

J. SAUMANDE

INRA Physiologie de la Reproduction des  
Mammifères Domestiques 37380 Nouzilly

# La production d'embryons chez les bovins : Quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ?

La réponse au traitement de superovulation reste le facteur limitant essentiel du nombre d'embryons produits par vache traitée. L'étude des relations entre réponse au traitement et état de la population folliculaire met en évidence les moyens d'améliorer cette réponse.

L'amélioration génétique des troupeaux s'est développée de façon remarquable grâce à l'insémination artificielle, technique mise au point dans les années 50 et qui a connu

## Résumé

Chez les bovins, le transfert d'embryons s'est développé sur une base commerciale depuis environ 15 ans. Malgré les nombreux travaux de recherches réalisés pendant cette période, les deux problèmes majeurs identifiés dès le début de l'utilisation de cette technique demeurent : le nombre moyen d'embryons récoltés par vache traitée reste faible, ce qui a pour conséquence un coût de production élevé, et la fréquence des animaux qui ne produisent aucun embryon transférable est trop élevée pour que la technique soit utilisée au mieux dans les programmes d'amélioration génétique. Cette situation limite le développement du transfert d'embryons ; elle perdure alors que les traitements de superovulation sont optimisés et que les extraits hypophysaires utilisés pour stimuler la croissance folliculaire sont bien mieux définis et contrôlés qu'il y a 15 ans.

Actuellement, le principal facteur qui détermine le nombre d'embryons transférables est le nombre d'ovulations induites. Des études portant sur les relations entre fonction ovarienne et réponse au traitement de superovulation ont montré que ce nombre d'ovulations dépendait de l'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation gonadotrope (présence d'un follicule dominant, nombre de follicules de plus de deux millimètres de diamètre). Il apparaît donc que l'amélioration de l'efficacité des traitements de superovulation dépend moins de la mise à disposition de nouvelles molécules ou de nouveaux protocoles de traitement que de l'administration d'un pré-traitement susceptible de faire régresser le follicule dominant et/ou d'augmenter le nombre de follicules recruteables par les gonadotrophines. A cette fin, différentes possibilités sont envisagées ; les résultats préliminaires sont encourageants et devraient permettre de proposer prochainement de nouvelles stratégies pour une production d'embryon plus efficace.

depuis un développement considérable puisqu'à présent, la quasi totalité des vaches laitières et environ 10 % des femelles de races à viande sont inséminées. L'autre méthode qui a permis l'accélération du progrès génétique est plus récente : c'est le transfert embryonnaire. Cette technique a commencé à être utilisée dans les élevages à la fin des années 70. En France, afin que la mise en place de cette nouvelle technique se fasse avec le maximum d'efficacité, un « Programme national pour l'étude et le développement de la transplantation embryonnaire » a été décidé par le Ministère de l'Agriculture, programme qui a duré 3 ans (1979-1981) sous la direction conjointe de l'INRA et de l'ITEB. Cette organisation s'est avérée fructueuse puisque, entre le début et la fin du programme, le nombre moyen de bons embryons<sup>(1)</sup> produits par femelle traitée est passé de 2,4 à 4,4. Il est vrai que tout était à valider : méthodes de stimulation ovarienne et d'insémination, tech-

(1) Sont considérés comme de bons embryons ceux qui ont un développement normal le jour de la collecte. Cette normalité est jugée sur des critères morphologiques (taille, forme générale, intégrité, opacité...). Les limites de cette technique de jugement de l'aptitude au développement des embryons sont illustrées par le résultat suivant : après transferts, 12 % des embryons jugés mauvais et seulement 63 % de ceux jugés très bons donnent naissance à des veaux (Elsden *et al* 1978).

nique de collecte, critère de jugement des embryons. Cependant, bien que la technique ait été améliorée sur bien des aspects, les bilans annuels des opérations de production d'embryons montrent que le nombre moyen de bons embryons par animal traité n'a pratiquement pas évolué depuis cette époque.

Au cours de cette synthèse, les traitements disponibles seront tout d'abord décrits avant de montrer qu'une amélioration importante de leur efficacité actuelle est peu vraisemblable. En effet, le principal facteur limitant la réponse d'un animal à un traitement de superovulation est l'état de la population folliculaire ovarienne au moment où débute la stimulation gonadotrope. C'est à partir de ce constat que peuvent être envisagées de nouvelles approches susceptibles d'être efficaces à terme pour augmenter le nombre de bons embryons produits après un traitement gonadotrope.

## Importance relative de la superovulation dans la production quantitative d'embryons

Le nombre d'embryons obtenus à partir d'une vache traitée dépend de l'efficacité de la technique de collecte mais aussi de facteurs biologiques : nombre d'ovocytes ovulés, proportion d'entre eux qui est fécondée, mortalité embryonnaire précoce due à un environnement utérin défavorable. L'influence néfaste de l'environnement utérin a été observée dans deux situations particulières :

- lorsque les animaux superovulés se trouvent dans des conditions de température telles que leur température interne est modifiée. De telles situations ne sont pas rencontrées dans nos conditions européennes ;

- après stimulation par eCG<sup>(2)</sup>. En comparant avec les résultats obtenus à la suite d'une stimulation avec FSH, on observe une moindre qualité des embryons. Les raisons de cette situation ont été établies et des solutions proposées (voir infra).

La fécondation des ovocytes dépend de la qualité du sperme et d'un moment d'insémination bien choisi. Les premières années, le nombre d'inséminations était important puisqu'il était conseillé de les répéter toutes les 12 h aussi longtemps que les femelles étaient en œstrus, comportement qui est augmenté en intensité et en durée chez les animaux superovulés. Cependant, pour limiter les interventions sur l'animal et aussi pour des raisons de coût, le nombre d'inséminations a été progressivement réduit à 2 (12 h et 24 h après le début des chaleurs) sans que le pourcentage d'œufs fécondés soit affecté. Il a même été montré que si l'œstrus était détecté avec beaucoup de rigueur, une seule insémination était suffisante (Lacaze *et al.* 1992). Ces mêmes auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet taureau. Pour ce qui concerne l'influence de la fertilité du mâle sur la production d'embryons, il faut aussi penser que le choix du taureau dépend en premier lieu de caractéristiques d'ordre génétique. Le risque d'une mauvaise fécondation peut être accepté, compte tenu de l'intérêt génétique d'un accouplement.

Il semble donc que dans les conditions habituelles, le nombre d'embryons collectés par donneuse dépende pour l'essentiel du nombre d'ovulations.

## Améliorations des traitements de superovulation

Les traitements proposés pour produire des embryons (figure 1) ont fait l'objet de nombreuses expériences dont le but était aussi bien d'augmenter le nombre moyen de bons embryons que de réduire la variabilité des réponses (tout particulièrement en diminuant la fréquence des cas où aucun bon embryon n'est récupéré).

### Choix de la gonadotropine

Ce qui, en premier lieu, a permis d'améliorer l'efficacité des traitements de superovulation a été le remplacement de eCG (PMSG) par de la FSH. Les premiers résultats étaient très encourageants mais pas toujours reproductibles. La raison de cette variabilité des résultats a été identifiée comme étant la conséquence d'une mauvaise standardisation du seul produit commercialisé à cette époque (FSH-P<sup>(3)</sup>, Burns Biotech) puisque la quantité de FSH comme le rapport des quantités FSH/LH étaient très variables d'un lot de fabrication à un autre (tableau 1). Ce résultat a conduit plusieurs laboratoires à mettre en place leur propre production de gonadotrophine hypophysaire la plupart du temps à

Tableau 1. Analyse des quantités de FSH et LH présentes dans les lots de FSH-P.

Dosage par radiorécepteur (Martinat et Combarous, non publié)				Dosage biologique <i>in vitro</i> (Lindsell <i>et al.</i> 1986)			
Lot	FSH <sup>(1)</sup>	LH <sup>(2)</sup>	FSH/LH	Lot	FSH <sup>(3)</sup>	LH <sup>(4)</sup>	FSH/LH
546 B 81	0,99	2,05	0,48	574 M 82	33,1	168,3	0,20
562 C 82	1,1	2,5	0,44	582 K 83	138,5	460,1	0,30
558 H 81	1,26	2,7	0,47	596 K 84	142,8	93,7	1,52
568 H 82	1,38	3,15	0,44	540 A 81	74,7	91,0	0,82
510 E 85	0,71	6,25	0,13	588 C 84	116,7	188,7	0,62
520 H 85	0,66	5,9	0,11	584 M 83	85,7	361,9	0,24
				550 C 81	57,0	198,6	0,29
				548 C 81	349,8	79,2	4,42
				535 K 80	131,6	589,0	0,22

(1) Exprimé en mg pFSH/flacon.

(3) Exprimé en mg oFSH/mg (NIADDK-oFSH-16).

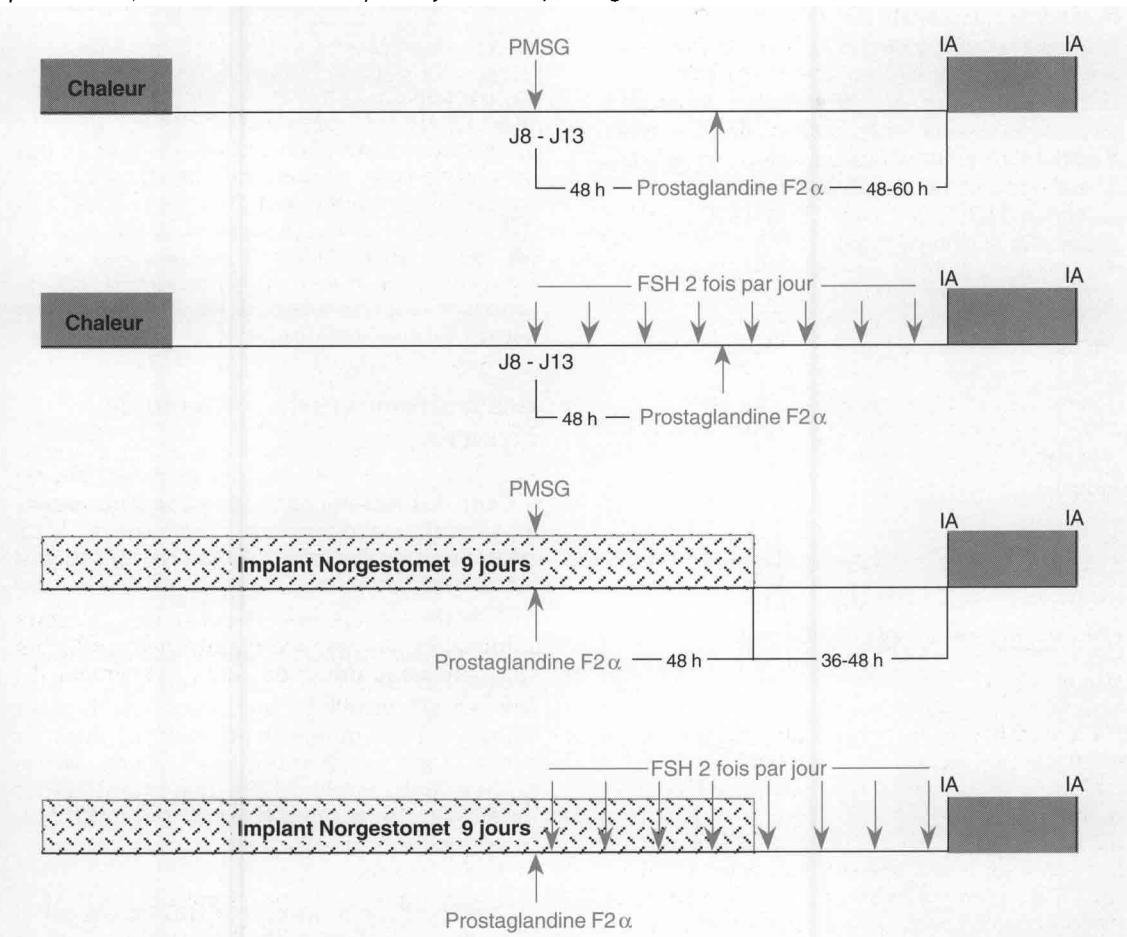
(2) Exprimé en mg pLH/flacon.

(4) Exprimé en mg oLH/mg (NIADDK-oLH-25).

(2) eCG : equine Chorionic Gonadotrophine. Nom donné dans la nomenclature internationale à PMSG.

(3) FSH-P est un nom commercial d'extraits hypophysaires. pFSH désigne la FSH d'origine porcine.

**Figure 1.** Description des différents traitements de production d'embryons couramment utilisés. Le traitement gonadotrope est administré pendant la phase lutéale d'un cycle ou au cours d'une imprégnation progestagénique pendant 9 jours (implant de Norgestomet : traitement Crestar). Dans le premier cas, l'œstrus est obtenu après injection de prostaglandine F2 $\alpha$ .



partir d'hypophyses de porcs. Il a été alors possible de préciser les conditions d'utilisation d'extraits hypophysaires. Ont ainsi été définis les doses optimales à administrer (pour les doses trop fortes, le nombre de follicules préovulatoires est très important mais il n'y a pas d'ovulation) et le rapport optimum FSH/LH. Il a été de plus montré que les meilleurs résultats étaient obtenus lorsque la FSH était injectée 2 fois par jour, en dose décroissante, pendant 4 jours (pour plus de détails, consulter la revue de Chupin 1988).

Le bilan de l'ensemble de ces travaux montre que la mise à disposition d'extraits hypophysaires parfaitement contrôlés, aussi bien pour ce qui est de la quantité de FSH que du rapport FSH/LH, et la définition des conditions optimales d'utilisation ont permis d'augmenter de 25 % le nombre moyen de bons embryons par rapport à ce qui était obtenu lors des premiers essais avec des extraits hypophysaires. Pour ce qui concerne la comparaison de l'efficacité respective des stimulations par eCG, utilisée au début de la mise en place de la technique de production d'embryons, et par FSH, gonadotrophine la plus couramment utilisée actuellement, cette dernière permet d'obtenir en moyenne 2 embryons de plus que ce qui était produit

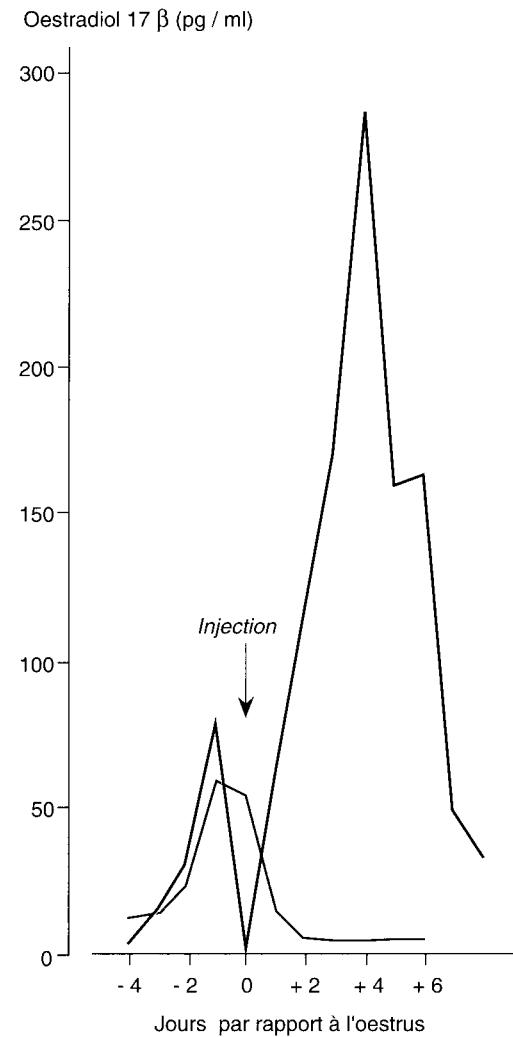
avec eCG mais la variabilité des réponses demeure toujours aussi importante (figure 2). La différence d'efficacité entre les 2 gonadotrophines s'explique uniquement par un effet sur la qualité des embryons, le nombre d'ovulations étant identique. Après qu'il ait été démontré que la mauvaise qualité des embryons obtenus avec eCG était due aux effets à long terme de la gonadotrophine chorionique, les traitements eCG/antisérum anti-eCG ont été proposés (figure 3) ; la production d'embryons transférables est alors comparable à celle obtenue avec FSH (Sauvage et al 1984). Faute de commercialisation d'anticorps anti-eCG, ce traitement ne s'est pas développé bien qu'il soit plus simple à mettre en œuvre (2 injections au lieu de 8).

**La maîtrise de la quantité de FSH administrée et du rapport FSH/LH, et l'optimisation des conditions du traitement ont permis d'augmenter de 25 % le nombre moyen de bons embryons.**

**Figure 2.** Illustration de la variabilité des réponses enregistrées après un traitement de superovulation. Chaque nombre représente le nombre d'ovulations obtenues pour une vache. Tous les animaux appartenaient au même troupeau ; ils ont reçu le même traitement, à la même période du post-partum (d'après D. Chupin, résultat non publié).

1	10	12
1	10	12
1	11	12
4	12	14
5	9	10
6	11	12
7	14	15
8	15	18
9	17	18
10	20	22
11	21	25
12	30	31
13	36	38
14	72	

**Figure 3. Comparaison de l'évolution des concentrations d'oestradiol-17 $\beta$  chez des génisses traitées par 2 500 UI d'eCG avec (trait rouge) ou sans (trait noir) injection de sérum anti-eCG le jour de l'œstrus. Le premier pic d'oestradiol-17 $\beta$  est associé à la croissance des follicules qui vont ovuler (respectivement 6 et 8 pour ces animaux). Le deuxième pic est le reflet de la stimulation par eCG qui persiste après l'ovulation ; cette sécrétion d'oestradiol, par ses effets sur l'utérus, affecte la qualité des embryons ; elle est inhibée par l'injection d'antisérum anti-eCG (d'après Saumande et Chupin 1986).**



**Au traitement de superovulation peut être associé un traitement de contrôle de l'œstrus, qui permet de diminuer la fréquence des réponses nulles.**

**Tableau 2. Comparaison de 2 méthodes de contrôle de l'œstrus associées à un traitement de superovulation (Saumande et al 1980).**

Traitement	Norgestomet	Prostaglandines
Nombre de génisses	26	25
Nombre d'ovulations	13,6 ± 1,1	12,5 ± 1,8
% des génisses avec :		
0-1	0	8,0
2-5	7,7	12,0
> 5 ovulations	92,3	80,0

Les animaux ont reçu 2 000 UI de eCG deux jours avant le retrait de l'implant ou deux jours avant l'injection de prostaglandine ; dans ce dernier cas la gonadotrophine a été injectée pour chaque animal le dixième jour de son cycle.

### Les traitements de contrôle de l'œstrus

Pour des raisons pratiques, les traitements de stimulation ovarienne sont associés à un traitement de contrôle de l'œstrus. Il est possible d'utiliser des prostaglandines ou des implants de progestagène.

Les échecs rapportés après utilisation des prostaglandines (pas d'apparition de l'œstrus) ont été attribués à l'inefficacité de la dose injectée à un moment où, par ailleurs, le corps jaune est stimulé par les gonadotrophines (Saumande 1978). Les quantités de prostaglandines injectées ont alors été doublées (en une injection ou deux injections à 12 h d'intervalle).

Il est possible d'associer le traitement gonadotrope à un traitement de synchronisation de l'œstrus avec un traitement progestagène (implant Crestar). Cette méthode demeure sous-utilisée alors qu'elle présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre même en l'absence d'information sur les cycles des animaux traités et, surtout, de diminuer la fréquence des non-réponses (tableau 2).

L'adaptation des traitements de contrôle de l'œstrus a permis d'améliorer la production d'embryons essentiellement parce que la fréquence des animaux qui ne produisent aucun bon embryon est diminuée.

Le remplacement de eCG par FSH, la mise sur le marché d'extraits hypophysaires bien contrôlés, des traitements gonadotropes et de contrôle de l'œstrus optimisés devraient permettre une amélioration sensible de la production d'embryons. Or, si l'on en juge par les statistiques annuelles, il n'en est rien (tableau 3). Cette situation paradoxale est aussi observée dans d'autres pays. Ceci est d'autant plus surprenant que la sélection des donneuses, en particulier sur les critères de normalité de la fonction de reproduction, est plus sévère qu'elle n'a été. Un des facteurs susceptibles d'affecter négativement la production d'embryons est la plus grande fréquence des génisses parmi les femelles traitées (1/3 des donneuses en 1993) mais ceci ne suffit pas à expliquer pourquoi la production

**Tableau 3. Evolution, en France, de l'activité de production d'embryons chez les bovins (source : Comptes rendus des réunions annuelles de l'AEETE).**

Année	Donneuses d'embryons traitées	Nombre moyen par donneuse traitée d'embryons collectés	Nombre moyen par donneuse traitée de bons embryons
1981*	267	267	8,1
1988	5 974	5 427	8,1
1989	7 598	7 022	7,8
1990	8 756	8 034	7,9
1991	8 630	7 896	7,3
1992	7 316	6 679	7,8
1993	6 033	5 496	8,3

\* Pour l'année 1981, les résultats sont ceux du dernier semestre du travail réalisés dans le cadre du Programme National.

Les informations sur la variabilité des réponses ne sont pas disponibles.

d'embryons n'est pas actuellement plus efficace qu'elle n'était à ses débuts.

## Activité ovarienne et réponse au traitement de superovulation

Que la population folliculaire présente au moment où une gonadotropine est injectée puisse expliquer le nombre d'ovulations induit a été envisagé très tôt, en particulier à la suite de comparaisons des réponses à eCG chez différentes souches de rates et chez des races de brebis plus ou moins prolifiques. Pour ce qui concerne les bovins, Saumande *et al* (1978) ont rapporté les premières observations suggérant que la présence d'un nombre important de petits follicules (2-4 mm) le jour de l'injection de eCG était associée à une superovulation forte ; par contre la présence d'un gros follicule semblait inhiber la réponse à la stimulation gonadotrope. Des corrélations entre le nombre de follicules de plus de 1 mm de diamètre avant traitement et la réponse ovarienne ont aussi été établies chez des animaux prépubères et ce pour différentes doses de eCG (Monniaux *et al* 1983). Ces premières données ont été acquises en observant les ovaires par endoscopie, technique qui présente les inconvénients de ne permettre qu'un contrôle ponctuel et l'observation des seuls follicules visibles à l'œil nu à la surface des ovaires. L'étude des relations entre l'état des ovaires et la réponse à un traitement de superovulation a donc fait l'objet de nouveaux travaux avec des techniques plus appropriées.

## Dynamique de la croissance folliculaire et réponse à la stimulation gonadotrope

Cette étude (Monniaux 1982) a été réalisée en analysant par les techniques d'histologie quantitative la population folliculaire des ovaires collectés par hémicastration, lors de l'injection de eCG pour l'un des ovaires et 48 h après le pic pré-ovulatoire de LH pour l'autre. Tous les follicules en croissance ont été étudiés. Ce travail a permis de mettre en évidence deux faits importants :

\* les follicules qui vont ovuler à la suite de traitements gonadotropes sont les follicules sains qui mesurent au moins 2 mm de diamètre au début de la stimulation ;

\* les animaux chez lesquels sont observés de fortes réponses se caractérisent par une folliculogénèse très active, c'est-à-dire par la présence d'un grand nombre de follicules dont la croissance est rapide. Le seul facteur numérique expliquerait 70 % de la variabilité du nombre d'ovulations observée à la suite d'un traitement de superovulation. Cette valeur est à rapprocher des résultats publiés récemment par Hahn (1992) selon lequel 24 % de la variabilité des réponses est expli-

quée par des facteurs extrinsèques (traitement, parité des animaux, conditions d'élevage...).

## Influence du follicule dominant

La dominance est un concept proposé par Goodman et Hodgen (1983) pour expliquer pourquoi, chez les primates, un seul follicule ovule à chaque cycle. L'existence d'un tel follicule se traduit par l'arrêt de la croissance des follicules plus petits ; on sait depuis qu'ils deviennent atrétiques. Pour l'espèce bovine, la première preuve expérimentale d'un tel phénomène a été apportée par l'analyse des résultats des traitements de superovulation (Grasso *et al* 1989) : la comparaison des réponses chez les animaux pour lesquels le traitement a commencé en présence ou en absence d'un follicule dominant montre que dans ce dernier cas le nombre moyen d'ovulation est doublé. Cet effet délétère de la présence d'un follicule dominant a depuis été confirmé (tableau 4). Il faut insister sur le fait que la taille n'est pas un critère suffisant pour identifier un follicule dominant ; il faut aussi que ce follicule soit en croissance. Cette deuxième caractéristique explique pourquoi la relation entre la présence d'un follicule dominant et la diminution des réponses au traitement de superovulation n'a pas pu être établie avant que les techniques d'échographie soient disponibles ; par ailleurs elle implique l'observation quotidienne des ovaires pendant au moins les 3 jours qui précèdent le traitement, contrainte qui limite l'utilisation d'un tel contrôle dans la pratique de la production d'embryons.

Ces relations entre l'activité ovarienne et l'efficacité des traitements de superovulation montrent clairement que dans les conditions où le traitement de superovulation (traitement gonadotrope + traitement de synchronisation de l'estrus) est optimisé, ce qui est le cas depuis plusieurs années, le nombre d'ovulations induites est le reflet de l'état des ovaires au moment où commencent les injections de FSH. Il est donc vain d'espérer que la production d'embryons puisse être améliorée de façon significative par l'utilisation de nouvelles préparations d'extraits hypophysaires, de nouveaux « cocktails » d'hormones, de protocoles d'administrations réévalués. Si,

**La présence d'un follicule ovarien dominant lorsqu'on débute le traitement divise par 2 le nombre d'ovulations induites.**

Tableau 4. Influence de la présence, au début du traitement, d'un follicule dominant sur la réponse au traitement de superovulation (moyenne  $\pm$  écart-type).

Référence		Follicule dominant présent		P
		absent	présent	
Guilbault <i>et al</i> 1991	Nb animaux	8	6	$P < 0,01$
	Nb ovulations	7,1 $\pm$ 1,8	13,5 $\pm$ 1,4	
Huhtinen <i>et al</i> 1992	Nb animaux	13	22	$P < 0,01$
	Nb embryons	4,1 $\pm$ 1,6	10,3 $\pm$ 1,3	
Bungartz et Nieman 1993	Nb bons embryons	2,2 $\pm$ 1,4	6,6 $\pm$ 1,1	$P < 0,05$
	Nb animaux	9	17	
	Nb ovulations	4,7 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 1,0	$P < 0,0005$
	Nb embryons	2,8 $\pm$ 1,0	8,2 $\pm$ 1,1	
	Nb bons embryons	2,1 $\pm$ 0,9	4,0 $\pm$ 1,0	

à l'avenir, le nombre d'embryons peut être augmenté, c'est en créant par un prétraitemen t un ovaire susceptible de répondre fortement à une stimulation gonadotrope, à savoir un ovaire dont le nombre de follicules sains de plus de 2 mm de diamètre est important et sur lequel il n'y a pas de follicule dominant. Il faut noter qu'une solution efficace pour éliminer l'effet délétère du follicule dominant ne sera pas la panacée ; il restera toujours comme facteur limitant le nombre de follicules qui peuvent être recrutés lors de la stimulation gonadotrope.

## Amélioration de la production d'embryons : perspectives

L'état variable de la population folliculaire peut être dû à des facteurs génétiques et/ou être la conséquence de situations physiologiques particulières. Il est possible aussi de créer par des traitements appropriés les conditions d'une bonne réponse à la stimulation gonadotrope. En effet, les mécanismes qui contrôlent la croissance folliculaire sont de mieux en mieux connus et de nouvelles molécules actives sur la fonction de reproduction sont disponibles. La prise en compte des données théoriques et de ces nouvelles possibilités d'intervention devraient permettre prochainement d'améliorer de façon significative l'efficacité des traitements de superovulation.

### Comment éviter les effets délétères du follicule dominant ?

Au cours d'un cycle normal, l'apparition d'un follicule dominant est précédée par une augmentation des concentrations de FSH, concentrations qui ensuite chutent au fur et à mesure que ce follicule grossit. La sécrétion d'œstradiol et d'inhibine explique seulement pour partie cette évolution de la sécrétion de FSH. Par rapport à ces phénomènes, on ne connaît rien de la cinétique de l'induction de l'atrézie des petits follicules ni de la réapparition des follicules sains lorsque le follicule dominant n'a plus d'effet (la disparition des effets précédant la diminution de la taille du follicule dominant). Même si les systèmes de régulation impliqués dans le développement et la régression du follicule dominant ne sont pas bien connus et bien qu'il n'y ait que des hypothèses pour expliquer les mécanismes par lesquels un follicule dominant induit l'atrézie des autres follicules, il n'en demeure pas moins vrai que les résultats d'une superovulation sont mauvais quand le traitement gonadotrope est initié en présence d'un follicule de plus de 8 mm et qui a cessé de grandir moins de 3 jours avant le début du traitement. Ce fait est suffisamment bien établi pour que des solutions soient recherchées.

Les expériences qui ont permis d'établir les relations entre follicule dominant et diminution des réponses ont consisté en des analyses rétrospectives d'enregistrement de la crois-

sance des follicules pendant la période qui précédait le traitement de superovulation. Toutefois, ceci ne présente guère d'intérêt pratique car il est rarement possible, dans le cadre d'une activité commerciale, d'assurer un tel suivi. Dans le but de rendre possible un diagnostic clinique, il a été envisagé de se contenter de la seule observation d'un gros follicule au début de la stimulation gonadotrope (Wilson *et al.* 1990) ; il n'est pas surprenant que cette approche n'ait donné aucun résultat positif. Plus récemment (Bungartz et Niemann 1994), il a été proposé de ne plus juger la présence d'un follicule dominant par la mise en évidence d'un gros follicule mais en regardant le nombre de petits. Cette approche semble donner des résultats intéressants mais il n'est pas sûr que ce soit spécifiquement l'influence du follicule dominant qui ait été mise en évidence.

Puisque le contrôle par échographie de la présence d'un follicule dominant est difficile à utiliser en routine, il est proposé de traiter les animaux un jour particulier du cycle, quand un tel follicule est susceptible d'être absent. L'efficacité de la stimulation gonadotrope a été analysée en fonction du jour du cycle où le traitement de superovulation était commencé ; une revue de la littérature (Saumande 1987) a permis de conclure que c'est seulement pour des traitements gonadotropes commencés avant le 8<sup>e</sup> jour du cycle qu'il y avait diminution du nombre moyen d'ovulations. Depuis qu'il est possible, grâce à l'échographie, de suivre l'apparition des follicules dominants, ce résultat peut être expliqué : selon les animaux, il apparaît au cours du cycle oestrien de 1 à 4 follicules dominants (le plus couramment 2 ou 3) et même s'il est possible d'établir des courbes moyennes, les jours du cycle où un follicule dominant est absent ne sont pas les mêmes d'un individu à l'autre. Il n'est donc pas possible de définir *a priori* des jours du cycle plus favorables que d'autres à l'initiation d'un traitement de superovulation.

La méthode qui a le plus de chance de s'avérer efficace serait de détruire, avant l'administration du traitement gonadotrope, un éventuel follicule dominant. A cette fin, l'efficacité de plusieurs hormones susceptibles d'induire l'atrézie et/ou la lutéinisation (LH, hCG, GnRH, œstradiol-17 $\beta$ ) a été évaluée mais, jusqu'à présent, sans résultats favorables sur la superovulation. La difficulté pour mettre au point de tels pré-traitements tient au nombre d'animaux nécessaires pour définir non seulement la molécule et les doses efficaces mais aussi l'intervalle optimum entre l'intervention sur le follicule dominant et le début de la stimulation gonadotrope. Il peut aussi être envisagé d'intervenir par des méthodes physiques. Les premiers résultats de superovulation après rupture manuelle (Bartmann 1992) ou ponction du follicule dominant sous contrôle échographique (Bungartz et Niemann 1994) sont encourageants mais l'utilisation de telles méthodes en ferme est plus problématique.

**L'effet inhibiteur du follicule dominant sur les autres peut être levé par un prétraitemen t, hormonal ou physique.**

## Est-il possible d'augmenter le nombre de follicules susceptibles de répondre au traitement de superovulation ?

La première voie d'approche consiste à intervenir sur la fonction gonadotrope. Deux stratégies sont actuellement envisagées. Si celles-ci ont le même but, elles sont à l'opposé pour ce qui est des principes puisque dans un cas il s'agit d'augmenter les concentrations de gonadotrophines alors que dans l'autre, au contraire, on cherche à les abaisser.

Les gonadotrophines agissent sur la totalité de la population des follicules en croissance. Par exemple, chez les bovins, 6 jours après injection de eCG, le nombre de follicules pré-antraux est augmenté de 30 % (Monniaux 1982). Il est donc raisonnable d'essayer d'augmenter le nombre des follicules qui déterminent la réponse au traitement de superovulation par un prétraitement qui induit une élévation des concentrations des gonadotrophines. L'apport de gonadotrophines exogènes est la méthode la plus anciennement utilisée. Lors de nombreux essais, la nature de la gonadotrophine (eCG ou FSH), les doses, les durées du prétraitement, le jour du cycle où il est commencé et l'intervalle entre cette première intervention et le début du traitement de superovulation ont été testés. Lorsqu'un effet a été obtenu, cela a toujours été une diminution de la réponse (cf. revue de Saumande 1987).

Il est aussi possible d'augmenter les concentrations de gonadotrophines endogènes en limitant la rétroaction négative des sécrétions ovariennes sur l'activité du système hypothalamo-hypophysaire. Pour cela, les animaux sont immunisés contre des stéroïdes ou contre l'inhibine. Chez les bovins, seule l'immunisation contre l'inhibine modifie la fonction ovarienne ; un tel traitement permet d'augmenter le nombre d'ovulations lors d'un œstrus normal et la réponse des animaux immunisés au traitement de superovulation semble être améliorée (Hillard *et al* 1990).

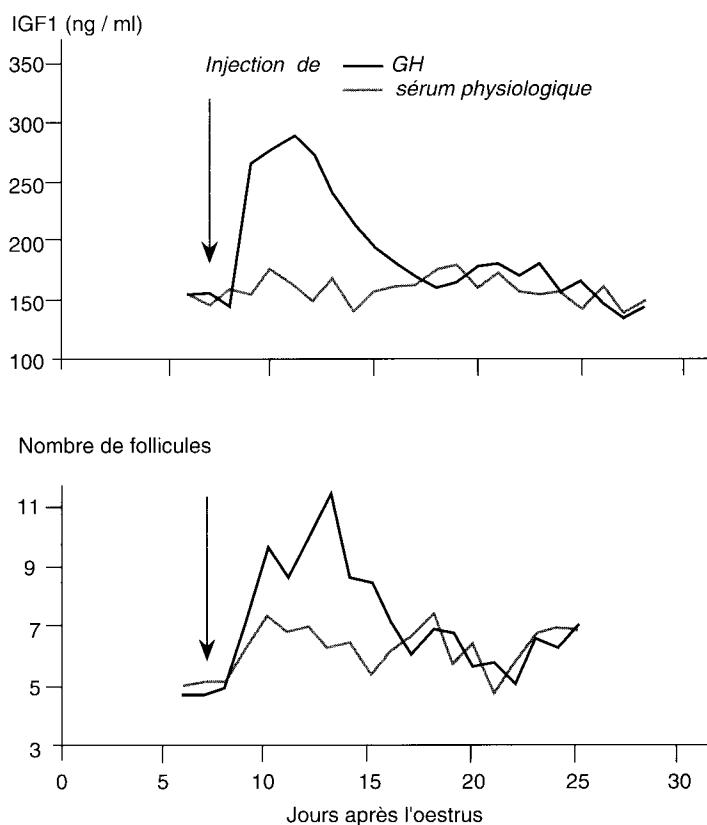
Seule la fin de la croissance des follicules est strictement dépendante de l'activité hypophysaire. Si les sécrétions endogènes de LH et FSH sont inhibées, la croissance des follicules ne se fera pas complètement et une accumulation des follicules dans les classes de taille qui précèdent la dépendance vis-à-vis des gonadotrophines sera observée. C'est à cause de cette accumulation de petits follicules qu'une augmentation de la réponse au traitement de superovulation peut être espérée. Une méthode efficace pour freiner, de façon réversible, les sécrétions de LH et de FSH est d'induire une désensibilisation hypophysaire au GnRH par un traitement prolongé avec un agoniste. La pertinence de cette approche a été montrée chez les ovins. Après administration de GnRH à l'aide d'une mini-pompe osmotique pendant 30 jours, les niveaux de FSH sont fortement déprimés et il n'y a plus de pulses de LH ; à la suite d'un tel

traitement, si le nombre total de follicules de plus de 1 mm n'est pas modifié, aucun d'entre eux ne dépasse 2,5 mm contre 50 % chez les animaux témoins (McNeilly et Fraser 1987). Chez des brebis qui ont reçu un tel traitement de désensibilisation pendant 15 jours seulement, le nombre d'ovulations en réponse au traitement de superovulation est augmenté de 50 % (Brébion et Cognié 1989). Pour l'espèce bovine, l'efficacité du traitement de désensibilisation hypophysaire est établie (Saumande *et al* 1994) et les modifications à apporter au traitement de superovulation sont en cours d'étude.

Une deuxième voie d'approche récemment envisagée consiste à augmenter le nombre de follicules qui peuvent être recrutés lors du traitement de superovulation en stimulant préalablement la sécrétion d'IGF1. Parmi les facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la fonction ovarienne, IGF1 semble particulièrement important (Monget 1993). La synthèse de ce peptide se fait principalement au niveau du foie sous le contrôle de l'hormone de croissance (GH). L'injection de GH à des génisses induit une augmentation des concentrations plasmatiques d'IGF1 et un doublement du nombre de follicules de 2 à 5 mm (figure 4) (Gong *et al* 1993). Lorsqu'une injection de GH est réalisée 5 jours avant la stimulation gonadotrope du traitement de superovulation, chez les animaux

**Pour augmenter le nombre de follicules répondant au traitement de superovulation, diverses solutions sont envisagées : freiner les sécrétions de FSH et LH, stimuler la sécrétion d'IGF1.**

Figure 4. Evolution des concentrations plasmatiques d'IGF1 et du nombre de follicules de moins de 5 mm de diamètre après injection de GH ou de sérum physiologique. Valeurs moyennes pour 6 génisses dans chacun des lots (d'après Gong *et al* 1993).



**Tableau 5. Influence d'un pré-traitement par de la GH sur la réponse au traitement de superovulation (d'après Gong et al 1995).**

Des génisses ont reçu le 7<sup>e</sup> jour du cycle, soit de la GH (n = 8), soit du sérum physiologique (n = 8) ; 5 jours plus tard les injections de FSH ont débuté. Les résultats présentés ont été obtenus après 3 répétitions des traitements ; seules sont considérées les réponses des animaux pour lesquels des embryons ont pu être collectés.

	Témoin	GH
Nombre de résultats considérés	16	17
Nombre d'embryons collectés	4,5 ± 0,8	8,1 ± 1,2
Nombre d'embryons transférables	3,1 ± 0,7	7,4 ± 1,3

ainsi traités le nombre d'ovulations est fortement augmenté en comparaison de ce qui est observé chez les animaux qui n'ont pas reçu le prétraitement (après 2 000 UI eCG 17,2 ± 2,8 vs 10,6 ± 2,7 ; après 1,2 UI oFSH<sup>(4)</sup> 18,6 ± 2,0 vs 10,8 ± 1,7). Les effets sur le nombre d'embryons transférables sont par contre moins clairs : après stimulation par eCG il n'y a pas d'effet bénéfique du prétraitement par GH, et les résultats obtenus après stimulation par FSH (tableau 5) doivent être considérés avec prudence dans la mesure où ils ont été obtenus après 3 répétitions de traitements sur les mêmes animaux et qu'ils ne prennent pas en compte les génisses chez lesquelles aucun embryon n'a été collecté.

Lors de cette étude il a été de nouveau montré que la réponse au traitement de superovulation dépendait de l'état de la population folliculaire au moment où est injectée la gonadotropine : il existe une très forte cor-

(4) Exprimé en unité oFSH S16 ; cela correspond à environ 320 µg de pFSH.

rélation ( $r = 0,71$  ;  $P < 0,01$ ) entre le nombre de follicules de moins de 5 mm détectés par échographie le jour d'injection d'eCG et le nombre d'ovulations.

## Conclusion

Le transfert d'embryons n'a pas eu le développement que certains lui prédisaient il y a une dizaine d'années. En moyenne le nombre d'embryons obtenus à la suite d'un traitement de superovulation reste faible ce qui a pour conséquence un prix de revient élevé et ceci est un premier frein à une utilisation plus large de cette technique. Pour ce qui est de l'intérêt du transfert d'embryons pour l'amélioration génétique, la principale limite à l'utilisation de la méthode est que l'on n'est jamais assuré de disposer d'un nombre minimum d'embryons à partir d'une femelle traitée. La mise en évidence des relations entre l'état de la population folliculaire et la réponse à la stimulation gonadotrope a permis d'ouvrir de nouveaux axes de recherche. Selon des stratégies différentes, les méthodes envisagées consistent à créer des ovaires sensibles en intervenant préalablement au traitement de superovulation pour détruire le follicule dominant et/ou pour augmenter le nombre des follicules susceptibles d'être recrutés par le traitement gonadotrope. Les voies de recherche actuelles, lorsqu'elles aboutiront, n'auront sans doute pas de conséquences très importantes sur le nombre moyen d'embryons ; on peut par contre raisonnablement envisager une forte diminution de la fréquence des animaux qui produisent pas ou trop peu d'embryons (1/3 des animaux actuellement).

## Remerciements

L'auteur tient à remercier C. Chalon-Sochat (Génétique Limousin Charente) et M. Courto (INRA) pour leur lecture critique du manuscrit.

## Références bibliographiques

- Bartmann C.P., 1992 cité par Meinecke B., 1994. Superovulation : recent advances and practical experience. C.R. 10<sup>e</sup> Colloque AETE Lyon 8 pp.
- Brébion P., Cognié Y., 1989. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pretreatment. C.R. 5<sup>e</sup> Colloque AETE Lyon, 106.
- Bungartz L., Niemann H., 1993. Effects of a dominant follicle on ovarian responses of dairy cows following various superovulatory treatment schedules. Theriogenology, 39, 198 (abstr.)
- Bungartz L., Niemann H., 1994. Assessment of the presence of the dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. J. Reprod. Fert., 101, 583-591
- Chupin D., 1988. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Colloque Soc. Fr. Etudes Fertil., 26, 213-232.
- Elsden R.P., Nelson L.D., Seidel G.E., 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology, 9, 17-26.
- Gong J.G., Bramley T.A., Wilmut I., Webb R., 1993. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. Biol. Reprod., 48, 1141-1149.
- Gong J.G., Wilmut I., Bramley T.A., Webb R., 1995. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. Theriogenology, 43, 221 (abstract).
- Goodman A.L., Hodgen G.D., 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. Recent Progr. Horm. Res., 39, 1-73.
- Grasso F., Guilbault L.A., Roy G.L., Matton G., Lussier J.G., 1989. The influence of the presence of a

- dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. *Theriogenology*, 31, 199 (Abstr.).
- Guilbault L.A., Grasso F., Lussier J.C., Rouillier P. Et Matton P., 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fert.*, 9, 81-89.
- Hahn J., 1992. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, 37, 269-275.
- Hillard M.A., Bindon B.M., King B., O'shea T., Andrews C.M., Hinch G.N., 1990. Superovulation of cows immunized against native ovine inhibin. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 22, 134 (Abstr.).
- Huhtinen M., Rainio V., Aalto J., Bredbacka P., Naki-Tanila D., 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*, 37, 457-463.
- Lacaze S., Coupet H., Blattes M., Perrin V., Hennequin M., 1992. Influences of artificial insemination number and bull on the percentage of transferable embryos in superovulated dairy cows. *C.R. 8<sup>e</sup> Colloque AETE Lyon*, 174.
- Lindsell C.E., Rajkumar K., Manning A.W., Emery S.K., Mapleton R.J., Murphy B.D., 1986. Variability in FSH : LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology*, 25, 167 (abstr.).
- Monget Ph., 1993. Importance des facteurs paracrinés dans l'ovaire. *C.R. 9<sup>e</sup> Colloque AETE Lyon*, 75-85.
- Monniaux D., 1982. Origine de la variabilité de la réponse ovulatoire à PMSG chez la génisse. Thèse Paris 6, 77 pp.
- Monniaux D., Chupin D., Saumande J., 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19, 55-81.
- Mc Neilly A.S., Fraser H.M., 1987. Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocr.*, 115, 273-282.
- Saumande J., 1978. Relationships between ovarian stimulation by PMSG and steroid secretion. In : *Control of reproduction in the cow*, J.M. Sreenan (ed.), 169-194. M. Nijhoff, The Hague.
- Saumande J., 1987. Superovulation in cattle : last improvements and prospects. 3rd Meeting European Embryo Transfer Association, Lyon 4-5 septembre, 97-141.
- Saumande J., Chupin D., 1986. Induction of superovulation in cyclic heifers : the inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology*, 25, 233-247.
- Saumande J., Chupin D., Mariana J.C., Ortavant R., Mauleon P., 1978. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In : *Control of reproduction in the cow*, J.M. Sreenan (ed.), 195-224. M. Nijhoff, The Hague.
- Saumande J., Heyman Y., Renard J.P., Chupin D., 1980. New attempts for decreasing the variability of the ovarian response to PMSG in cattle. Comparison of different schemes of treatment. 9th Intern. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., Madrid 1980, V, 556-559.
- Saumande J., Procureur R., Chupin D., 1984. Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology*, 21, 727-731.
- Saumande J., Dufour J., Matton P., 1994. The effect of FSH on follicular growth and estradiol secretion in heifers submitted to a long term treatment with a GnRH agonist. *C.R. 10<sup>e</sup> Colloque AETE Lyon*, 246.
- Wilson J.W., Jones A.L., Miller D.R., 1990. Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. *Theriogenology*, 33, 349.

## Abstract

### *Bovine embryo production : what are the future research options for increasing the efficiency of superovulation treatments ?*

In bovines, commercial development of embryo transfer has existed for about 15 years. Despite the number of studies undertaken during this period, two major initial problems remain unsolved. The first is that there are still, on average, only a low number of embryos harvested from each treated cow. This, consequently elevates the production cost. The second problem is the large number of animals that do not produce any transferable embryo, making the use of this technique less attractive in genetic improvement programmes. These problems limit the development of the embryo transfer technique. They go on, despite the fact that superovulation treatments have been optimized, and that hypophysial extracts used to stimulate follicular growth are better defined and controlled than they were 15 years ago.

At the moment, the main factor determining the number of transferable embryos is the number of induced ovulations. Studies investigating the

relationship between ovarian function and the response to superovulation treatments have demonstrated that the number of ovulations depends on the status of the follicle population at the beginning of the gonadotrophic stimulation (presence of a dominant follicle, number of follicles greater than 2 mm in diameter). It seems, therefore, that improvements in the efficiency of the superovulation treatments depend less on the development and use of new molecules or new protocols of treatment than on the administration of a « pre-treatment » capable of causing the dominant follicle to regress and/or augmenting the number of follicles that could be recruited by the gonadotrophins. To this end, several possibilities are under study. The initial results are encouraging and should soon allow new strategies to be proposed that will produce embryos more efficiently.

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