaux et leur préparation.

1. La nutrition

L'alimentation est un facteur clé de la préparation des receveuses selon Broadbent et al. (1991). En effet, une alimentation défective peut être la cause de nombreux troubles de la reproduction en élevage bovin. La principale composante de la ration qui joue un rôle dans ce domaine est son niveau énergétique : il peut occasionner des chaleurs silencieuses, un retard d'ovulation, mais surtout une chute du taux de réussite en I.A. comme en transfert d'embryons.

a) L'apport énergétique.

i. avant le transfert

Le déficit énergétique d'une ration peut s'apprécier en évaluant l'état d'engraissement des animaux. L'influence de l'amaigrissement sur les performances des vaches n'a pas d'effet significatif tant que la note d'état corporel ne baisse pas de plus d'un point après le vêlage. Par contre, si la note chute de plus d'1,5 point, les baisses de performances deviennent plus importantes. (Enjalbert, 1998)

Une carence énergétique importante peut entraîner un anœstrus vrai avec absence d'ovulation avec des follicules de diamètre inférieur à celui observé sur des animaux cyclés. Une restriction énergétique plus modérée entraînera plutôt une diminution de la taille du corps jaune et une diminution de la taille des follicules dominants (Corlay, 1998).

L'état corporel s'apprécie dans les races allaitantes par maniement du ligament sacrotubéral et des deux dernières côtes. Grimard et al. (1998) recommandent un état corporel de 2,5 à 3 pour une multipare et de 3 pour une primipare lors de la mise à la reproduction. Une note supérieure à 4 peut aussi avoir des conséquences néfastes sur les performances reproductrices (Machado, 1995), sans doute à cause de la baisse de sécrétion d'hormone de croissance liée à la suralimentation.

Il est intéressant de noter qu'une note de 2 peut être considérée comme suffisante à la période de la mise à l'herbe pour les vaches allaitantes (Broadbent et al., 1991).

ii. au moment du transfert

Un flushing (une augmentation temporaire de l'apport alimentaire) peut permettre d'améliorer les performances de reproduction des animaux.

Les augmentations de niveau alimentaire ont des effets très rapides sur le métabolisme des animaux, notamment grâce aux effets immédiats de l'insuline sur le fonctionnement ovarien. Par contre, les baisses du niveau alimentaire se répercutent lentement sur le métabolisme car il existe de nombreux mécanismes compensatoires (Gutierrez, 1997). Hidalgo et al. (2002) ont mené une étude expérimentale au cours de laquelle ils ont étudié les effets d'une supplémentation alimentaire en propylène glycol sur le taux de gestation de génisses après transfert en frais. Une quantité de 250 ml de ce produit a été quotidiennement introduite dans la ration de 75 génisses. 74 autres génisses ne recevant pas ce traitement ont servi de lot témoin. Ils ont observé une augmentation du taux de gestation dans le lot traité (65% contre 46%, p<0,09) mais avec des taux de progestérone et des qualités de corps jaunes ne présentant pas de différences significatives. Ils concluent donc que le propylène glycol a une influence positive, et que d'autres facteurs que la qualité du corps jaune et le taux de progestérone étaient à prendre en considération pour expliquer cet effet.

iii. en fin de gestation

L'étude de la croissance du fœtus montre que les deux tiers environ de son poids de naissance sont acquis au cours des 85 derniers jours de gestation. Dunn (1980) a observé que si la vache et surtout la génisse, qui a encore des besoins de croissance à satisfaire, ne reçoivent pas pendant cette période une alimentation adaptée, le poids du veau à la naissance sera diminué. Certes cela n'entraîne pas d'avortement mais la mortalité et la morbidité après le part. Il explique également que les femelles ne doivent pas être trop nourries au cours de cette période pour éviter les problèmes de dystocie. Il recommande un gain de poids de 60 à 70 kg de poids vif au cours du dernier trimestre de gestation.

b) L'apport azoté.

Les déficits azotés n'ont un rôle sur les performances de reproduction que s'ils sont prolongés. Ils entrent alors dans le cadre d'une sous-nutrition globale.

Dans le cas des receveuses, une telle carence n'est pas observée sur le terrain car les animaux sont sélectionnés, notamment sur leur état corporel et on ne choisira pas de transférer un embryon sur un animal dont l'état n'est pas jugé satisfaisant.

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

- un déficit énergétique dû à la consommation d'énergie par le foie pour transformer l'ammoniaque en urée,
- une augmentation des taux circulants d'urée et d'ammoniaque qui peuvent avoir un effet cytotoxique sur l'embryon et provoquer une chute de la progestéronémie. La modification de ces taux conduit à une baisse du pH utérin qui peut expliquer la diminution de fertilité observée (Elrod et Butler, 1995).

c) L'apport de minéraux.

Il convient surtout de vérifier, en cas de troubles de reproduction dans l'élevage, de la qualité de cet apport et de sa disponibilité. Les relations existant entre déficits minéraux et troubles de la reproduction sont nombreux mais peu spécifiques. Ils sont donc difficiles à étudier (Enjalbert, 1998).

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

d) Les apports en eau

Elle doit toujours être disponible et en quantité suffisante.

e) La régularité des apports

Une vache peut compenser une carence pendant un temps donné avant que des signes n'apparaissent.

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

2. L'environnement

Là aussi une certaine constance dans l'environnement est nécessaire pour assurer une bonne réussite du transfert.

Un stress par le froid génère une rapide augmentation des besoins alimentaires qui peut se traduire par une mobilisation des réserves et une chute de l'état corporel.

A l'autre extrême, une chaleur excessive peut conduire à un anoestrus, un faible taux d'ovulation et un stress de chaleur sur l'embryon lui-même. Ces effets peuvent en plus être exacerbés par une humidité importante.

Sous nos climats tempérés, ces effets sont en général minimes, mais Broadbent et al. (1991) expliquent qu'en Ecosse, les comportements liés à l'œstrus sur des animaux au pré peuvent disparaître lors d'une forte pluie ou de vent important. Ils préconisent de garder les animaux en stabulation 6 semaines avant le transfert et jusqu'à huit semaines après.

3. Les critères de santé.

Le problème se pose pour les maladies sub-cliniques dans la mesure où on ne choisira pas un animal malade pour recevoir un embryon.

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

La recherche des maladies légalement réputées contagieuses est quand à elle obligatoire (arrêté du 11 août 1994).

4. Le mode de synchronisation des chaleurs

a) Différentes techniques

i. Une double injection de prostaglandines

Cette technique facile à mettre en œuvre, économique, mais la détection des chaleurs est indispensable pour vérifier que le corps jaune palpé date bien de 7 jours. On peut aussi les utiliser 48 heures avant le retrait d'un implant ou d'une spirale. Leur effet lutéolytique permettrait de mieux synchroniser les ovulations (Grimard et al., 1998). Les prostaglandines F_{2α} sont des agents agent lutéolytiques qui induisent une chute du taux de progestérone circulante et un relargage de gonadotropines par l'hypophyse, ce qui provoque un retour en chaleurs anticipé. Il n'y a pas d'effet négatif sur la fertilité de l'œstrus obtenu après un traitement aux prostaglandines. Il faut cependant noter que la sensibilité du corps jaune aux prostaglandines atteint 90% seulement s'il est âgé de 7 à 9 jours au moins. Des corps jaunes trop jeunes donnent donc de mauvais résultats, d'où l'intérêt de pratiquer plusieurs injections, la seconde ayant toujours lieu sur un corps jaune âgé.

Il existe plusieurs protocoles :

- Programme avec deux injections systématiques

C'est un protocole à double injection (décalées de douze jours) qui permet d'avoir un fort pourcentage d'animaux en diœstrus lors de la seconde injection. L'œstrus se produit entre deux et cinq après cette seconde injection.

Il faut vérifier au préalable par palpation des ovaires que les animaux sont cyclés, seuls aptes à répondre au traitement. Avec une insémination à 72 et une à 96 heures après la seconde injection, on a des taux de gestation satisfaisants, la meilleure méthode étant bien sûr d'inséminer sur chaleurs observées. En effet, l'intervalle n'est pas fixe entre la deuxième injection et l'oestrus car le temps que prend le retour en chaleurs est dépendant du stade de la vague folliculaire au moment de l'injection. Si la vache se trouve en début de phase folliculaire, le follicule dominant apparaîtra plus tard et les chaleurs peuvent n'être visibles que 5 jours après la seconde injection. Si elle est plutôt en fin de vague, le follicule étant proche du stade préovulatoire, les chaleurs auront lieu dans les 2 jours après la seconde injection. En transfert d'embryons où les lots de receveuses contiennent à la fois des vaches et des génisses, cela peut être à l'origine de décalages entre les donneuses et les receveuses.

- Programme en une injection.

On traite avec une seule injection tous les animaux qui ont un corps jaune et on insémine sur chaleurs observées. Comme précédemment, il existe une grande variation individuelle dans la durée de retour en chaleur.

D'autres facteurs sont susceptibles de faire varier le taux de réussite de la synchronisation avec cette méthode. Tout d'abord il faut que les vaches soient toutes cyclées pour que l'injection fasse effet. Or ceci n'est pas toujours le cas. Un défaut de rationnement après vêlage peut être à l'origine d'un anoestrus prolongé, par inhibition du relargage de gonadotropines par l'hypophyse. Pour vérifier la cyclicité du troupeau, il faut l'observer durant cinq jours consécutifs : si sur cette période moins de 24% des animaux ont été vus en chaleur, c'est que le taux de cyclicité n'est pas bon, ou que l'observation des chaleurs est défectueuse (Wenkoff, 1986).

ii. Utilisation des progestagènes

Les progestagènes permettent la synchronisation de cycles en induisant un rétrocontrôle sur la sécrétion de LH par l'hypophyse. La levée de l'inhibition à la fin du traitement (lors du retrait des progestagènes) favorise l'induction de l'ovulation par libération importante de gonadotropines mais aussi par augmentation du nombre de récepteurs à la

LH sur les cellules de la granulosa. Les progestagènes sont disponibles en France sous deux formes galéniques : les spirales vaginales et les implants auriculaires.

- les spirales vaginales (PRID®) :

Elle sont moins traumatisantes pour l'animal mais elles donnent une dispersion plus importante des débuts d'œstrus que les implants. La spirale contient 1,55 g de progestérone relarguée régulièrement pendant 10 à 12 jours.

- les implants (Crestar®) :

Ils peuvent présenter quelque danger à la pose pour l'opérateur, mais la synchronisation est plus précise. C'est la technique qui est utilisée de préférence, les complications éventuelles sont rares (perte de l'implant ou difficulté à le retirer).

L'implant contient 3 mg de norgestomet qu'il libère de façon régulière pendant 9 à 10 jours. Au moment de la pose de l'implant, une surcharge de 3 mg de norgestomet est injectée par voie intra-musculaire.

Aux implants et aux spirales est associée une administration d'œstrogènes : 5 mg de valérate d'œstradiol par voie intra-musculaire pour les premiers, et 10 mg de benzoate d'œstradiol par voie intra-vaginale pour les seconds. Leurs rôles sont d'entraîner une régression des éventuels corps jaunes présents chez les femelles cyclées, et de provoquer l'atrésie des gros follicules pour permettre à une nouvelle vague de démarrer. Ils améliorent ainsi la synchronisation des vagues folliculaires entre les animaux.

Neuf jours plus tard, on enlève l'implant ou la spirale et l'hypophyse qui ne subit plus de rétrocontrôle négatif libère à nouveau des gonadotropines. L'œstrus se produit en 24 à 36 heures. On peut inséminer une seule fois en aveugle entre 48 et 54 heures après le retrait sans que le taux de gestation soit inférieur à celui que l'on obtient sur chaleurs observées.

En plus, une injection de PMSG peut être associée à ces progestagènes : une dose de 400 à 600 UI au retrait d'un implant permet d'améliorer le taux d'ovulation. Elle agit en stimulant la synthèse d'œstradiol et stimule la croissance folliculaire.

- b) Influence du mode de synchronisation sur la réussite du transfert.

Chagas e Silva et al. (1999) ont mené une étude sur des vaches laitières de race Holstein. Dans cette étude, les embryons ont été transférés soit sur chaleurs naturelles, soit sur chaleurs synchronisées avec un im

D'autre part, les mêmes auteurs considèrent qu'il faut respecter un intervalle de 60 jours entre le vêlage et le début du traitement pour une multipare, et 70 pour une primipare.

d) Amélioration des résultats

i. Par des traitements complémentaires

On peut modifier le protocole de traitement afin de le rendre plus efficace : l'utilisation de prostaglandines 48 heures avant le retrait de l'implant améliore la fertilité à l'œstrus induit (Mialot et al., 1998).

ii. En améliorant la détection des chaleurs

La surveillance des mouvements des animaux et de leur comportement est le moyen le plus simple de détecter les chaleurs. Cela peut se faire par observation directe ou au moyen de caméras de surveillance.

Pour augmenter la sensibilité de la détection, on peut utiliser des indicateurs de monte ou des podomètres. Les inconvénients de ces méthodes sont le coût et les faux négatifs ou faux positifs.

Selon Broadbent et al.(1991), le moyen le plus fiable pour ne pas rater de chaleurs est le suivi hormonal des animaux (consistant en un dosage de la progestérone), mais il pose le problème du coût de réalisation.

La méthode présentant la plus grande efficacité par rapport au coût et à la facilité de mise en place reste donc l'observation, qui doit être répartie régulièrement au cours de la journée et ne coïncider ni avec les repas, ni avec les traites où le comportement des animaux est modifié.

Nous venons de voir comment la qualité des receveuses pouvait être modifiée par son mode de préparation. Nous allons à présent étudier dans quelle mesure les examens cliniques et paracliniques le jour du transfert peuvent permettre de sélectionner les meilleures d'entre elles.

D. Facteurs liés à l'évaluation des receveuses au moment du transfert.

Avant chaque opération de transfert d'embryons, l'opérateur s'assure de la bonne venue en chaleur des receveuses et contrôle leur état général. Les premiers actes lors de l'arrivée dans l'élevage sont donc le recueil des commémoratifs sur l'éventuelle venue en chaleur des receveuses, puis la réalisation d'un examen clinique sur chacune d'entre elles.

Un examen de l'appareil génital a ensuite lieu pour vérifier que celui-ci est compatible avec un transfert d'embryons. Une palpation transrectale est réalisée pour vérifier la présence d'un corps jaune et le latéraliser le cas échéant. L'aspect des cornes est aussi évaluée, elles ne doivent pas présenter de contenu liquidiens, signe de métrite ou de gestation. Seules les receveuses présentant un corps jaune palpable sont retenues, toutes les autres sont éliminées. D'après Escouflaire (1998a), il faut considérer que le plus petit des deux ovaires présente le volume initial de l'ovaire qui fonctionne. Il faut ensuite vérifier que la différence de taille entre les deux ovaires est bien due à un corps jaune (dont la consistance est plutôt granuleuse) et non à des follicules (lisses et glissants). D'autre part, il ne faut pas confondre l'aspect granuleux d'un corps jaune avec celui d'éventuels corps blancs résiduels.

La palpation des ovaires est une technique simple mais dont la précision est limitée. On peut la compléter par des examens complémentaires pour mieux évaluer les structures palpées.

1. L'échographie.

Elle permet d'apprécier plus précisément la taille du corps jaune porté par l'ovaire. Hasler et al. (1987) ne relataient cependant aucune influence de la taille du corps jaune sur le futur taux de gestation. Remsen et al. (1982) étaient arrivés à la même conclusion quelques années auparavant, de même que Niemann et al. (1985).

Spell et al. (2001) ont mesuré le diamètre du corps jaune et de la cavité qu'il contenait sur 763 receveuses potentielles. Ils ont également étudié la taille et la position du follicule dominant. Leur conclusion est que le taux de gestation ne dépendait ni de la taille du corps jaune ni de la taille de la cavité qu'il contenait. Le fait que le follicule

dominant soit sur le même ovaire ou non n'influençait pas non plus le taux de gestation dans leur étude.

Cet examen complémentaire n'est donc pas indispensable à l'évaluation de la receveuse, même s'il permet d'objectiver la présence d'un corps jaune.

2. Le dosage de la progestérone

Une étude a été menée en France sur 134 animaux par Thaunat et al. (1999) sur des génisses et des vaches de race Normande et Holstein. Une échographie des ovaires était réalisée 6 jours après l'œstrus sur toutes les femelles venues en chaleur entre 24 et 48 heures après le retrait d'un implant Crestar®. Le transfert avait lieu à J7 avec des embryons frais de qualité 1 à 3, J0 représentant le jour des chaleurs. Un dosage de la progestérone a lui aussi été réalisé à J6.

Le diagnostic de gestation s'est fait par échographie à J30. Les résultats sont les suivants :

La progestéronémie à J6 et la présence d'une cavité au sein du corps jaune n'influencent pas la gestation. Par contre la présence d'un follicule de plus de 10mm de diamètre à J6 a tendance ($p=0,06$) à faire chuter le taux de gestation.

Le dosage de la progestérone avant le transfert pourrait permettre de vérifier et de quantifier la fonctionnalité du corps jaune, et ainsi de prévoir une capacité à produire une gestation après transfert. Une étude a été menée au Portugal chez des femelles laitières (Chagas e Silva et al., 1999). Les auteurs ont dosé la progestérone le jour de l'œstrus, 4 jours plus tard, le jour du transfert (J7) et trois semaines après l'œstrus (J21). Ils ont trouvé que les génisses avaient une progestéronémie significativement supérieure à celle des vaches mais un taux de gestation non significativement différent. D'autre part, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les taux à J0, J4 et J7, qu'il y ait eu ou non gestation. De grandes variations individuelles ont pu cependant être observées par les auteurs.

Par contre, la progestéronémie à J 21 montrait de grandes différences entre les gestantes et les non gestantes ($p<10^{-5}$). Ceci est dû au fait que la présence d'un embryon maintient les fonctions lutéales de la receveuse, alors qu'à cette date les femelles non gestantes ont subi la lutéolyse.

Aucune influence de la progestéronémie à J7 ou avant sur l'efficacité du transfert à venir n'a donc pu être mise en évidence dans cette étude.

Spell et al (2001) ont eux aussi mesuré par échographie la diamètre du CJ et ont parallèlement mesuré le taux de progestérone dans le sang. Ils ont observé que le diamètre du corps jaune augmentait entre 6,5 et 8,5 jours après l'œstrus ($p<0,02$) mais que les taux de gestation correspondant à des transferts à ces différents stades ne montraient pas de différence significative.

Les auteurs ont cependant trouvé un lien entre le diamètre du corps jaune et le taux de progestérone, indépendamment du moment du cycle où se faisait la mesure. Ils ont calculé une régression linéaire du nuage de points obtenu avec en abscisse la longueur du corps jaune en centimètres et en ordonnées la concentration sanguine en progestérone en ng/ml. L'équation de cette droite de régression est :

$$Y = 0,491X + 3,0436.$$

Il est vrai que la pente de la droite est faible mais les deux mesures sont liées ($p<0,01$).

Aucune différence de concentration en progestérone ou de taille de corps jaune au moment du transfert n'a été observée entre les animaux qui seront gestants et ceux qui ne le seront pas. Les animaux non gestants avaient plus souvent un corps jaune cavitaire que les autres au moment du transfert, mais l'écart n'est pas significatif.

Les auteurs expliquent que l'évaluation par palpation transrectale du corps jaune conduit à qualifier de mauvais les corps jaunes avec une cavité de diamètre supérieur à 11 mm, en raison de leur consistance molle. Ils n'ont cependant pas trouvé de chute du taux de gestation associé à la présence de ce corps jaune cavitaire par rapport à un corps jaune plus ferme à la palpation, donc avec une cavité réduite ou inexistante.

Ils concluent donc que le seul critère valable concernant le corps jaune est le fait qu'il soit palpable, sans tenir compte ni de sa taille ni de sa consistance.

Smith et al. (1996) n'ont pas obtenu d'effet notable sur le taux de gestation après administration de progestagènes exogènes sous forme d'implant auriculaire (Crestar®) au moment du transfert. Ils n'ont pas trouvé de différence de progestéronémie entre les animaux qui allaient développer une gestation et les autres. Ils espéraient surtout avoir un effet bénéfique de l'implant sur les animaux qui avaient la progestéronémie la plus basse au moment du transfert, mais cela n'a pas été le cas. Au contraire, une amélioration du taux de gestation a été observée pour des animaux ayant des taux de progestérone élevés (supérieurs à 7,5 ng/ml), mais cette amélioration n'était pas

significative. Les auteurs pensent que ce résultat inattendu est à mettre en relation avec le fait que la progestérone exogène apportée par l'implant provoque une modification de la progestérone endogène.

Ils n'ont pas non plus trouvé d'influence significative du taux de progestérone sur le taux de gestation des receveuses.

Une étude menée par Farin et Farin (1995) a montré un lien entre la progestéronémie le jour du transfert et le taux de gestation après transfert d'embryons frais. Ainsi les animaux qui ont eu une gestation avaient une progestéronémie plus faible ($p<0,04$), avec une moyenne de 3,8 ng/ml et un écart type de 0,5 ng/ml que ceux qui ont aborté (6,2 +/- 0,6 ng/ml).

L'influence de la progestérone sur le taux de gestation est donc discutée.

3. La synchronisation entre l'embryon et la receveuse

Spell et al (2001) ont observé une tendance à l'amélioration du taux de gestation pour des receveuses en retard de 12 à 24 heures par rapport aux donneuses en comparaison des résultats obtenus si elles sont en avance de plus de douze heures. Cet écart n'est cependant pas significatif en raison du trop faible nombre d'animaux décalés de plus de douze heures dans cette étude. Il n'y avait pas d'écart significatif entre des receveuses ayant moins de douze heures d'écart avec les donneuses, qu'elles soient en retard ou en avance.

Coleman et al. (1987) n'ont pas non plus observé de différence significative entre les taux de gestation suite à des transferts réalisés avec moins de 36 heures de décalage entre les chaleurs de la donneuse et celles de la receveuse. Il semble donc que le taux de gestation ne soit pas influencé par une désynchronisation entre la receveuse et l'embryon, pourvu que celle-ci soit inférieure à 24 ou 36 heures.

Geisert et al. (1991) ont étudié la possibilité d'implanter un embryon de 8 jours sur une receveuse à 5 jours de son cycle. Ils ont pris trois groupes d'animaux. Le premier était constitué de receveuses à 8 jours de leur cycle recevant des embryons de stade comparable, et le deuxième de receveuses à 5 jours recevant des embryons de 8 jours. Dans le troisième, les receveuses à 5 jours recevaient en plus des injections de progestérone (100 mg IM). Ces injections commençaient 36 heures après les chaleurs et se poursuivaient toutes les 24 heures jusqu'au quatrième jour après les chaleurs.

Aucune différence significative n'a été observée entre le taux de gestation des receveuses synchronisées et celles qui recevaient de la progestérone. Par contre, les receveuses décalées par rapport à l'embryon et ne recevant pas d'injections de progestérone présentaient un taux de gestation moyen significativement plus faible ($p<0,01$, 4,8% contre 61,1 pour le lot synchronisé et 47,4% pour le lot désynchronisé et traité).

Les vaches recevant un traitement présentaient des taux de progestérone supérieurs à ceux des animaux des deux autres groupes.

Ils en concluent donc que des embryons plus « âgés » que la receveuse sont transférables avec succès, à condition de traiter préalablement les femelles avec de la progestérone. Celle-ci n'aurait pas seulement un rôle sur les sécrétions utérines, mais elle influencerait, toujours selon les mêmes auteurs, la maturation du corps jaune et la synthèse des prostaglandines. En fait, en début de gestation, l'interaction avec le conceptus provoque une chute de la sécrétion de prostaglandines par l'utérus. Ce phénomène serait dû à la synthèse d'un inhibiteur intracellulaire de la synthèse des prostaglandines dans l'endomètre (EPSI), selon Basu et al. (1987) cités par Thatcher et al (1989) : l'activité de l'EPSI est plus importante chez des vaches gestantes de 17 jours que chez des vaches cyclées. La synthèse de cet EPSI est régulée par un complexe protéique sécrété par le conceptus : le complexe de la protéine bTP-1 (bovine Trophoblast Protein-1). C'est ainsi qu'un embryon bovin évite la sécrétion de prostaglandines et que la fonctionnalité du corps jaune est maintenue. La synthèse de la bTP-1 ne peut se faire que pour des embryons de plus de 15 mm de long. Il est donc nécessaire pour sa survie qu'un embryon ait atteint cette taille au moment où le corps jaune commence à voir ses fonctions diminuer, c'est à dire à environ 15-17 jours de gestation.

Or c'est ce qui peut se produire en cas de stress important : Biggers et al (1987) ont observé que le développement d'un embryon pouvait être de 50% inférieur à la moyenne si la mère était soumise à un stress thermique important au cours de la deuxième semaine de gestation.

Comme le concluent Geisert et al. (1991) , on peut envisager de transférer un embryon plus « âgé » que la receveuse, à condition de lui administrer un traitement hormonal adapté. Ils expliquent également que l'inverse n'est pas possible : un utérus décalé de trois jours ne produirait pas les signaux nécessaires à une bonne maturation de l'embryon.

4. Traitement de la receveuse après transfert.

a) Utilisation du GnRH

Le GnRH est une hormone hypothalamique qui agit sur l'hypophyse en provoquant la synthèse de gonadotropines, FSH et LH, lesquelles exercent des actions sur l'ovaire. En particulier, LH exerce un rôle lutéotrope, favorisant la synthèse de progestérone.

Ellington et al. (1991) ont cherché à savoir si une hormone comme la buséréline (anologue de la GnRH) pouvait permettre d'améliorer le taux de gestation après un transfert d'embryons, en augmentant le taux de progestérone circulante. Comme l'exposent Thatcher et al. (1989), des injections multiples de buséréline après le douzième jour du cycle permettent de faire augmenter le taux de progestérone. Ellington et al. (1991) ont cherché à savoir si cet effet pouvait se retrouver plus tôt dans le cycle et augmenter alors le taux de progestérone circulante.

Ils ont réparti 764 receveuses en trois groupes, un groupe témoin, un groupe où les receveuses recevaient 8 µg de buséréline au moment du transfert et un dernier où elles recevaient 8 µg de buséréline de 4 à 7 jours avant le transfert, quotidiennement.

Ils n'ont pas observé de différence significative entre les taux de gestation des trois groupes, et les taux de progestérone étaient également semblables.

Leur conclusion est que le rôle lutéotrope de la buséréline n'a pas permis d'obtenir des gestations supplémentaires. L'administration de buséréline pourrait cependant avoir un intérêt dans le cas de transfert désynchronisés (voir paragraphe précédent)

Pierson et al. (1987) ont utilisé la buséréline à des stades plus tardifs pour connaître son influence sur le cycle sexuel de la vache. Ils ont commencé les injections à J 12 et continué tous les trois jours jusqu'à J 48 post-oestrus. Ils ont observé un allongement significatif de l'intervalle avec les chaleurs suivantes, montrant un allongement de la durée de vie du corps jaune. L'intérêt de ce constat pour la transplantation embryonnaire est double : tout d'abord en augmentant la durée de vie du corps jaune, on peut avoir une meilleure réponse au traitement de synchronisation des chaleurs par les prostaglandines, puisqu'on aura plus d'animaux au même stade physiologique. De plus, il est possible qu'en réduisant la sensibilité du corps jaune aux prostaglandines au cours de la gestation, la buséréline aide au maintien du corps jaune

en attendant que l'embryon soit capable de synthétiser de la bTP-1, ou dans le cas où cette synthèse est insuffisante.

Thatcher et al. (1989) considèrent que la buséréline semble retarder la lutéolyse et limiter la sécrétion d'oestradiol, donc limiter la quantité de prostaglandines F2 α émises par l'utérus.

Macmillan et al. (1986) ont montré que des vaches qui recevaient 10 µg de buséréline à 11, 12 et 13 jours après insémination avaient des taux de gestation plus important que le lot témoin. Il semble donc que les effets de cette hormone soient plus notables à partir du 11^{ème} ou 12^{ème} jour du cycle, puisque les résultats d'Ellington et al. (1991) ne provoquent pas de modification de la sécrétion de progestérone.

Thatcher et al. (1989) ont transféré des morulas et des blastocytes de très bonne qualité sur des receveuses, de 9,5 à 14,5 jours après l'oestrus, donc en retard de plusieurs jours par rapport au stade de l'embryon. Leur corps jaune était donc beaucoup plus fragile et susceptible d'être lysé rapidement. Des injections de buséréline (Réceptal®) à raison de 8 µg par voie IM ont eu lieu tous les trois jours, du douzième jour du cycle jusqu'au douzième jour après transfert. Sur 18 embryons transférés, une seule gestation a été obtenue mais avec mort embryonnaire à J 42. Le point intéressant est que le retour en chaleur de ces animaux a eu lieu à une date beaucoup plus tardive que pour des animaux cyclés traités, ce qui semble indiquer que la GnRH a une action sur la durée de vie du corps jaune. Ceci est en accord avec ce que nous avons vu précédemment. Ils espèrent pouvoir mettre au point une méthode qui aboutirait à la création de receveuses universelles, qui n'auraient plus besoin d'être synchronisées.

b) utilisation de l'hCG

L'hCG est une hormone qui a une action de type LH uniquement, c'est-à-dire qu'elle provoque l'ovulation d'un ou des follicules et qu'elle favorise le développement du corps jaune.

Nous avons vu que la mortalité embryonnaire se produisait plutôt entre 17 et 25 jours après l'oestrus, en raison de la baisse de la progestéronémie.

Nishigai et al. (2002) ont voulu étudier l'influence de l'hCG sur le taux de gestation. Ils ont montré au cours d'une expérience précédente qu'une injection d'hCG à la dose de 1500 UI en IM 5 jours après l'ovulation provoque l'augmentation du taux de

progesterone et la diminution du taux d'œstrogènes (Nishigai et al., 2001). Ils ont également montré que le diamètre du corps jaune augmentait de façon significative.

Leur hypothèse est qu'une telle injection devrait favoriser l'implantation de l'embryon et son maintien au-delà de la période critique de 17-24 jours.

Ils ont utilisé 120 receveuses primipares ou multipares qu'ils ont divisé au hasard en trois groupes de quarante animaux : groupes A, B et C. Les animaux du groupe A ont reçu une injection de 1500 UI d'hCG par voie IM au premier jour après les chaleurs. Ceux du groupe B ont reçu la même injection mais au sixième jour de leur cycle, et ceux du groupe C une injection de 5 ml de chlorure de sodium en IM à la même date.

Les embryons utilisés étaient des embryons au stade morula et blastocyte congelés dans une solution utilisant le glycérol comme cryoprotecteur. Les auteurs n'ont choisi que des embryons de bonne qualité après décongélation et tous les transferts ont eu lieu au septième jour après les chaleurs.

Leur protocole prévoyait des prises de sang à J6, J7, J14 et lors du diagnostic de gestation par palpation transrectale entre 40 et 50 jours, pour mesurer la progesteronémie et le taux d'œstrogènes circulants.

Le taux de gestation dans le groupe B (67,5%) a été significativement supérieur à celui observé dans les deux autres groupes ($p<0,05$).

Les auteurs n'ont cependant observé qu'une tendance à l'augmentation de la progesteronémie dans le groupe B par rapport aux deux autres groupes lors des trois premières mesures. Elle était par contre significativement supérieure dans ce même groupe ($p<0,05$) lors du diagnostic de gestation, entre 40 et 50 jours après les chaleurs.

Leur mesure du taux d'œstrogènes a donné des résultats plus intéressants : la concentration moyenne pour le groupe B était significativement inférieure à celle mesurée dans les deux autres groupes à J7 et J14 ($p<0,05$). Cette différence n'était cependant plus significative au jour du diagnostic de gestation.

Ils en concluent que la fonction luteale et le taux de gestation sont liés lors de transfert d'embryons congelés, puisque le taux de gestation et le taux de progesterone circulante augmentaient parallèlement. Selon eux, le taux de gestation augmente quand le rapport E2/P chute chez les vaches laitières, et une autre étude menée par Ayalon (1978) chez les vaches allaitantes montre que la proportion d'embryons qui dégénèrent augmente quand le taux d'œstrogènes est élevé 3 ou 4 jours après IA.

Leur conclusion finale est que l'administration de 1500 UI d'hCG au sixième jour du cycle permettait d'améliorer le taux de gestation obtenu après transfert d'embryons congelés au septième jour du cycle.

Il existe donc différents moyens d'améliorer potentiellement la qualité d'une receveuse. L'étape ultime et sans doute la plus importante dans la préparation de ces animaux est la détection des chaleurs sans laquelle aucune information précise sur le cycle de ces animaux n'est disponible, rendant plus difficile la confirmation de leur cyclicité et la synchronisation avec l'embryon. En effet, les résultats des études présentées ici nous montrent que ni la préparation des receveuses avant transfert ni un traitement hormonal après transfert n'autorisent une désynchronisation importante entre l'embryon et la receveuse, sous peine de voir le taux de gestation diminuer.

Si on devait souligner deux critères qui paraissent être primordiaux en ce qui concerne le choix des receveuses, il s'agirait de l'alimentation ainsi que du suivi des chaleurs.

Il est souvent difficile sur le terrain d'avoir des renseignements précis sur ces deux facteurs, notamment en clientèle car les éleveurs qui ne pratiquent qu'occasionnellement le transfert embryonnaire ne sont pas toujours habitués aux exigences techniques de ce type de manipulation.

En ce qui concerne l'embryon, seules la qualité et le mode de conservation semblaient avoir une influence significative sur le taux de gestation après transfert par voie cervicale. Nous allons à présent étudier les facteurs de réussite d'une campagne de transfert embryonnaire au cours d'une étude de terrain réalisée dans une clientèle vétérinaire de la région Bourgogne.

**DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE
RETROSPECTIVE**

**ETUDE DES FACTEURS DE VARIATION
DE LA REUSSITE DU TRANSFERT
D'EMBRYONS DE BOVINS EN RACE
CHAROLAISE**

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

RETROSPECTIVE

ETUDE DES FACTEURS DE VARIATION DE LA REUSSITE DU TRANSFERT D'EMBRYONS DE BOVINS EN RACE CHAROLAISE

L'objectif de ce travail est d'identifier les facteurs de variation de la réussite d'un transfert d'embryons en tenant compte des facteurs liés à l'embryon et à la receveuse. Il s'agit d'une étude rétrospective, effectuée à partir des résultats de 6 mois de transfert d'embryons réalisés par un vétérinaire praticien, membre d'une équipe agréée de transplantation embryonnaire en région Bourgogne.

I) Matériel et Méthodes

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 GIE (Groupement d'Intérêt Economique) 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 et 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, le Dr Jacques Manière. Depuis, une antenne a été créée dans le département de la Saône-et-Loire par un second

vétérinaire praticien, le Dr Eric Salmson, qui y réalise les prestations de Charolais Embryons.

B. Population d'étude

Cette étude regroupe les résultats recueillis à partir de 360 transferts d'embryons, tous de race charolaise. Les receveuses, elles, étaient principalement de deux races : Normande ou Charolaise. Ces transferts ont eu lieu entre février 1999 et juillet 1999.

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

- critères sanitaires collectifs : appartenance à un cheptel officiellement indemne de tuberculose, de brucellose et de leucose.
- critères sanitaires individuels : être indemne, à l'issue de la visite préliminaire, de toute pathologie et en particulier de pathologie de l'appareil génital.

C. Protocole d'étude

Ce paragraphe présente les différents protocoles suivis par le vétérinaire pour congeler et transférer les embryons.

1. Préparation des paillettes contenant les embryons.

Après rinçage des cornes utérines de la donneuse, les embryons sont récoltés dans un flacon contenant environ 1 litre de milieu de collecte (composé d'un tampon phosphate et d'albumine, IMV technologies, article ZT156).

Les flacons de chaque vache collectée sont ramenés au domicile du vétérinaire pour les manipulations. La pièce où se trouve le matériel est chauffée à environs 25°C pendant les opérations de collecte. Au retour, les différents instruments et les différents milieux dans lesquels vont passer les embryons sont tous placés à cette même température.

a) Matériel nécessaire.

Il se compose d'un microscope binoculaire auto-illuminé, au pouvoir grossissant variable de 16 à 80 fois ainsi que d'une boite à plateau chauffant de 50cm x 30cm x 30 cm, avec une plaque d'aluminium au fond et un dessus en verre pour avoir une illumination correcte.

Le chauffage se fait au moyen d'une résistance de terrarium enroulée en spirale comportant un thermostat réglé à 25°C et placée au contact d'une grille pour améliorer la conduction de la chaleur. Ce dispositif est placé sous la plaque d'aluminium. Un thermomètre est ajouté au contact de la plaque pour vérifier la température. C'est là que les différents milieux seront placés au cours de la manipulation.

Un filtre de 75 µm (IMV, article ZA 170) permet de collecter les embryons à partir du milieu de collecte.

Une micropipette est utilisée pour la manipulation des embryons et leur passage d'un milieu à un autre. Elle est fabriquée à partir de fins tubes capillaires étirés sous une flamme. Leur extrémité est ainsi la plus fine possible. Ils sont ensuite coupés à la longueur désirée et stérilisés 30 min à 200°C . On y ajuste par la suite un petit tube en caoutchouc dépressible permettant l'aspiration des embryons.

Deux types de boites de Pétri sont également nécessaires : des boites quadrillées de 10cm x 10cm (IMV, article XA622) et d'autres, rondes et non quadrillées, de 3,5cm de diamètre (IMV, article XA 621).

Le milieu de conservation des embryons contient un tampon phosphate, de l'albumine, des antibiotiques et un antifongique (IMV, article ZA 454).

Des paillettes de 0,25 ml mesurant 133 mm de long sont utilisées. Deux modèles différents sont nécessaires : des jaunes pour les embryons congelés dans de l'éthylène glycol (IMV, article 006430) et des incolores pour les congélations dans du glycérol (IMV, article 006300). Elles sont identifiées au moyen d'embouts plastifiés (IMV, article ZA510).

b) Méthode

Le contenu de chaque flacon de collecte est versé au travers du filtre. Ce filtre est alors rincé trois fois avec du milieu de collecte et le liquide est recueilli dans une boite de Pétri quadrillée qui est placée sous le microscope. Chaque boite ainsi remplie est lue deux fois au faible grossissement (X 10) et tous les embryons trouvés sont placés dans une boite de pétri ronde contenant du milieu de conservation.

Au fort grossissement, les embryons sont plus facilement observables. Ils sont prélevés un par un pour être placés dans une boite de Pétri. Cette opération est répétée 10 fois, ce qui permet un bon rinçage des embryons par dilution des impuretés qui peuvent provenir des voies génitales femelle où ils ont été prélevés.

A la fin de cette opération, chaque boite de Pétri contient un embryon et un seul.

Trois choix sont alors possibles : soit l'embryon est monté directement dans une paillette pour un transfert en frais, soit il est congelé, dans du glycérol ou dans de l'éthylène glycol. C'est la qualité de l'embryon (évaluée selon les critères de l'IETS) qui détermine son devenir : seuls les embryons de qualité 1 sont congelés, les embryons de qualité 2 ou 3 sont transférés en frais. Les embryons de qualité 4 sont systématiquement éliminés.

i. Préparation pour transfert en frais

Le nombre de transferts frais réalisés dépend du nombre de receveuses effectivement disponibles : toutes celles qui ont été préparées ne sont pas forcément venues en chaleur comme prévu ou n'ont pas de corps jaune palpable.

La paillette est réalisée en intercalant deux bulles de milieu de conservation de part et d'autre de l'embryon (figure 4).



Figure 4 : Configuration d'une paillette pour un transfert direct.

Légende :

: milieu de conservation

: air

: embryon

: bouchon

Si besoin la paillette peut être identifiée par un marquage au feutre avant d'être placée dans un pistolet de transfert.

Si la collecte a fourni plus d'embryons transférables qu'il n'y avait de receveuses disponibles, les embryons en surabondance sont congelés. Le choix entre les deux types de congélation se fait en fonction du stade de l'embryon : un embryon jeune (morula ou jeune blastocyste) sera plutôt congelé dans du glycérol, tandis qu'un embryon plus âgé (blastocyste épanoui) sera congelé dans de l'éthylène glycol. Ces critères ne sont cependant pas absolu et peuvent varier en fonction des récoltes.

ii. congélation dans de l'éthylène glycol

Les embryons sont placés dix minutes dans une solution contenant de l'éthylène glycol à la concentration de 1,5 mol/l, puis la paillette est montée avec une bulle d'air de part et d'autre de l'embryon (configuration similaire à celle présentée sur la figure 2). Les paillettes sont ensuite placées dans un congélateur programmable (L'Air Liquide MS21) pré-refroidi à -6°C. Elles restent dix minutes à cette température puis le congélateur est rouvert pour une induction de cristallisation (les paillettes sont mises en contact avec une tige métallique dont l'extrémité était placée dans l'azote liquide). Il faut alors attendre le retour à -6°C avant d'amorcer la courbe de descente de 0,4°/minute jusqu'à -30°C. Les paillettes sont finalement immergées dans de l'azote liquide.



iii. congélation dans du glycérol

Les embryons sont placés 20 minutes dans le milieu de conservation contenant du glycérol à 10%. On monte ensuite la paillette avec une bulle d'air de part et d'autre de l'embryon (comme le montre la figure 1). La congélation a lieu selon le même mode que pour l'éthylène glycol.

2. La décongélation des embryons.

Les embryons sont stockés dans deux bonbonnes contenant de l'azote liquide et conservées au domicile du vétérinaire praticien. Une réserve plus importante existe à la ferme du Maraud.

Chaque bonbonne contient plusieurs canisters où sont classés les embryons. Les embryons de chaque éleveur sont identifiés au moyen d'une couleur particulière et regroupés dans le même canister. Un fichier informatique permet la gestion des stocks.

a) Cas des embryons congelés dans du glycérol.

Si le transfert a lieu dans une zone proche du lieu de stockage des embryons (moins de 10 minutes de déplacement), les embryons sont décongelés dans une pièce spécialement aménagée au sous-sol de l'habitation du vétérinaire. Si par contre l'élevage est plus éloigné, les manipulations ont lieu sur place pour éviter d'avoir à laisser trop longtemps les embryons dans le milieu de conservation avant le transfert.

Le principe de toute congélation d'embryons est de déshydrater les cellules pour ne pas qu'elles explosent lors de la dilatation de l'eau au cours de son changement d'état. L'eau des cellules est alors progressivement remplacée par un autre produit cryoprotecteur. Lors de la décongélation, il faut faire rentrer l'eau dans les cellules et en faire sortir le glycérol progressivement.

i. matériel nécessaire.

Tout le matériel décrit ci-dessous est transporté sur le lieu de transfert si celui-ci est trop lointain.

La bonbonne contenant les embryons est placée à l'arrière du véhicule avec le matériel nécessaire au transfert :

- La boite et le microscope qui ont servi aux opérations de congélation des embryons,
- Un récipient isotherme contenant de l'eau à 28°C, et un thermomètre pour contrôler cette température,
- Des boites de Pétri de 35 x 10 mm pour placer les différents milieux de décongélation et de culture des embryons,
- Des milieux de décongélation des embryons qui sont au nombre de trois : le premier contient 6,6% de glycérol, le deuxième 3,3% et le dernier n'en contient pas. Il contiennent tous trois 0,25 mol/L de saccharose. Ils sont fournis par IMV technologies (articles 006698, 006699, 006700),
- Un milieu de conservation contenant un tampon phosphate, des antibiotiques et un antifongique. (IMV technologies, article 002163),
- Des micropipettes pour la manipulation des embryons et leur passage d'un milieu à un autre,
- Un minuteur (les changements de milieux se font toutes les cinq minutes),
- Une pipette automatique pour vider le contenu de la paillette dans une boite de Pétri après la décongélation,
- Des pistolets de transfert portant des pastilles de couleurs différentes avec des gaines stériles et des chemises sanitaires pour la réimplantation des embryons,
- Une caisse à tiroirs pour ranger tout le petit matériel nécessaire (thermomètres, rallonge électrique, prise de courant, prise multiple, ciseaux, pinces).

ii. technique de décongélation et de montage des paillettes de transfert.

Les différents milieux sont tout d'abord placés dans la boîte chauffante pour les porter à une même température.

La préparation du reste du matériel a lieu pendant ce temps : positionnement et réglage du microscope, préparation des boîtes de Pétri que l'on met également à chauffer, vérification de l'emplacement des paillettes dans la bonbonne, et enfin préparation du récipient isotherme avec de l'eau à 28°C.

Chacun des trois milieux de dilution du glycérol est placé dans une boîte de Pétri, à raison de 2,5 à 3 ml par boîte. Pour décongeler deux paillettes, deux séries de trois boîtes sont nécessaires. Les flacons de milieu ayant une contenance de 5ml, il serait théoriquement possible de décongeler jusqu'à trois paillettes en même temps, mais cela exige trop de manipulations.

Trois boîtes de Pétri sont remplies avec du milieu de conservation (2 à 3 ml).

Une fois ces préparatifs terminés, la décongélation d'une paillette peut avoir lieu.

Une paillette congelée est saisie et placée dans de l'eau tiède une dizaine de secondes, le temps d'en décongeler le contenu. Une extrémité du tube est sectionnée et introduite dans la pipette automatique. L'autre extrémité est à son tour sectionnée le contenu de la paillette est vidé dans une boîte de Pétri, en différenciant chacune des trois phases de la pipette (voir le chapitre sur la congélation des embryons).

Toutes les manipulations des embryons se font sous le microscope.

Les embryons sont récupérés avec la micropipette et placés 5 minutes dans le premier milieu de décongélation, 5 minutes dans le deuxième et 5 minutes dans le troisième. A l'issue de ce troisième bain, le glycérol a été entièrement retiré des cellules et on peut placer l'embryon dans un milieu de conservation. Si une seconde paillette a été décongelée, les mêmes opérations ont lieu dans une seconde série de boîtes.

La paillette de transfert est ensuite montée : l'embryon est contenu dans du milieu de conservation, entouré de deux bulles d'air et de deux autres gouttes de milieu de conservation. Il y a donc dans la pipette de transfert :

- une goutte de milieu de conservation
- une bulle d'air
- un embryon dans du milieu de conservation
- une bulle d'air
- une goutte de milieu de conservation

La configuration de la paillette est similaire à celle présentée dans la figure 4. Cette paillette est placée dans un pistolet, recouvert d'une gaine stérile percée à son extrémité de manière à laisser sortir le contenu de la pipette et enveloppé dans une chemise sanitaire. Le transfert en lui même peut avoir lieu.

a) Cas des embryons congelés dans de l'éthylène glycol.

C'est alors un transfert direct. Comme son nom l'indique, il n'y a pas de paillette à vider et à reconstituer. La paillette congelée est placée dans le récipient contenant de l'eau à 28°C pendant quelques secondes. Une des extrémités est alors sectionnée et la pipette est placée dans un pistolet de transfert. Celui-ci est enveloppé dans une chemise sanitaire jusqu'au moment du transfert.

3. La préparation des receveuses

Elles sont en général choisies par l'éleveur. C'est lui aussi qui choisit le mode de synchronisation des chaleurs parmi deux proposés : la spirale vaginale Prid® (CEVA, France) ou l'implant Crestar® (Intervet, France). Dans quelques cas, les chaleurs ont été regroupées par deux injections de prostaglandines F_{2α} à 11 jours d'intervalle.

Le document remis aux éleveurs concernant la synchronisation des chaleurs de la receveuse est fourni en annexe 1.

4. Réalisation du transfert.

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

Une injection épидurale de Laocaine® (Schering-Plough, Levallois-Perret, solution à 2 g de chlorhydrate de lidocaïne pour 100 ml) est ensuite réalisée à raison de 10 ml pour une vache de 700 kg et de 5 ml pour une génisse de 400 kg. Il faut noter qu'à la période de la mise à l'herbe, le volume du rumen est moins important qu'à l'étable et les animaux ont tendance à faire un pneumorectum assez facilement quand on les manipule. La dose est alors de 7 ml pour une vache et 5 ml pour une génisse.

L'efficacité de l'injection de lidocaïne est évaluée par la relaxation de la queue de l'animal. Quand celle-ci est relâchée et ne réagit plus aux stimulations, le transfert peut avoir lieu.

Le pistolet est introduit dans le vestibule en écartant les lèvres de la vulve, puis dans le vagin. Avec l'autre main, par palpation transrectale, le pistolet est guidé jusqu'au col. Il faut alors perforer la chemise sanitaire, franchir le col et déposer l'embryon dans la corne ipsilatérale au corps jaune, le plus loin possible. Le pistolet est ensuite retiré.

B. Données recueillies.

1. Par l'intermédiaire de l'éleveur

Il s'agit de données concernant la receveuse : le mode de synchronisation des chaleurs, l'âge de l'animal, sa parité et le rang de transfert sont notés. Chaque élevage est également identifié par un numéro.

2. Lors du transfert

La date à laquelle le transfert a lieu, le numéro de l'élevage, l'état d'engraissement de la receveuse, la qualité du corps jaune qu'elle porte, le type et le stade de l'embryon qu'elle reçoit sont également répertoriés.

3. Après le transfert

Le diagnostic de gestation a lieu environ 30 jours après le transfert par échographie.

C. Présentation des variables.

Nous allons d'abord présenter celles qui concernent l'embryon, puis celles qui concernent la receveuse .

1. Les variables concernant l'embryon

- Le mode de conservation de l'embryon

L'embryon peut être transféré en frais ou après congélation dans du glycérol ou de l'éthylène glycol, selon les procédés décrits précédemment. Les proportions d'embryons congelés (53,7%) et frais (46,3%) sont équivalentes (tableau 2).

Tableau 2: Nombre d'embryons de chaque type transférés.

Type d'embryon	Effectif	Fréquence
1 (glycérol)	126	36,2%
2 (frais)	161	46,3%
3 (éthylène glycol)	61	17,5%
Total	348	

- La qualité de l'embryon

Elle est évaluée selon les critères de l'IETS (1990). Le détail de ces critères est fourni dans la partie bibliographique. La qualité 1 correspond à un stade de développement compatible avec son jour de collecte, un embryon compact et symétrique. La qualité 2 correspond à un embryon en retard d'un ou deux jours ou présentant des défauts (quelques cellules échappées, dégénérées). L'aspect est plus clair ou plus sombre que la normale. La qualité 3 correspond à un embryon qui présente de nombreux défauts mais

avec une masse cellulaire homogène encore présente. Seuls les embryons de qualité 1,2 ou 3 ont été transférés.

Ces données correspondent à la qualité de l'embryon au moment du transfert. Elles ne sont pas disponibles pour les embryons conservés dans de l'éthylène glycol car ils sont transférés directement après décongélation. On peut seulement dire qu'ils étaient de qualité 1 avant la congélation, puisque seuls des embryons de qualité 1 sont conservés. Les effectifs de chaque qualité d'embryons transférés sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Nombre d'embryons de chaque qualité transférés.

Qualité de l'embryon	Effectif	Fréquence
1	152	80,0%
2	33	17,4%
3	5	2,6%
Total	243	

- Le stade de l'embryon

Il s'agit en général d'embryons au stade morula ou blastocyste, c'est-à-dire des embryons âgés de 6 à 8 jours. L'âge moyen dans notre étude était de 7,2 jours avec un écart type de 0,4 jour.

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

Tableau 4 : Stades des embryons transférés au cours de l'étude.

Stade de l'embryon (jours)	Effectif	Fréquence	Moyenne
6,5	7	3,8%	7,2
7	124	67,4%	
7,5	35	19,0%	
8	18	9,8%	
Total	184		

2. Les variables concernant la receveuse

- La qualité du corps jaune

Elle est notée de 1 à 3 et évaluée par palpation transrectale le jour du transfert (tableau 5).

La note 1 est donnée pour un corps jaune jugé optimal, c'est-à-dire un ovaire de grande taille par rapport à l'autre avec une consistance dure et granuleuse, éventuellement un « bouchon de champagne » palpable, et pas de follicule.

La note 2 correspond à un ovaire bien ferme avec une cicatrice d'ovulation mais avec une différence de taille avec l'autre ovaire un peu moins nette, ou à un ovaire contenant un corps jaune net mais avec un follicule.

La note 3 correspond à une génisse ayant été vue en chaleurs, dont l'ovaire ne présente pas de follicule, mais avec une faible différence de taille entre les deux ovaires, sans corps jaune clairement identifiable. Ce sont des animaux qui reçoivent des embryons uniquement en cas de transfert en frais ou si trop d'embryons ont été décongelés (dans les paillettes au glycérol, ils sont parfois stockés par trois ce qui fait qu'on n'en décongèle pas toujours le nombre voulu).

Tableau 5 : Fréquence des qualités de corps jaunes.

Qualité du corps jaune	Effectif	Fréquence
1	234	82,7%
2	45	15,9%
3	4	1,4%
Total	283	

- Le type de chaleurs

Le transfert peut avoir lieu soit sur chaleurs naturelles, soit par synchronisation (implant auriculaire Crestar®, spirale vaginale ou par injection de prostaglandines). L'implant est la méthode la plus souvent utilisée dans cette étude.

Tableau 6 : Méthode de synchronisation des chaleurs.

Type de chaleur	Effectif	Fréquence
Naturelles	44	13,4%
Implant	237	72,0%
Spirale	5	1,5%
Prostaglandines	43	13,1%
Total		

Tableau 7: Nombre de transferts par mois.

Mois	Effectif	Fréquence
Février	28	7,8%
Mars	175	48,6%
Avril	76	21,1%
Mai	33	9,2%
Juin	40	11,1%
Juillet	8	2,2%
Total	360	

- La note d'état corporel

Le principal critère pour l'évaluer est de palper le ligament sacro-tubéral et la graisse qui l'entoure.

Une table de l'INRA montrant les principaux critères de notation de l'état corporel est fournie en annexe (Agabriel et al., 1986) . Les femelles de notre étude ne présentaient pas de note extrême : la note moyenne était de 3,2 avec un écart type de 0,6 (tableau 8).

Tableau 8: Etat d'engraissement des receveuses incluses dans l'étude.

Note d' état	Effectif	Fréquence
2	27	9,9%
3	159	58,2%
4	87	31,9%
Total	253	

- La parité de la receveuse

Elle est donnée en nombre de vêlages antérieurs au transfert (tableau 9). Les receveuses étaient majoritairement des génisses (73,1%) et plus de 95% de ces femelles avaient vêlé au maximum 2 fois. Notre population de receveuses est donc jeune (parité moyenne de 0,4 avec un écart type de 0,9).

Tableau 9: Parité des receveuses incluses dans l'étude.

Parité	Effectif	Fréquence
0	247	73,1%
1	49	14,5%
2	29	8,6%
3	10	2,9%
4	2	0,6%
5	1	0,3%

- L'âge de la receveuse (variable quantitative)

Il est donné en années (tableau 10). De façon cohérente avec la parité, l'essentiel de la population est âgé de 2 à 4 ans (2,5 ans en moyenne avec un écart type de 1,1 an)

Tableau 10: Age des receveuses incluses dans l'étude

VALEUR	EFFECTIF	FREQUENCE
1	15	4,9%
2	215	69,6%
3	25	8,1%
4	37	12,0%
5	9	2,9%
6	6	1,9%
7	1	0,3%
8	1	0,3%

- Le rang de transfert

Cette variable correspond au nombre de transferts réalisés sur une même receveuse au cours de l'année de l'étude (tableau 11). Il est supérieur à 1 quand plusieurs transferts

ont eu lieu sur le même animal entre février 1999 et juillet 1999. En moyenne, 1,2 transfert par femelle a été réalisé au cours de cette campagne, avec un écart type de 0,4.

Tableau 11: Rang de transfert des receveuses incluses dans l'étude.

VALEUR	EFFECTIF	FREQUENCE	MOYENNE
1	290	85,8%	1,2
2	43	12,7%	
3	5	1,5%	

3. Analyse statistique

a) analyse univariée

Le test du CHI² a été utilisé pour mesurer la significativité des variations observées. Le seuil retenu a été de 5% ($p=0,05$). Toutes les variables ont été considérées comme des variables qualitatives.

b) analyse multivariée

Tous les facteurs associés au taux de gestation au seuil de 10 % à l'issue de l'analyse univariée ont été introduits dans des modèles multivariés de régression logistique (Cytel, 1999). L'effet aléatoire de l'élevage a été introduit dans tous les modèles afin de tenir compte du fait que les animaux d'un même élevage se ressemblent plus que ceux d'élevages différents et de la répétition intra-animal (plusieurs transferts possibles sur un même animal). Les effets non significatifs au seuil de 5 % ont progressivement été éliminés des modèles pour ne retenir que les effets significatifs.

II) Résultats.

Nous nous intéresserons d'abord à l'analyse univariée des résultats, puis nous présenterons les conclusions que l'on peut tirer de l'analyse multivariée.

Comme dans la première partie de ce document, nous présenterons pour chacune de ces deux parties d'abord les résultats concernant l'influence de l'embryon sur la réussite du transfert, puis ceux concernant l'influence de la receveuse.

A. Analyse univariée

1. Influence de l'embryon sur la réussite du transfert

a) Influence de la qualité de l'embryon.

On ne considère ici que les transferts d'embryons frais ou congelés dans du glycérol. Les embryons congelés dans l'éthylène glycol étant transférés directement, on ne peut connaître leur qualité au moment du transfert. Les résultats sont présentés dans le tableau 12. Le taux de gestation pour les embryons de qualité 3 n'a pas été calculé en raison du trop faible nombre d'embryons transférés (5).

Tableau 12: Effet de la qualité de l'embryon sur le taux de gestation.

Diagnostic de gestation	Qualité 1	Qualité 2	Qualité 3	p
positif	95	12	1	
négatif	57	21	4	
total	152	33	5	
Taux de gestation (%)	62,5	36,4		0,0058

On remarque que les embryons de qualité 1 ont un taux de gestation significativement plus élevé que les embryons de qualité 2 ($p=0,0058$). La qualité de l'embryon que l'on transfère est donc un critère important pour la réussite de ce transfert.

b) Influence du stade de l'embryon.

L'influence du stade de l'embryon sur le taux de gestation est présentée dans le tableau 13.

Tableau 13: Effet du stade de l'embryon sur le taux de gestation.

Stade de l'embryon (j)	6,5	7	7,5	8	p
Nombre de diagnostics positifs	3	71	24	13	
Nombre de diagnostics négatifs	4	53	11	5	
Total	7	124	35	18	
Taux de gestation (%)		57,3	68,6	72,22	0,328

Aucune influence significative du stade de l'embryon sur le taux de gestation n'a été mise en évidence ($p=0,328$). Le trop faible effectif des embryons de 6,5 jours n'autorise pas l'expression d'un taux de gestation en pourcentage.

c) Influence du mode de conservation de l'embryon

Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Mode de conservation de l'embryon et taux de gestation.

Diagnostic de gestation (nombre)	Frais	Congelé		p
		glycérol	éthylène glycol	
Positif	97	68	30	
Négatif	64	58	31	
Total	161	126	61	
taux de gestation (%)	60,2	54,0	49,2	0,53

Les taux de gestation après transfert en frais ou après congélation ne sont pas significativement différents.

Il faut noter que seuls les embryons de qualité 1 sont congelés, ceux qui sont d'une qualité inférieure sont uniquement transférés en frais s'il reste des receveuses disponibles. Pour connaître l'influence de la congélation sur la réussite du transfert, et puisque nous avons remarqué que la qualité de l'embryon influençait ce résultat, nous allons comparer les taux de gestation obtenus en ne tenant compte que des embryons de qualité 1. Les embryons congelés dans du glycérol et de l'éthylène glycol ont été regroupés en un seul effectif. On obtient alors un taux de gestation de 66% pour les embryons frais contre 52,4% pour les embryons congelés. Cette différence est significative ($p=0,036$). La congélation diminue donc la réussite du transfert.

2. Influence de la receveuse sur la réussite du transfert.

a) Age de la receveuse.

Les données présentant les variations du taux de gestation en fonction de l'âge de la receveuse sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Influence de l'âge de la receveuse (années) sur le taux de gestation.

Age de la receveuse (années)	1	2	3	4	5 et +
nombre de transferts	15	215	25	37	17
nombre de gestations	8	134	12	15	4
taux de gestation	53,3	62,3	48,0	40,5	23,5

Les transferts sur des receveuses jeunes semblent conduire à de meilleurs résultats que ceux réalisés sur des receveuses plus âgées, puisque seules les receveuses d'un ou deux ans présentent des taux de gestation moyens supérieurs à 50%.

Si on regroupe les résultats en deux classes seulement, c'est-à-dire les receveuses de deux ans ou moins et les autres, on trouve un effet significatif de l'âge sur la réussite du transfert .Le taux de gestation pour les animaux les plus jeunes est de 61,7%, contre 43,5 pour les plus âgés ($p=0,01$).

b) Parité de la receveuse.

Les résultats obtenus pour la parité (tableau 16) concordent avec ce que l'on vient de voir pour l'âge des receveuses. Plus les animaux sont jeunes, plus leur fertilité est élevée. Ici, on observe une différence significative entre les animaux des trois premières catégories ($p<0,05$). Il n'y a pas assez de receveuses ayant 3 veaux ou plus pour pouvoir évaluer le taux de gestation et le comparer à celui des autres animaux.

On n'est pas surpris de trouver ici des résultats concordant avec ce que l'on avait observé pour l'influence de l'âge des receveuses, ces deux données étant corrélées.

Tableau 16: Effet de la parité des receveuses sur le taux de gestation.

Nombre de vêlages	0	1	2	3 et plus	p
nombre de transferts	247	49	29	13	
nombre de gestations	150	24	11	4	
taux de gestation (%)	60,7	49,0	37,9		0,03

c) Mode de synchronisation des chaleurs.

Les taux de gestation obtenus avec les différents modes de synchronisation de chaleurs ne sont pas significativement différents entre eux, ni avec le taux obtenu pour des chaleurs naturelles. (tableau 17, $p=0,15$).

Tableau 17: Effet du mode de synchronisation des chaleurs sur le taux de gestation.

Chaleurs	Naturelles	Implant	Spirale	Prostaglandines	p
nombre de transferts	44	237	5	43	
nombre de gestations	20	139	2	28	
taux de gestation (%)	45,5	58,6		65,1	0,15

d) Qualité du corps jaune

Les animaux portant des corps jaunes de qualité 1 ont un taux de gestation après transfert significativement plus élevé que les autres (tableau 18, $p<0,05$).

Tableau 18: Effet de la qualité du corps jaune sur le taux de gestation.

Qualité de l'embryon	1	2	3	p
nombre de transferts	234	45	4	
Nombre de gestations	143	19	0	
taux de gestation (%)	61,1	42,2		0,018

Il faut cependant noter que les meilleurs embryons sont de préférence transférés sur des animaux portant de bons corps jaunes. Ces deux paramètres sont donc liés et nous étudierons l'importance de ce lien dans la partie concernant l'analyse multivariée des données.

e) Mois de transfert.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les taux de gestation obtenus pour les différents mois où les transferts ont eu lieu (tableau 20, $p=0,4$). On aurait pu s'attendre à avoir une baisse du taux de gestation à partir de mars, correspondant à la mise à l'herbe mais ce n'est pas le cas.

Tableau 19: Effet du mois de transfert sur le taux de gestation.

Mois de transfert	février	Mars	avril	mai	juin	juillet	p
Nombre de transferts	28	175	76	33	40	8	
Nombre de gestations	16	94	45	18	26	2	
Taux de gestation (%)	57,1	53,7	59,2	54,5	65,0	25,0	0,4

f) Etat d'engraissement.

Une bonne note d'état corporel au moment du transfert a tendance à favoriser le taux de gestation mais les différences présentées ici ne sont pas significatives (tableau 20, $p=0,2$).

Tableau 20: Effet de la note d'état corporel sur le taux de gestation.

Note d'engraissement	2	3	4	p
nombre de transferts	27	159	87	
nombre de gestations	12	92	55	
taux de gestation (%)	44,4	57,9	63,2	0,2

g) Rang de transfert

L'influence du rang de transfert sur le taux de gestation est présentée dans le tableau 22.

Tableau 21: Effet du rang de transfert sur le taux de gestation.

Rang de transfert	1	2	3	p
nombre de transferts	290	42	5	
nombre de gestations	164	23	4	
taux de gestation (%)	56,6	54,8		0,8

Il n'y a pas de différence significative pour le taux de gestation entre un rang de transfert 1 et un rang de transfert 2. Le taux de gestation pour le rang trois est très élevé mais la faiblesse des effectifs fait qu'on ne peut en tenir compte dans l'analyse. Cet effectif correspond à des femelles chez lesquelles on a transféré un embryon après deux échecs consécutifs, ce qui est rare.

A l'issue de ces premiers résultats, on voit que les seuls facteurs qui influencent réellement la réussite d'un transfert d'embryon sont la qualité de l'embryon, son mode de conservation (pour les embryons de qualité 1), la qualité du corps jaune, et l'âge ou la parité de la receveuse.

La liaison existant entre certaines de ces variables impose de recourir à l'analyse multivariée pour conclure sur les effets propres de chaque variable.

B. Analyse multivariée

A l'issue de l'analyse multivariée, seuls les facteurs qualité de l'embryon, parité et âge étaient liés significativement au taux de gestation des receveuses d'embryon (tableau 23). L'effet de la qualité du corps jaune mis en évidence à l'issue de l'analyse univariée n'était plus significatif lorsqu'il était corrigé pour l'effet de la qualité de l'embryon. Ce calcul a été réalisé car les animaux qui reçoivent les meilleurs embryons sont ceux qui possèdent les meilleurs corps jaunes. Il est donc normal qu'ils présentent aussi le meilleur taux de gestation, celui-ci n'étant pas lié à la qualité du corps jaune qu'ils portent, mais bien à la qualité de l'embryon qu'ils reçoivent. Le mode de conservation de l'embryon n'avait pas d'influence significative quand toutes les qualités d'embryons étaient considérées, on ne l'a donc pas introduit dans les modèles.

Les calculs ont été effectués grâce au logiciel Egret (Cytel, 1999).

Tableau 22 : Facteurs de variation du taux de gestation des receveuses d'embryons : analyse multivariée.

Variable	N	Taux de gestation observé (%)	Odds Ratio (OR)	Intervalle de confiance de l'OR	p
Modèle 1 (n=188 animaux sans données manquantes)					
Parité	Génisse	141	60,3	1	
	Vache	47	44,7	0.47	0.23-0.95 < 0.05
Qualité de l'embryon	1	150	62,0	1	
	2+3	38	34,2	0.29	0.14-0.63 < 0.01
Modèle 2 (n=170 animaux sans données manquantes)					
Age (années)	≤ 2	133	62,4	1	
	> 2	37	40,5	0.40	0.18-0.88 < 0.05
Qualité de l'embryon	1	137	62,0		
	2+3	33	39,4	0.38	0.17-0.84 < 0.05

III) Discussion.

A. Méthodologie.

Cette étude a la particularité de n'avoir pas été menée par un centre d'insémination avec plusieurs techniciens qui réalisent les mêmes opération. Il s'agit ici de transferts réalisés chez des éleveurs qui en ont fait la demande à un vétérinaire praticien. La palpation des ovaires, la qualité des embryons et l'état d'engraissement des animaux ont donc tous été évalués de façon homogène. C'est un avantage qui garantit la standardisation des résultats, notamment en ce qui concerne la qualité des embryons : comme l'ont mis en évidence Farin et al. (1999), des observateurs même expérimentés n'ont pas la même évaluation de la qualité des embryons, ce qui aurait pu introduire un biais dans cette étude. Van Wagtendonk-de Leeuw et al. (1997) précisent cependant que sur 728 transferts réalisés par six praticiens différents, il n'y avait pas d'influence significative du manipulateur sur la réussite du transfert. En ce qui concerne le transfert direct, Nivot (1998) indique, lui, que la réussite de l'opération doit une large part à l'habileté du manipulateur. Il faut préciser qu'il mentionne plutôt des différences de compétence entre praticiens, alors que l'étude hollandaise ne comportait que des opérateurs expérimentés.

Un des grands intérêts de cette étude est que l'opérateur est toujours le même. Il est donc certain que les facteurs de variation observés sont liés à la receveuse et à l'embryon.

Il faut ajouter que certaines données ne sont pas disponibles pour tous les transferts, ce qui réduit l'effectif des classes correspondantes et peut diminuer la précision du résultat. C'est surtout le cas pour le stade de l'embryon (196 données manquantes) et l'état d'engraissement de la receveuse (109 données manquantes). Néanmoins, le critère stade de l'embryon représente 164 données, ce qui est suffisant pour une analyse statistique valable.

L'expression de l'âge non pas en années mais en mois aurait de la même façon permis d'avoir un résultat plus précis. Il est d'ailleurs probable que la significativité de l'influence de l'âge sur le taux de gestation aurait augmenté.

Enfin, on notera que certaines données sont fortement liées, comme la qualité de l'embryon et la qualité du corps jaune. Cette liaison a été prise en compte dans l'analyse multivariée.

B. Résultats

1. Taux de gestation moyen.

Le taux de gestation moyen a été de 56%, avec 60,2% de réussite pour les transferts en frais et 52,4% pour les transferts d'embryons congelés, sans différence entre les deux méthodes de congélation. Ces taux sont voisins de ceux déjà publiés par d'autres auteurs en ce qui concerne les embryons congelés (McIntosh et al., 1994, Niemann et al., 1991).

Des études récentes, comme celle de Spell et al. (2001) présentent de meilleurs résultats, notamment en ce qui concerne les embryons frais : ils obtiennent près de 83% de gestation pour ces derniers. Le taux de gestation qu'ils ont obtenu après transfert d'embryons congelés est lui de 69%.

Nous avons vu que le taux de gestation était sous l'influence de 4 facteurs : la qualité de l'embryon, son mode de conservation , l'âge et la parité de la receveuse. Nous allons à présent discuter de l'influence de ces facteurs en les comparant à des données bibliographiques.

2.68925iés par

Hasler (2001) a ainsi obtenu un taux de gestation de 73,2% pour des embryons de qualité 1, contre 68,3% pour des embryons de qualité 2 et 56,3% pour des embryons de qualité 3. Lindner et al. (1983) ont aussi mis en évidence une chute significative du taux de gestation pour des embryons de qualité 3 (27%) par rapport à ce qu'ils avaient observé pour des embryons de qualité 1 (45% de gestation) ou 2 (44% de gestation). Le taux de réussite pour des embryons de qualité deux est très bas dans cette étude, mais il n'y a eu que peu d'embryons frais de cette qualité qui ont été transférés (18 au total, pour 360 transferts). La différence avec le taux de réussite des embryons de qualité un n'est pas significative ($p>0,05$). Le faible effectif des embryons de qualité 3 transférés (5) n'autorise pas l'expression d'un taux de gestation et on ne peut pas comparer ces données à celles de la bibliographie.

b) Le mode de conservation de l'embryon

Le taux de gestation des embryons frais obtenu ici (60,2%) paraît inférieur à ce qui est habituellement trouvé (79% pour Farin et Farin, 1995. , et 82,9% pour Spell et al., 2001), mais beaucoup d'études ne concernent que des embryons de qualité un ou deux. Hasler et al (1987) ont trouvé des taux de gestation compris entre 68% et 73% pour des embryons de qualité 1 ou 2, mais ce taux chutait à 56% pour des embryons de qualité 3. Cependant, très peu d'embryons de qualité 3 ont été transférés dans cette étude (2,6%), ceci ne suffit donc pas à expliquer la baisse du taux de réussite pour les transferts d'embryons frais et d'autres facteurs sont sans doute en cause

Les taux de réussite des transferts d'embryons congelés (54% pour le glycérol et 49,2% pour l'éthylène glycol) observés dans cette étude sont voisins de ceux qui avaient été préalablement publiés. Duchi et al. (1998) ont obtenu des taux de gestation de 48,5% pour des embryons congelés dans une solution de glycérol à 1 M et de 44,7% pour des embryons congelés dans une solution d'éthylène glycol à 1,8 M. Mc Intosh et al. (1994) ont obtenu un taux de gestation de 59% pour des embryons congelés dans de l'éthylène glycol à 1,5M. Les deux modes de décongélation pris en compte ici ont donné des résultats semblables. Il était intéressant pour le vétérinaire praticien de comparer l'efficacité de ces deux méthodes de conservation. L'utilisation de l'éthylène glycol permet un gain de temps important par rapport aux exigences du glycérol, et il est intéressant de voir qu'elles a donné des résultats comparables. C'est une technique qui

sera sans doute utilisée plus largement par la suite dans la mesure où elle nécessite un équipement beaucoup plus réduit.

Nous avons vu que les transferts d'embryons congelés aboutissaient à des taux de gestation plus faibles que les transferts d'embryons frais quand on ne considérait que les embryons frais de qualité 1. La différence perdait sa significativité quand tous les embryons frais transférés étaient considérés. Les taux de gestation différaient de près de 8%. Il est possible qu'avec des effectifs plus importants, on aurait trouvé là une différence significative, conformément aux données bibliographiques : Spell et al. (2001) ont ainsi observé une chute de 13,2% du taux de gestation si des embryons congelés étaient utilisés et non des embryons frais.

c) L'âge et la parité de la receveuse

Ces deux paramètres sont liés puisque les receveuses les plus jeunes correspondent aux génisses et aux primipares.

On observe donc que la fertilité des génisses après transfert embryonnaire est meilleure que celle des vaches, ce que de nombreux auteurs avaient déjà mis en évidence (Broadbent et al., 1991, Chagas e Silva et al., 1999).

Les taux de gestation obtenus ici ont été de 60,7% pour les génisses, 49,0% pour les primipares, et de 37,9% pour les vaches ayant eu deux veaux. Les résultats obtenus par Chagas e Silva et al. présentaient le même écart entre vaches et génisses (40,2% pour les premières et 53,7% pour les secondes).

3. Variables sans influence mise en évidence sur la réussite du transfert

a) Variables concernant l'embryon

Nous avons vu que la qualité et le type d'embryon (congelé ou frais) jouaient un rôle important sur la réussite du transfert. Le stade de développement de l'embryon ne semble pas quant à lui jouer de rôle important dans la réussite du transfert, quelque soit le mode de congélation considéré.

Hasler (2001) a cependant observé une amélioration des résultats obtenus lors de congélation dans du glycérol, avec des embryons au stade jeune blastocyste par rapport

aux stades morulas ou blastocyste plus évolué. Ici, les embryons jeunes sont également congelés dans du glycérol, mais aucune influence du stade n'a pu être observée.

b) Variables concernant la receveuse

- La qualité du corps jaune.

L'analyse multivariée a montré que la qualité du corps jaune n'était en fait pas un caractère intéressant dans la sélection des receveuses. Il suffit en fait que l'animal ait présenté des chaleurs au bon moment pour avoir un corps jaune et être un bon candidat au transfert, comme l'avaient précédemment écrit Hasler (2001) et Remsen et al.(1982). Nous avons vu qu'à l'issue de l'analyse univariée, la qualité du corps jaune semblait jouer un rôle important dans la réussite du transfert. Ce résultat est dû au fait que les meilleurs embryons sont transférés sur les animaux présentant les meilleurs corps jaunes. L'analyse multivariée, en tenant compte de cette liaison entre les deux paramètres, a montré que seule la qualité de l'embryon jouait un rôle dans la réussite du transfert.

- L'état d'engraissement.

L'état d'engraissement n'a pas été non plus un critère intéressant dans cette étude, mais il ne faut pas en conclure qu'il n'influence jamais le succès d'un transfert : tous les animaux présents dans l'étude avaient une note d'état corporel comprise entre 2 et 4, ce qui correspond à des valeurs proches des recommandations (de 2 à 3). Il n'y avait donc pas d'animaux particulièrement gras ou trop maigres pour lesquels des troubles de la reproduction ont été notés après insémination artificielle (Corlay, 1988, Broadbent et al., 1991).

- Le mois de transfert.

Il n'y a pas eu non plus de variation de la fertilité des receveuses en fonction de ce facteur. En fait, la grande majorité des transferts a eu lieu à une époque où les animaux sont au pré. Une étude sur une période plus longue aurait peut-être donné des résultats différents, mais Hasler et al. (2001) n'ont trouvé aucune influence de la saison sur le taux de gestation des receveuses d'embryons au cours d'une étude sur près de 10000 transferts aux Etats-Unis.

- Le mode de synchronisation des chaleurs.

Il n'a pas montré lui non plus d'influence sur le taux de gestation. C'est surtout l'observation des chaleurs qui est importante pour prévoir le nombre de receveuses susceptibles d'être transférées. Chagas e Silva et al. (1999) n'ont montré aucune influence de ce facteur sur le taux de gestation pour les vaches. Ils indiquent cependant que les génisses montraient un taux de gestation supérieur avec des chaleurs synchronisées au moyen de prostaglandines (56,3% de gestation contre 49,2 pour une synchronisation avec des progestagènes et 47,5% en chaleurs naturelles).

Conclusion

Notre étude bibliographique a mis en évidence trois facteurs importants qui conditionnent la réussite d'un transfert d'embryons : la qualité de l'embryon transféré, son mode de conservation et l'âge de la receveuse. L'étude expérimentale réalisée à partir des 360 transferts réalisés en Bourgogne avec des embryons de race Charolaise a conduit aux mêmes résultats. Pour réussir un transfert d'embryons, il faut donc prendre un embryon de bonne qualité (1 ou 2), frais si possible, et le transférer sur une receveuse jeune, une génisse dans le meilleur des cas. Cette étude rétrospective a également permis de valider une technique de conservation sur laquelle le vétérinaire praticien avait peu de recul : la congélation des embryons dans une solution utilisant l'éthylène glycol comme cryoprotecteur. Elle n'a pas donné de meilleurs résultats que la congélation dans le glycérol, mais la simplicité de son utilisation va sans doute conduire à un élargissement de son utilisation.

Bibliographie

- AGABRIEL J., GIRAUD J.M., P. M. (1986) Détermination et utilisation de la note d'état d'engraissement en élevage allaitant - *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix* - 66, 43-50
- ALI S., SHELTON J. N. (1993) Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos - *J Reprod Fertil* - 99 (2), 471-7
- AYALON N. (1978) A review of embryonic mortality in cattle - *J. Reprod. Fert.* - 54, 483-493
- BASU S., KINDAHL H. (1987) Prostaglandin biosynthesis and its regulation in the bovine endometrium: a comparison between nonpregnant and pregnant status - *Theriogenology* - 28 (2), 175-193
- BAUTISTA J. A., KANAGAWA H. (1998) Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice - *Jpn J Vet Res* - 45 (4), 183-91
- BERNHEIM S., CARRAUD A., DELETANG F., GRIMARD B., MIALOT J.P., POBEL T. (1996) Synchronisation des chaleurs par le PRID chez la vache allaitante Charolaise : analyse des facteurs de variation des résultats - *Bull. G.T.V.* - 5, 27-33
- BIGGERS B. G., GEISERT R. D., WETTEMAN R. P., BUCHANAN D. S. (1987) Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow - *J Anim Sci* - 64 (5), 1512-8
- BOUYSSOU B., CHUPIN D. (1982) Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or glycerol - *Theriogenology* - 17 (2), 159-166
- BRACKE C., NIEMANN H. (1995) New aspects in the freezing pf embryos from livestock. In: *Comptes rendus de la 11ème réunion de l'A.E.T.E.* Hannover, 8, 9 septembre, 101-111
- BROADBENT P. J., STEWART M., DOLMAN D. F. (1991) Recipient management and embryo transfer - *Theriogenology* - 35 (1), 125-129

CHAGAS E SILVA J., CIDADAO M.R., LOPES DA COSTA L. (1999) Effect of parity and type of oestrus of recipient on pregnancy rate following embryo transfer in dairy cattle. *In: Comptes rendus de la 15ème réunion de l'A.E.T.E.* Lyon, 10-11 septembre, 132

CHAGAS E SILVA J., LOPES DA COSTA L., ROBALO SILVA J. (2002) Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle - *Theriogenology* - 58 (1), 51-9

CHASTANT S., MAILLARD R. (1999) BVD et transfert d'embryons chez les bovins - *Point Vét.* - 30 (198), 211-217

CHEVALLIER A., VANDEWINKLE E., BOUDJENNAH H. (1996) Facteurs de variation des taux d'ovulation et de gestation après synchronisation de l'oestrus chez des femelles Charolaises et Limousines dans la région Centre-Ouest. - *Elevage et Insémination* - 276, 8-22

CHUPIN D. (1977) Maîtrise de la reproduction chez les bovins: Principes, résultats, limites. - *Ann. Med. Vet.*, - 121, 329-338

CHUPICHUPI

- DARVELID U., GUSTAFSSON H., SHAMSUDDIN M., LARSSON B., RODRIGUEZ H.M. (1994) Survival rate and ultrastructure of vitrified bovine in vitro and in vivo developed embryos. - *Acta Veterinaria Scandinavia* - 35 (4), 417-426
- DOCHI O., IMAI K., TAKAKURA H. (1995) Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol - *Anim. Reprod. Sci.* - 38, 179-185
- DOCHI O., YAMAMOTO Y., SAGA H., YOSHIBA N., KANO N., MAEDA J., *et al.* (1998) Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program - *Theriogenology* - 49 (5), 1051-8
- DONALDSON L. E. (1984) Cattle breed as a source of variation in embryo transfer - *Theriogenology* - 21 (6), 1013-1018
- DUNN T.G. (1980) Relationship of nutrition to successful embryo transplantation - *Theriogenology* - 13 (1), 27-39
- ELLINGTON J.E., FOOTE R.H., FARELL P.B., HASLER J. F., WEBB J., HENDERSON W.B., *et al.* (1991) Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients - *Theriogenology* - 36 (6), 1035-1042
- ELROD C. C., BUTLER W. R. (1993) Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed with excess ruminally degradable protein - *J Anim Sci* - 71 (3), 694-701
- ELSDEN R.P., SEIDEL G.E., TAKEDA T., FARRAND G.D. (1982) Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically - *Theriogenology* - 17 (1), 1-11
- ENJALBERT, F. (1998) Alimentation et reproduction chez les bovins. In: *Comptes rendus des journées nationales des GTV*. Tours, 27-28-29 mai, 49-55

ESCOUFLAIRE, P. (1998a) La palpation des ovaires chez la vache : sensations et interprétations. In: *Comptes rendus des Journées nationales des GTV*. Tours, 27-28-29 mai, 29-32

ESCOUFLAIRE, P. (1998b) Transplantation embryonnaire chez les bovins: la préparation des receveuses. In: *Comptes rendus des Journées nationales des GTV*. Tours, 27-28-29 mai, 123-127

FARIN P. W., FARIN C. E. (1995) Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development - *Biol Reprod* - 52 (3), 676-82

FARIN P.W., SLENNING B.D., BRITT J.H. (1999) Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro - *Theriogenology* - 52, 659-670

GEISERT R. D., FOX T. C., MORGAN G. L., WELLS M. E., WETTEMANN R. P., ZAVY M. T. (1991) Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients - *J Reprod Fertil* - 92 (2), 475-482

GRIMARD B., P. C., PONTER A.A., KHIREDDINE B., MIALOT J.P. (1998) Synchronisation des chaleurs, méthodes et facteurs de réussite en élevage allaitant. In: *Comptes rendus des Journées nationales des GTV*. Tours, 27-28-29 mai, 113-120

GUERIN, B. (2002) Embryo transfer activity in 2001. In: *Comptes rendus de la 18ème reunion de l'A.E.T.E.* Rolduc, 06-07 septembre, 45

GUTTIERRES C.G., OLDHAM J., BRAMLEY T.A., GONG J.G., CAMPBELL B.K., WEEB R. (1997) The recuitement of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers - *J.of Animal Science* - 75, 1876-1884

HASLER J. F. (1987) Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program - *Theriogenology* - 27 (1), 139-168

HASLER J. F. (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle - *Theriogenology* - 56 (9), 1401-15

HIDALGO CO., GOMEZ E., FERNANDEZ L., DUQUE P., PRIETO L., FACAL N., et al. (2002) Progesterone levels, corpus luteum quality and pregnancy rates in heifers

treated with propylene glycol prior to embryo transfer, a field trial - *18ème reunion A.E.T.E.* - (Rolduc, 6-7 septembre),

ISHIMORI, H., SAEKI, K., INAI, M., NAGAO, Y., ITASAKA, J., MIKI, Y., (1993) Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethylsulfoxide - *Theriogenology* - 40 (2), 427-433

LAMBLIN J. (1997) Le contrôle à l'introduction - *Bull. G.T.V.* - 4 (B), 8 0 0 12 449.5334d550001 632.

NISHIGAI M., KAMOMAE H., TANAKA T., KANEDA Y. (2001) The effect of administration of human chorionic gonadotropin in enhancing bovine corpus lutea luteinization and luteal function - *J. Reprod. Dev.* - 47, 283-294

NISHIGAI M., KAMOMAE H., TANAKA T., KANEDA Y. (2002) Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos - *Theriogenology* - 58 (8), 1597-606

NIVOT A. (1998) Transplantation embryonnaire bovine - Le transfert direct: une nouvelle opportunité. - *Bull. G.T.V.* - 5B (597), 13-19

OTTER, T. (1994) Pregnancy rate of fresh and frozen-thawed cattle embryos. In: *Proceedings of the tenth scientific meeting of the A.E.T.E.* Lyon, 10-11 septembre, 228

P.F., M. (1995) Feeding donors and recipient cows - *Ars Veterinaria* - 11, 50-59

PIERSON R.A., GINTHER O.J. (1987) Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers - *Anim. Reprod. Sci.* - 15, 53-60

REMSEN L.G., ROUSSEL J.D., KARIHALOO A.K. (1982) Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer - *Theriogenology* - 17, 105

RICE, L. E. (1991) The effect of nutrition on reproductive performance of beef cattle - *Vet. Clin. North Am. (Food Anim. Pract.)* - 7, 1-26

ROBERTSON I., NELSON R.E. In Thibier M. Evans B., Wrathall A., et al. (1994) *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3rd ed. Stringfellow D.A. and Seidel S.M., Auburn, USA. 103-107

SAHA S., RAJAMAHENDRAN R., BOEDIONO A., CECE S., S. T. (1983) Viability of bovine blastocysts obtained after 7,8 or 9 days of culture following vitrification and one-step rehydration - *Theriogenology* - 20 (4), 407-417

SAHA S., TAKAGI M., BOEDIONO A., SUZUKI T. (1994) Direct rehydration of in vitro fertilised bovine embryos after vitrification - *Vet Rec* - 134 (11), 276-7

- SMITH, A. K., P. J. BROADBENT, D. F. DOLMAN, S. P. GRIMMER, D. A. DAVIES, H. DOBSON (1996) Norgestomet implants, plasma progesterone concentrations and embryo transfer pregnancy rates in cattle - *Vet Rec* - 139 (8), 187-91
- SPELL A. R., BEAL W. E., CORA L. R., LAMB G. C. (2001) Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle - *Theriogenology* - 56 (2), 287-97
- SPITZER, J. C. In Morrow D.A. (1986) *Current therapy in theriogenology* Saunders, W.B., Philadelphia, USA. 320-338
- SUZUKI T., YAMAMOTO M., OOE M., SAKATA A., MATSUOKA M., NISHIKATA Y., *et al.* (1990) Effect of sucrose concentration used for one step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol - *Theriogenology* - 34 (6), 1051-1057
- SZELL A., SHELTON J. N., SZELL K. (1989) Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos - *Cryobiology* - 26 (3), 297-301
- THATCHER W.W., MACMILLAN K.L., HANSEN P.J., DROST M. (1989) Concepts for regulation of corpus luteum fonction by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility - *Theriogenology* - 31 (1), 149-164
- THAUNAT L., LARROQUE H., GALLARD Y., SAUMANDE J. (1999) Fertility after transfer of fresh *in vivo* produced embryo and its relationship with C.L. morphology and progesterone concentration. In: *Comptes rendus de la 15ème réunion de l'A.E.T.E.* Lyon, 10-11 septembre, 230
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW A.M., DEN DAAS J.H.G., RALL W.F. (1997) Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution - *Theriogenology* - 18, 1071-1084
- VOELKEL S.A., HU Y.X. (1992a) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos - *Theriogenology* - 37 (1), 23-34

VOELKEL S.A., HU Y.X. (1992b) Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos following direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females
- *Theriogenology* - 37 (3), 687-697

WENKOFF, M. In Morrow D.A. (1986) *Current therapy in theriogenology* 2nd Edition
Saunders, W.B., Philadelphia, USA. 158-162

WILMUT I., POLGE C., ROWSON L. E.A. (1975) The effect on cow embryos of cooling to 20, 0 and -196°C - *J. Reprod. Fert.* - 45, 409-411

TEXTES DE LOI

JOURNAL OFFICIEL

Arrêté du 13 juillet 1994 fixant les conditions sanitaires relatives à la transplantation et aux échanges intra-communautaires d'embryons d'animaux domestiques de l'espèce bovine, numéro du 11 août 1994, p. 11760 et s.

Annexes

Annexe 1 : Questionnaire remis aux éleveurs

Annexe 2 : Critères de notation de l'état corporel des vaches allaitantes

Annexe 3 : Schéma des principaux stades de développement des embryons de bovins

Annexe 1

Questionnaire remis aux éleveurs

Enquête – Transplantation embryonnaire

1998/1999

I) ELEVEUR

Nom :

.....

Prénom :

.....

Nombre de receveuses préparées :

DATE

HEURE

Mise en place des implants ou spirales : /..../..

Retrait des implants ou spirales : /..../..

Transferts : /..../..

Nombre de transferts réalisés :

Alimentation des receveuses :

- constitution de la ration :

ensilage maïs () ensilage herbe ()
foin () paille () herbe ()
concentré ()
CMV ()

- un changement alimentaire a-t-il eu lieu dans les 3 semaines précédent et suivant la date du transfert ?

oui () non ()

Annexe 2

Critères de notation de l'état corporel des vaches allaitantes **(d'après Agabriel et al., 1986)**

Evaluation de l'état corporel des vaches allaitantes				
	Palpation du ligament sacro-tubéral		Palpation des deux dernières côtes	
Note	Peau	Gras détecté	Peau	Gras détecté
0	Adhérente	Pincement difficile	Tendue et collée	Côtes sèches
1	Tendue	Pincement possible	Tendue et collée	Côtes saillantes
2	Se décolle	Léger dépôt identifiable	Souple	Côtes distinctes
3	Souple	Poignée de gras	Roule sous la main	Dépression intercostale
4	Souple	Bonne poignée de gras	Plus de dépression intercostale	
5	Rebondie	Pleine poignée de gras	Epais matelas recouvrant les côtes	

Annexe 3

Aspect des principaux stades de développement des embryons de bovin.

TRANSFERT EMBRYONNAIRE EN RACE CHAROLAISE EN CLIENTELE : ETUDE DES FACTEURS DE REUSSITE LIES A LA RECEVEUSE ET A L'EMBRYON.

LEGRAND Stéphane,

RESUME :

L'objectif de cette étude est d'identifier les critères de variation de la réussite du transfert d'embryons bovins, tenant aussi bien à l'embryon lui-même qu'à la femelle receveuse. Dans le département de la Nièvre et les départements limitrophes, 360 transferts d'embryons de race Charolaise frais ou congelés ont été pris en considération. Le taux de gestation moyen a été de 56%, avec 60,2 % de réussite pour les embryons frais et 52,4% pour les congelés. En ce qui concerne l'embryon, l'influence sur le taux de gestation de sa qualité, de son stade et de son mode de conservation ont été étudiés. En ce qui concerne la receveuse, ce sont les influences de son âge, de sa parité, de son état corporel, de la qualité de son corps jaune, du mode de synchronisation des chaleurs, de son rang de transfert et du mois de l'année où le transfert a eu lieu qui ont été étudiés.

Les deux facteurs qui ont montré une influence dans cette étude au seuil de significativité de 5% sont la qualité de l'embryon et l'âge de la receveuse, en sachant que ce sont les génisses qui présentent le meilleur taux de gestation. Le mode de conservation n'a d'influence significative que si l'on ne considère que les transferts d'embryons de qualité 1.

Les taux de gestation obtenus après transfert d'embryons congelés dans de l'éthylène glycol ou du glycérol ne présentaient pas de différence significative.

Mots-Clés : embryon, receveuse, transplantation embryonnaire, Charolais, bovin

JURY :

Président : Pr

Directeur : Mme Chastant-Maillard, Maître de Conférences à l'E.N.V.A.

Assesseur : Mme Grimard-Ballif, Maître de Conférences à l'E.N.V.A.

Adresse de l'auteur :

71, Bd du Maréchal de Lattre de Tassigny 92150 Suresnes.

CHAROLAIS EMBRYO TRANSFER IN VETERINARY PRACTICE: STUDY OF RECIPIENT AND EMBRYO FACTORS THAT AFFECT PREGNANCY RATE.

LEGRAND, Stéphane,

SUMMARY:

The aim of this study was to identify factors for successful embryo transfer in Charolais breed in veterinary practice. Influence of embryo and recipient have both been taken into account. In the county of Burgundy, 360 transfer of Charolais embryos, fresh or frozen, have been studied. Overall pregnancy rate was of 56%, 60,2% for fresh embryos and 52,4% for frozen embryos. Frozen embryos were cryopreserved using glycerol or ethylene-glycol solutions. Influence of embryo stage, embryo quality and conservation medium have been studied, as well as recipient age, parity, body condition, estrus synchronization mode, transfer rank, corpus luteum quality and transfer month.

Only two factors had a significant effect on pregnancy rate ($p<0,05$): embryo quality and recipient age. Fresh embryos led to a significantly better pregnancy rate than cryopreserved ones if only grade 1 embryo were considered ($p<0,05$). There was no significant difference in pregnancy rate after transfer of embryos cryopreserved in ethylene glycol or glycerol solutions.

KEY-WORDS: beef cow, embryo, embryo transfer, recipient, Charolais breed

Jury:

President:

Director: Mrs Chastant-Maillard

Assessor: Mrs Grimard-Ballif

Author's address

71, Bd du Maréchal de Lattre de Tassigny 92150 Suresnes.

