



**HAL**  
open science

# Modulation des taux plasmatiques d'insuline par l'apport de propylène glycol dans l'alimentation : effet sur la quantité, la qualité des ovocytes et des embryons produits in vitro chez des génisses laitières

Giselle del Carmen Gamarra Lazo

## ► To cite this version:

Giselle del Carmen Gamarra Lazo. Modulation des taux plasmatiques d'insuline par l'apport de propylène glycol dans l'alimentation : effet sur la quantité, la qualité des ovocytes et des embryons produits in vitro chez des génisses laitières. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2014. Français. NNT : 2014AGPT0083 . tel-03027529v2

**HAL Id: tel-03027529**

**<https://pastel.hal.science/tel-03027529v2>**

Submitted on 27 Nov 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de la vie et Santé

*présentée et soutenue publiquement par*

**Giselle del Carmen GAMARRA LAZO**

le 16 octobre 2014

### **Modulation des taux plasmatiques d'insuline par l'apport de propylène glycol dans l'alimentation : effet sur la quantité, la qualité des ovocytes et des embryons produits in vitro chez des génisses laitières**

Directeur de thèse : **Andrew PONTER**

Co-encadrement de la thèse : **Claire PONSART**

#### **Jury**

**Mme. Isabelle DONNAY**, Prof., Université catholique de Louvain, Belgique  
**M. Philippe MONGET**, Prof., UMR 0085 PRC, INRA, Nouzilly  
**M. Jo LEROY**, Prof., University of Antwerp, Belgique  
**Mme. Bénédicte GRIMARD**, Prof., UMR 1198 INRA-ENVA, Maisons-Alfort  
**Mme. Claire PONSART**, PhD, ANSES, Maisons-Alfort  
**M. Andrew PONTER**, Prof., UMR 1198 INRA-ENVA, Maisons-Alfort

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur

*Je dédie cette thèse à mon fils adoré Gael Nicolas*

*qui est la raison de ma vie*

*A mes parents, mon père José qui est dans le ciel et ma mère Lucila*

*A mes sœurs Marleny et Liliana*

*A mon amour Serge*

*Leur soutien constant, leur encouragement et amour m'ont donné la force et la capacité de croire en moi et je crois que tout est possible,*

*Cette thèse est la votre*

*Dedico esta tesis a mi hijo adorado Gael Nicolas*

*que es la razón de mi vida*

*A mis padres, mi papito José que está en el cielo y a mi mamita Lucila*

*A mis hermanas Marleny y Liliana*

*A mi amor Serge*

*Su constante apoyo, estímulo y amor me dieron la fuerza y la capacidad de creer en mí y creer que todo es posible,*

*Esta tesis es de todos ustedes*

**Table des matières**

|  |     |
|--|-----|
| Remerciements .....  | 5   |
| Résumé .....   | 7   |
| Summary .....  | 9   |
| Liste des figures.....   | 11  |
| Liste des tableaux .....   | 14  |
| Liste des publications .....   | 16  |
| Liste des abréviations .....   | 18  |
| Chapitre 1. Introduction générale.....   | 20  |
| Chapitre 2. Revue de la bibliographie .....  | 24  |
| 1. Stimulation de la croissance folliculaire et biotechnologies de la reproduction : bases physiologiques et applications chez la vache .....  | 24  |
| 1.1 Bases physiologiques de la folliculogénèse, de l’ovogénèse et du développement embryonnaire précoce chez la vache.....   | 24  |
| 1.2 Utilisation des biotechnologies de la reproduction chez la vache : la collecte d’ovocytes par ovum pick up (OPU) et production d’embryons in vitro (PIV) .....   | 63  |
| 2. Indicateurs du métabolisme énergétique chez la vache : interactions avec la croissance folliculaire et le développement embryonnaire précoce.....   | 71  |
| 2.1 Bilan énergétique, poids vif et état corporel.....   | 71  |
| 2.2 Métabolites sanguins et hormones métaboliques .....  | 73  |
| 2.3 Les effets du métabolisme énergétique sur la croissance folliculaire et développement embryonnaire précoce .....   | 78  |
| 3. Modifications de l’insuline et de l’IGF1 et impacts sur la fonction de reproduction chez les bovins .....   | 85  |
| 3.1. Modifications physiologiques de l’insuline et de l’IGF1 chez les bovins.....  | 85  |
| 3.2. Modifications de l’insuline et de l’IGF1 induites par des suppléments alimentaires chez les bovins et conséquences sur la fonction de reproduction.....   | 93  |
| Chapitre 3. Hypothèse et Objectifs.....  | 112 |
| Chapitre 4.....  | 114 |
| La supplémentation à court terme de propylène glycol influe sur la circulation des hormones métaboliques, les concentrations de progestérone et la croissance folliculaire chez les génisses laitières. .... | 114 |
| Chapitre 5 .....   | 129 |
| Effets de propylène glycol sur la production d’embryons in vitro après ponctions d’ovocytes (OPU) chez des génisses laitières ayant des profils contrastés d’hormone Anti-Müllérienne.....                   | 129 |

|  |     |
|--|-----|
| Chapitre 6 .....   | 145 |
| La supplémentation avec du propylène glycol modifie l'expression des gènes du système IGF dans les COCs et l'expression de gènes candidats sélectionnés dans les embryons produits in vitro chez les génisses présentant deux profils contrastés d'AMH et soumises à une alimentation restreinte ..... | 145 |
| Chapitre 7. Discussion générale .....  | 162 |
| 1. Maximiser les effets du PG sur les concentrations plasmatiques de métabolites, des hormones métaboliques et reproductives. ....   | 165 |
| 2. Effets du PG sur la croissance folliculaire, la réponse à la stimulation hormonale de la croissance folliculaire, la qualité des ovocytes et la production d'embryons.....  | 168 |
| 3. Influence de l'administration orale de PG sur les concentrations intra-folliculaires des hormones métaboliques, sur les profils d'expression des gènes du système IGF1 dans les COCs et des gènes candidats associés à la qualité embryonnaire.....   | 172 |
| 3.1 Liquide Folliculaire .....   | 172 |
| 3.2 Profils d'expression des gènes du système IGF1 dans les COCs.....  | 173 |
| 3.3 Profils d'expression de gènes candidats de qualité embryonnaire .....  | 176 |
| 4. Utiliser l'AMH comme marqueur endocrinien pour prédire la production d'embryons in vitro chez les bovins.....   | 180 |
| Chapitre 8. Conclusions et perspectives .....  | 182 |
| Références Bibliographiques.....   | 185 |
| Annexes.....   | 215 |
| 1. Article au titre des collaborations scientifiques.....  | 215 |
| 2. Posters .....   | 220 |

**Remerciements**

Je tiens à remercier l'UNCEIA (Union Nationale des Coopératives d'insémination Animale) et MIDATEST (Union Régionale des Coopératives d'Insémination Animale du Sud-Ouest de la France) pour le financement de ma thèse; un remerciement au directeur actuel de l'UNCEIA Xavier David et son prédécesseur Maurice Barbezant avec qui nous avons initié le projet, remerciement au directeur actuel de MIDATEST Bruno Pount et à son prédécesseur Jacques Biau qui accepta que la Station de Biotechnologies MIDATEST de Denguin soit le support expérimental de ma thèse. Par la même occasion que les présidents des deux unions Michel Cetre et Gilles Gibaud soient aussi remerciés.

Je remercie l'école doctorale ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé) de l'AgroParisTech pour leur accompagnement et les formations très intéressantes proposées tout au long du cursus.

Je remercie Madame Corinne Cotinot, directrice de l'UMR BDR de m'avoir accueillie au sein de leur unité.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse Andrew Ponter et Claire Ponsart, qui m'ont accompagnée avec ténacité dans cette expérience. Je les remercie de m'avoir transmis leur expérience de recherche, de m'avoir soutenue, de m'avoir souvent recadrée, de m'avoir encouragée jusqu'à la fin, ce fût un grand plaisir de travailler à leur côté autant du point de vue humain que scientifique.

Je tiens également à remercier chaleureusement les rapporteurs Isabelle Donnay, Philippe Monget et les examinateurs Bénédicte Grimard, Jo Leroy, qui ont accepté d'évaluer ce travail et passé de leur temps précieux sur cette étude.

Je remercie tous les membres du comité de thèse : Fabienne Nuttick, Brigitte Le Guienne, Danielle Monniaux, Pascale Chavatte, Isabelle Hué, Pascal Mermillod, Patrice Humblot, Serge Lacaze pour leurs remarques pertinentes, leurs idées constructives et leur accompagnement.

Je veux remercier Brigitte Le Guienne pour ces conseils multiples, sa disponibilité et son aide pendant mon travail de thèse et pour le démarrage du laboratoire de FIV de MIDATEST à Denguin.

Merci également au laboratoire de la physiologie de la reproduction et du comportement de Nouzilly pour les analyses d'AMH en particulier à Danielle Monniaux pour son expérience partagée sur des sujets passionnants comme l'AMH.

Je veux remercier le laboratoire BDR de Jouy en Josas, pour leur accueil lors de mes analyses de l'expression des gènes des cellules du cumulus et des ovocytes. Remerciement spécial à Fabienne Nuttinck qui m'a appris la biologie moléculaire et à Daniel Le Bourhis qui n'a pas de secret pour les biopsies des embryons.

Merci au laboratoire de la physiologie de la reproduction et du comportement de Nouzilly qui m'a ouvert les portes pour les analyses gènes embryonnaires, en particulier Pascal Mermillod, Amanda Cordoba et Pascal Papillier, pour leur accueil, leur aide et leurs conseils.

Merci au laboratoire d'hormonologie de l'UNCEIA en particulier Marie-Christine Deloche et Brigitte Le Guienne pour tous les conseils et analyses multiples.

Je veux remercier le laboratoire de l'ENVA, Christine Ficheux, Andrew Ponter pour les dosages.

Je remercie le personnel de la Station de Biotechnologies MIDATEST de Denguin, Serge Lacaze, Michel Mouneyres, Jean Louis Planté, Michel Sens, Jacques Lauga, Sylvain Maunas, Francine Pecino, Sylvie Mouneyres, les deux stagiaires Mohammed Sehnine et Cyril Palleau, pour leur patience, leur dévouement (même les nuits) leur motivation et leur aide précieuse.

Je veux remercier Philippe Gauthier (DIFAGRI) pour sa participation avec le PG (Propylène Glycol).

Merci à l'Acta informatique, en particulier à Thierry Brun pour la formation et ses conseils en statistiques.

Je veux remercier Sandrine Fréret et Julie Gatien pour leurs conseils et aides précieuses au niveau statistique.

Merci à tous mes collègues de l'UNCEIA qui m'ont soutenue pendant mes études.

Merci à mes amis de toutes les nationalités d'être restés des amis sincères que j'ai rencontrés tout au long de la thèse. Quand on est loin de son pays les amis deviennent la seconde famille.

Finalement, je veux remercier mon pays Pérou toujours dans mon cœur et pensées et à toute ma famille et amis sincères de toute la vie qui habitent là-bas ou qui sont partis dans différents lieux du monde.

## Résumé

L'Ovum Pick-Up (OPU) et la production d'embryons in vitro (PIV) représentent une voie d'accélération du progrès génétique par la voie femelle. Ces techniques impliquent la réalisation des étapes suivantes: collecte d'ovocytes de qualité pour produire des embryons transférables, survie embryonnaire élevée après congélation, maintien de la gestation après transfert de l'embryon chez une receveuse apte. La qualité des ovocytes et les taux de développement embryonnaire in vitro sont impactés par la nutrition des donneuses avant OPU, les effets étant médiés par plusieurs métabolites et hormones impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Les niveaux plasmatiques d'insuline et d'IGF1 accrus sont corrélés aux niveaux des apports énergétiques chez les génisses laitières. Les régimes augmentant les concentrations d'insuline influencent négativement la qualité des ovocytes. Néanmoins, une augmentation des concentrations d'insuline stimule en quelques jours le nombre des petits follicules. Ces résultats ont conduit à formuler l'hypothèse d'une modulation transitoire des concentrations d'insuline chez les donneuses d'ovocytes basée sur l'administration orale de propylène glycol (PG). En effet, le PG augmente les concentrations d'insuline et d'IGF-1 dans le plasma chez la vache au cours du post-partum. L'hormone antimüllérienne (AMH) est un marqueur endocrinien de la réserve de follicules ovariens sensibles aux gonadotrophines chez la vache. Il a été récemment établi que les niveaux des concentrations plasmatiques d'AMH aident à prédire la réponse des donneuses d'embryons collectés in vivo. Dans cette thèse, nous avons étudié l'effet de l'administration de PG à court terme sur les niveaux d'insuline, la croissance folliculaire, la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire au traitement FSH et la production d'embryons in vitro après OPU chez les génisses avec différents profils d'AMH circulante (haut H vs bas B). La relation entre la dose de PG chez les génisses laitières et la réponse à l'insuline a été établie, ainsi que les relations avec les concentrations plasmatiques d'hormones et métabolites du métabolisme énergétique. Puis, le nombre et la qualité morphologique des ovocytes et des embryons produits ont été déterminés chez les génisses donneuses ayant une alimentation restreinte. Enfin, les profils d'expression de gènes du système IGF dans les ovocytes et les cellules du cumulus et de gènes candidats de survie embryonnaire chez des blastocystes ont été évalués.

Nos données ont montré que l'administration de PG chez les génisses laitières est associée à une élévation des concentrations plasmatiques d'insuline, d'IGF1 et de glucose et à une diminution de celles de  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) et d'urée. Les concentrations d'IGF1

dans le liquide folliculaire ont augmenté. De plus, l'administration de PG a été associée à un nombre plus élevé de petits follicules (2- 3mm) le 2ème jour du cycle œstral par rapport au lot contrôle. Cet effet positif a été maintenu sur le nombre de follicules moyens (4-8mm) le 5ème jour du cycle, après stimulation de la croissance folliculaire dans le groupe AMH H. En outre, une augmentation significative du taux de blastocystes de qualité 1 après 7 jours de culture in vitro (exprimés en pourcentage d'ovocytes fécondés) a été observée chez les génisses du lot PG par rapport au lot contrôle. L'administration de PG a conduit au développement d'un nombre plus élevé de blastocystes épanouis le 7ème jour du cycle par rapport au contrôle, uniquement dans le groupe AMH H. De plus, le PG a modifié les profils d'expression des gènes du système IGF dans les cellules du cumulus et des gènes de survie étudiés chez les blastocystes. Par conséquent, nos données montrent que l'administration de PG a amélioré la production et la qualité des embryons in vitro, peut-être en raison des modifications du système IGF1 induites par le PG en début de vague folliculaire. Celles-ci pourraient moduler l'environnement folliculaire et impacter l'expression des gènes y compris jusqu'au stade blastocyste, l'effet étant cependant plus marqué chez les génisses à profil haut d'AMH.

---

|         |
|---------|
| Summary |
|---------|

The ovum pick-up and in vitro embryo production method in heifers can accelerate the speed of genetic progress through the female line. However, to be effective it requires high numbers of usable oocytes to be collected and high numbers of transferable embryos and high embryo survival after cryopreservation to ensure the maintenance of pregnancy after transfer. The variability in the quality of oocytes and embryo development rates in vitro may be influenced by the dietary intake of donor cattle before oocyte recovery and may be related to the concentrations of metabolites and hormones involved in regulating energy metabolism: in particular, increased levels of insulin and IGF1 were associated with high energy intake in dairy heifers. Moreover, in heifers, it was shown that diets that increase insulin concentrations negatively influence the quality of oocytes. However an increase in insulin concentrations over a short lapse of time has a positive effect on the growth of small follicles prior to superovulatory treatment. These findings support the idea that it may be possible to modulate insulin concentrations transiently to improve reproductive success. The addition of propylene glycol (PG) to the diet increases the concentrations of insulin and IGF1 in plasma in cows during the post-partum period. Anti-müllerian hormone (AMH) is an endocrine marker of the size of the pool of ovarian gonadotrophin-responsive follicles in the cow, and plasma AMH concentrations measured before stimulation of follicular growth with FSH hormone treatment can help predict the response of individuals. In this thesis, we investigated the effect of short-term PG administration to modulate the levels of insulin, follicular growth, the superovulatory response and in vitro embryo production after OPU in heifers with different pre-experimental circulating AMH profiles (high, H vs. low, L). Firstly, the relationship between the dose of propylene glycol in dairy heifers and the insulin response was established. Secondly, the number and morphological quality of oocytes and embryos produced with and without a supplement of propylene glycol in feed-restricted heifers were determined. Thirdly, the gene expression patterns of the IGF system in oocytes and cumulus cells and the expression profile of selected candidate genes that are important for in vitro embryo development were evaluated. Plasma concentrations of some hormones and metabolites and their relationship with PG were also studied.

Our data show that administration of PG increased plasma insulin, IGF1 and glucose concentrations and decreased plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and urea concentrations in feed-restricted heifers. PG as an oral drench also increased IGF1 concentrations in follicular

fluid. In addition, PG increased the number of small (2–3mm) follicles on Day 2 during the first follicle wave in both AMH groups (H and L) compared with the control treatment (water drench). PG only continued to have a positive effect on the number of medium (4–8mm) follicles on Day 5 after stimulation of follicular growth in the AMH H group. Additionally, there was a significant increase in Day 7 Grade 1 blastocysts (expressed as a percentage of fertilized oocytes) after PG compared with control treatment in both AMH groups of heifers. PG increased the number of expanded blastocysts at Day 7 compared with control but only in AMH H and not AMH L heifers. Additionally, PG modified the gene expression pattern of the IGF system in cumulus cells and produced changes in gene expression in blastocysts. Consequently, our data showed that PG administration is effective in improving in vitro embryo production probably due to the existence of epigenetic regulation induced by PG during follicular growth in the IGF1 system. This regulation system may modulate the follicular environment and level of gene expression up to the blastocyst stage more markedly in heifers with high compared to low AMH levels.

Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel.....   | 26 |
| Figure 2. Profils de références des hormones circulantes au cours du cycle œstral échelonnés sur deux périodes successives de 21 jours.....                                    | 27 |
| Figure 3. Résumé de l'ovogenèse et folliculogenèse chez les bovins. ....   | 29 |
| Figure 4. Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien.....  | 30 |
| Figure 5. Relation entre la croissance folliculaire et ovocytaire chez la vache.....   | 30 |
| Figure 6. Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire ....   | 31 |
| Figure 7. Interactions possibles de différents acteurs dans la transition de follicules primordiaux à primaires .....  | 33 |
| Figure 8. L'acquisition de la compétence ovocytaire et les phases de développement des ovocytes par rapport à la folliculogenèse terminale chez le bovin .....                 | 34 |
| Figure 9. Cycle œstral et vagues folliculaires .....   | 35 |
| Figure 10. Régulations de la sélection et du développement terminal du follicule ovulatoire pendant la phase folliculaire du cycle ovarien chez une espèce mono-ovulante ..... | 38 |
| Figure 11. Principaux facteurs impliqués dans le développement folliculaire et la communication intercellulaire.....   | 40 |
| Figure 12. Changements dans les niveaux et l'activité des éléments du système IGF pendant la croissance folliculaire et l'atrésie dans les ovaires chez les mammifères .....   | 43 |
| Figure 13. Concentration dans le liquide folliculaire de l'hormone (AMH), déterminée par ELISA.....  | 45 |
| Figure 14. Relation entre le nombre de follicules antraux et les concentrations plasmatiques anti-Müllerian hormone (AMH) chez les vaches Holstein .....                       | 46 |
| Figure 15. Hypothèses actuelles de régulations paracrines et endocrines sur la production d'hormone anti-Müllerienne au cours de la folliculogenèse chez les mammifères .....  | 49 |
| Figure 16. Phases de la croissance du follicule, prématuration de l'ovocyte, développement de follicule pré-ovulatoire et de l'ovule et la fécondation.....                    | 50 |
| Figure 17. Schéma de la distribution des organites cytoplasmiques pendant la maturation, la fécondation et la formation du zygote bovin.....                                   | 53 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 18. Relation entre la période (durée) de « coasting », le diamètre folliculaire et le pourcentage de blastocystes .....  | 55  |
| Figure 19. Rôles de l'hyperactivation induits par l'oviducte sur le sperme lors de l'approche de l'ovocyte: (a) détachement des spermatozoïdes des cellules épithéliales, (b) transport vers le lieu de la fécondation (c) traversée des cellules du cumulus, et (d) pénétration de la zone pellucide .....   | 58  |
| Figure 20. Progression de l'embryon dans les voies génitales femelles après la fécondation. 60  |     |
| Figure 21. Schéma des stades du développement embryonnaire précoce produit dans l'oviducte et l'utérus. Evolution des apports énergétiques, du bilan énergétique et de la note d'état corporel au cours de la lactation chez la vache laitière .....  | 61  |
| Figure 22. Evolution des apports énergétiques, du bilan énergétique et de la note d'état corporel au cours de la lactation chez la vache laitière .....   | 73  |
| Figure 23. Métabolisme énergétique chez des vaches n'étant pas en lactation (a.) et chez des vaches en lactation (b) avec un bilan énergétique négatif entraînant une mobilisation des réserves corporelles .....   | 75  |
| Figure 24. Estimation de l'utilisation métabolique du glucose chez la vache laitière produisant 30 kg de lait .....   | 76  |
| Figure 25 : Evolution des concentrations des métabolites et hormones au cours du post-partum, 32 vaches laitières Holstein .....  | 78  |
| Figure 26. Résumé du schéma montrant comment le bilan énergétique négatif peut influencer la fécondité à travers des effets sur le foie, l'ovaire et l'utérus .....   | 80  |
| Figure 27. Mécanismes métaboliques reliant le déficit énergétique et la qualité de l'ovocyte chez les vaches laitières hautes productrices.....   | 81  |
| Figure 28. La régulation du métabolisme par l'insuline .....  | 86  |
| Figure 29. La transduction de signal dans l'action de l'insuline .....  | 88  |
| Figure 30. Système IGF .....  | 91  |
| Figure 31. Métabolisme du propylène glycol (PG) et son interaction avec la cétogénèse dans le foie des bovins.....  | 98  |
| Figure 32. Concentrations sériques d'insuline de vaches nourries 12 fois par j (alimentation de base) mesurées entre 0–240 min après avoir reçu le propylène glycol en fonction du mode d'administration : mélangé au TMR (Total mixed ration, traitement = dietary), voie orale (traitement = Oral-drench), ou avec une canule dans le rumen (traitement = Rumens-drench). ..... | 100 |
| Figure 33. Effet de la méthode d'administration du propylène glycol (PG) sur la concentration plasmatique d'insuline pendant une période d'alimentation restrictive (d14) .....   | 101 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 34. Protocole expérimental chez des génisses laitières soumises à une alimentation normale (900 g/j).....   | 116 |
| Figure 35. Protocole expérimental chez les génisses AMH B (n=7) et AMH H (n=9) avec alimentation restreinte (600 g/j) .....  | 150 |
| Figure 36. Concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire (moyenne $\pm$ SEM) de génisses laitières ponctionnées au 9ème jour d'un cycle synchronisé, en fonction du régime alimentaire et de leur niveau d'AMH.....   | 158 |
| Figure 37. Expression des ARNm des gènes du système IGF dans les cellules du cumulus (A, B, C et D) et dans les ovocytes (E et F) collectés le 9ème jour d'un cycle synchronisé, en fonction du régime alimentaire des génisses et du profil d'AMH .....   | 159 |
| Figure 38. Expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme et du stockage lipidique (A et B), le métabolisme énergétique (C et D), la perméabilité des membranes (E), les marqueurs épigénétiques (F), la transformation de protéines (G), l'apoptose (H et I) chez des blastocystes expansés de qualité 1 produits à partir de génisses laitières en fonction du régime alimentaire et du profil d'AMH ..... | 160 |
| Figure 39. Bilan du mode d'action du PG administré sous forme liquide chez les génisses laitières .....  | 179 |

**Liste des tableaux**

Tableau 1. Facteurs qui peuvent promouvoir la croissance et le développement des follicules préantraux..... 41

Tableau 2. Catégories de population de follicules à antrum en relation avec la concentration d'AMH chez les bovins..... 47

Tableau 3. Stade du développement embryonnaire de la fécondation à l'élongation du blastocyste ..... 62

Tableau 4. Avantages de l'OPU-FIV sur la production d'embryon in vivo: comparaison d'une période de 60 jours ..... 65

Tableau 5. Résultats d'OPU-FIV en bovins : collecte d'ovocytes, production d'embryons et taux de gestation..... 67

Tableau 6. Tableau récapitulatif du Workshop réalisé à l'AETE 2012 sur l'utilisation ou non des traitements de stimulation de la croissance folliculaire par différents équipes d'Europe. 68

Tableau 7. Quelques associations connues entre le bilan énergétique et la reproduction..... 79

Tableau 8. Différentes études concernant la qualité des ovocytes chez les vaches laitières en début de lactation ..... 84

Tableau 9. Effets d'une suralimentation sur la croissance folliculaire, production d'ovocytes et d'embryons in vivo et in vitro chez les bovins..... 96

Tableau 10. Effets de l'administration du propylène glycol sur les concentrations des métabolites ..... 103

Tableaux 11. Effets de Propylène Glycol sur la fonction de reproduction chez les bovins... 107

Tableau 12. Effets de l'administration de l'insuline, glucose ou IGF-1sur les métabolites et reproduction ..... 112

Tableau 13. Primers utilisés pour la réaction RT-PCR pour produire la gamme standard .... 154

Tableau 14. Couple d'amorces utilisé pour la RT-PCR en temps réel.....154

Tableau 15. Primers utilisés pour RT-qPCR .....157

Tableau 16. Synthèse des résultats expérimentaux, suite à une administration de PG en poudre ou sous forme liquide ..... 163

Tableau 17. Synthèse des résultats de l'expérimentation 3 (comparaison entre le groupe Témoin (GMQ 900 g/j) et les groupes recevant une alimentation restreinte (R Contrôle) ou une alimentation restreinte combinée à une supplémentation en PG (R PG) ..... 164

Liste des publications

**Publications dans des journaux à comité de lecture**

**Gamarra G.**, Ponsart C., Lacaze S., Le Guienne B., Humblot P., Deloche M.-C., Monniaux D., and Ponter A. A. (2014). Dietary propylene glycol and *in vitro* embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. *Reprod. Fertil. Dev.*

**Gamarra G.**, Ponsart C., Lacaze S., Le Guienne B., Deloche M.-C., Monniaux D., Ponter A.A. (2014). Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers. *Livestock Science* 162: 240–251

**Gamarra G.**, Ponsart C., Lacaze S., Nuttinck F., Cordova A., Mermillod P., Le Guienne B., Monniaux D., Humblot P., Ponter A.A. (en préparation). Propylene glycol feeding supplementation modifies IGF system gene expression in COC and the expression of selected candidate genes in embryos produced *in vitro* in feed-restricted heifers with two AMH profiles.

**Communications et affiches publiées dans des actes de colloques avec comité de lecture**

**Gamarra, G.**, Ponsart, C., Lacaze S., Le Guienne B., Humblot P., Deloche M.-C., Monniaux D., Humblot P. and Ponter A. A. (2014). Effects of dietary propylene glycol on follicular fluid and ovum pick up *in vitro* embryo production in growth restricted heifers with two profiles of AMH. 41st IETS Annual Conference. *Reproduction Fertility and Development*. 27(1): 205.

**Gamarra G.**, Ponsart C., Lacaze S., Nuttinck F., Mermillod P., Le Guienne B., Monniaux D., Humblot P., Ponter A.A. (2014). Propylene glycol feeding supplementation modifies IGF system gene expression in COC and the expression of selected candidate genes in embryos produced *in vitro* in feed-restricted heifers. 41st IETS Annual Conference. *Reproduction Fertility and Development*. 27(1): 95.

**Gamarra G.**, Ponsart C., Lacaze S., Le Guienne B., Humblot P., Deloche M.-C., Monniaux D., and Ponter A. A. (2014). Ovum Pick Up and *in vitro* embryo production following propylene glycol diet in heifers differing in their AMH profiles. *Proceedings of the 30 th Scientific meeting of European Embryo Transfer Association (AETE)*.

**Gamarra G.**, Ponsart C., Lacaze S., Le Guienne B., Deloche M.-C., Monniaux D., Ponter, A. A. (2013). Superovulation response and oocyte recovery after Ovum Pick Up in feed restricted heifers with two profiles of AMH. In: *Proceedings of the 29th Scientific meeting of European Embryo Transfer Association (AETE)*.

**Gamarra G**, Ponter A, Lacaze S, Le Guienne B, Ponsart C. (2012). Short-term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones and progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 4). Abstract.

**Liste des abréviations**

|               |  |
|---------------|--|
| Acetyl-coA    | acetyl-coenzyme A                          |
| AGNE          | acides gras non-estérifiés                 |
| AMPc          | AMP cyclique                               |
| ARNm          | acide ribonucléique messenger              |
| ATP           | adénosine triphosphate                     |
| BEN           | bilan énergétique négative                 |
| BEP           | bilan énergétique positif                  |
| BHB           | $\beta$ -hydroxybutyrate                   |
| BMP-15        | Bone morphogenetic protein 15              |
| E2            | oestradiolœstradiol                        |
| EB            | balance énergétique                        |
| EGF           | epidermal growth factor                    |
| FGF           | fibroblast growth factors                  |
| FIV           | fécondation in vitro                       |
| FSH           | follicle-stimulating hormone               |
| GDF-9         | growth and differentiation factor 9        |
| GH            | growth hormone                             |
| GnRH          | gonadotropin releasing hormone             |
| IA            | Insémination artificielle                  |
| IGFBPs I      | insulin-like growth factor binding protein |
| IGFs          | insulin-like growth factors                |
| IR            | insulin receptor                           |
| ITS           | Insuline, sélénite transferrine de sodium  |
| LH            | hormone luteinizante                       |
| P4            | progestérone                               |
| P450scc       | cholesterol side-chain cleavage enzyme     |
| PDGF          | Platelet-Derived Growth Factor             |
| PGF2 $\alpha$ | Prostaglandine F2 $\alpha$                 |
| RT-qPCR       | PCR quantitative en temps réel             |
| TGF           | transforming growth factor                 |
| TGFs          | Transforming Growth Factors                |

**Nom des gènes:**

|               |   |
|---------------|---|
| <i>AQP3</i>   | aquaporin 3   |
| <i>ATP5A1</i> | ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit1 |
| <i>BAX</i>    | Bcl-2-associated X protein  |
| <i>Dnmt3a</i> | DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A   |
| <i>GLUT1</i>  | glucose transporter – 1 (aussi appelle SCL2A1)                                      |
| <i>HSP9B</i>  | heat shock 70-kDa protein 9, (aussi appellee mortalin)                              |
| <i>IGF1</i>   | insulin-like growth factor1   |
| <i>IGF1R</i>  | insulin-like growth factor1 receptors   |
| <i>IGFBP2</i> | insulin-like growth factor binding protein2   |
| <i>IGFBP4</i> | insulin-like growth factor binding protein4   |
| <i>PLIN 2</i> | Perilipin-2, (aussi appelle adipophilin)  |
| <i>SCD</i>    | Stearoyl CoA Desaturase   |
| <i>TP53</i>   | Tumor protein 53  |

## **Chapitre 1. Introduction générale**

La production d'embryons après superovulation et collecte 7 jours après l'insémination artificielle de la donneuse chez les bovins a été utilisée commercialement depuis les années 1970 (Mapletoft et Hasler, 2005) dans des programmes de superovulation et transferts d'embryons (MOET). Ceci a permis de concevoir et de faire naître plus de descendants à partir des femelles de haute valeur génétique chez les bovins de races laitières et allaitantes. L'objectif est d'obtenir des embryons viables à partir de donneuses de haute valeur génétique accouplées avec des taureaux de haute valeur génétique qui, après transfert sur receveuses, se traduit par la naissance de veaux en bonne santé. Le succès de ces programmes dépend principalement de la réponse des donneuses au traitement de superovulation, de la qualité ovocytaire et embryonnaire puis de l'aptitude des receveuses à maintenir une gestation. De plus, depuis les années 1990, l'introduction de la technique d'Ovum Pick-Up (OPU : aspiration échoguidée des ovocytes sur animaux vivants) et la production in vitro d'embryons (PIV) ont offert plusieurs avantages (production d'un plus grand nombre d'embryons et de descendance, récupération de vaches de haute valeur génétique avec des problèmes de fertilité, etc...) pour optimiser le potentiel reproductif des donneuses par rapport à la technique MOET. Cependant, du fait des arrêts de développement embryonnaire observés au cours des premiers jours de culture in vitro, l'obtention d'un nombre élevé d'ovocytes de qualité reste un levier majeur pour augmenter la production et la qualité des embryons produits in vitro.

Bien que les programmes de superovulation chez les bovins soient actuellement des procédures relativement bien établies (Bó et al., 2010), de nombreux facteurs physiologiques influencent le nombre de follicules recrutés dans une vague folliculaire, la compétence des ovocytes dans les follicules, et la capacité des ovules fécondés à engendrer des embryons avec un potentiel de développement élevé. La modulation de l'alimentation de la femelle donneuse peut modifier le métabolisme et le milieu endocrinien auxquels les ovocytes et les embryons sont soumis. Ces événements survenant tôt dans le développement (d'un follicule primaire jusqu'à la fécondation) peuvent impacter la fertilité future (Santos et al., 2008). Effectivement, plusieurs études ont suggéré que la compétence au développement des ovocytes est acquise au cours du long processus de folliculogénèse (Blondin et al., 1997 ; Mermillod et al., 1999 ; Sutton et al., 2003; Mermillod et al., 2008) et que les dernières étapes

de la maturation ovocytaire in vitro ne peuvent pas améliorer à elles seules la qualité des ovocytes.

Différentes recherches ont été réalisées pour déterminer la meilleure stratégie alimentaire des donneuses, dans l'objectif d'optimiser la qualité des ovocytes collectés par OPU et celle des embryons produits. Il a été démontré qu'une suralimentation peut être néfaste sur la qualité des ovocytes et le développement des embryons produits in vivo (Mantovani et al., 1993 ; Mollo et al., 2007) et in vitro (Papadopoulos et al., 2001 ; Fouladi-Nashta et al., 2005 ; Martins et al., 2006). En outre, il a été montré qu'une alimentation restreinte peut avoir dans certaines conditions un effet positif sur la qualité des ovocytes (Lozano et al., 2003) et la production de blastocystes in vitro (Armstrong et al., 2001 ; Freret et al., 2006). Ces résultats ont été reliés à des niveaux de métabolites et d'hormones impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique : en particulier, une augmentation des taux d'insuline et d'IGF1 ont été associées avec un fort niveau de consommation d'énergie chez la génisse laitière (Freret et al., 2006). Or, ces hormones jouent un rôle important dans le contrôle de la fonction ovarienne chez les bovins (Gong et al., 1993 ; Spicer et Echtenkamp, 1995 ; Lucy et al., 1999 ; Webb et al., 2007). De plus, chez la génisse, il a été démontré que des régimes alimentaires qui augmentent les niveaux d'insuline (hyperinsulinémie) influencent d'une manière négative la qualité des ovocytes (Adamiak, 2005 ; Freret et al., 2006). Cependant, une augmentation de ces taux a un effet positif sur la croissance des petits follicules avant le traitement de stimulation de la croissance folliculaire par l'hormone FSH (Freret et al., 2006) et ce, rapidement après l'augmentation de l'insulinémie (Gong et al., 2002). D'autres travaux ont démontré qu'une réduction du niveau d'apport énergétique dans la ration (associée à une diminution des taux d'insuline) améliore la production in vitro d'embryons (Nolan et al., 1998 ; Armstrong et al., 2001). Ces résultats étayent l'idée selon laquelle il est peut être possible de moduler les concentrations d'insuline de façon transitoire pour améliorer le succès de la reproduction : augmenter l'insuline pendant la phase de croissance du follicule (Kakar et al., 2005 ; Scaramuzzi et al., 2006), puis revenir à des niveaux normaux juste avant l'ovulation afin de ne pas avoir un effet négatif sur la qualité de l'embryon. En effet, des travaux réalisés chez les vaches laitières non super-ovulées ont démontré une amélioration des taux de gestation par un régime capable d'augmenter les concentrations d'insuline jusqu'à ce que les vaches aient repris une activité cyclique œstrale post-partum suivi d'un régime alimentaire visant à réduire les niveaux d'insuline au cours de la période d'accouplement (Garnsworthy et al., 2009).

L'augmentation d'apports alimentaires n'est pas le seul moyen d'augmenter les niveaux d'insuline. D'autres applications pratiques pour la modulation de l'insulinémie ont été étudiées comme par exemple l'injection de BST (Bovine Somatotropine ; Gong et al., 2002) ou encore l'administration d'une supplémentation d'un composant qui intervient dans le métabolisme de l'insuline comme le propylène glycol (PG). Le PG est utilisé dans le traitement de la cétose depuis les années 1950 (Johnson, 1954 ; Maplesden, 1954). Le PG est un précurseur du glucose. Il joue un rôle important dans le mécanisme de transformation des réserves corporelles en énergie en permettant aux acides gras non estérifiés libérés lors de la mobilisation des réserves d'être catabolisés dans le cycle de Krebs. Le PG augmente les concentrations de glucose et diminue les concentrations d'AGNE, de BHB et de triglycérides dans le foie (Sauer et al., 1973 ; Grummer et al., 1994 ; Chung et al., 2009). De plus, différents travaux ont démontré que l'addition de PG dans l'alimentation augmente la concentration en insuline et en IGF1 dans le plasma chez la vache (Studer et al., 1993 ; Christensen et al., 1997 ; Miyoshi et al., 2001 ; Butler et al., 2006 ; Rizos et al., 2008) et chez la génisse (Grummer et al., 1994 ; Hidalgo et al., 2004). Expérimentalement, l'utilisation de PG autour du vêlage diminue la mobilisation des réserves corporelles en intensité et en durée juste après vêlage, et diminue le pourcentage de vaches non cyclées 2 à 3 mois plus tard (Formigoni et al., 1996). Aussi, des études ont trouvé une diminution de la période vêlage-première ovulation après administration de PG (Miyoshi et al., 2001). Cependant, les avantages potentiels du PG sur la croissance folliculaire, compétence au développement des ovocytes et la production d'embryons in vitro chez les génisses n'ont pas été étudiés.

L'hormone Anti-Müllérienne (AMH) est un homodimère glycoprotéique de 140 kD appartenant à la superfamille du transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) et est spécifiquement exprimée par les cellules de la granulosa des petits follicules en croissance (Monniaux et al., 2008 ; Rico et al., 2009). L'AMH est un marqueur endocrinien de la réserve folliculaire. Ces follicules sont sensibles aux gonadotrophines chez la vache. Les concentrations plasmatiques d'AMH mesurées avant le traitement de superovulation peuvent aider à prédire la réponse des individus (Ireland et al., 2008 ; Rico et al., 2009 ; Monniaux et al., 2010).

Suite à ces études il semble important d'étudier et optimiser la réponse à différentes stratégies alimentaires en fonction des profils d'AMH des génisses. Dans le cadre de ce travail, nous avons tenté de mieux comprendre les effets de PG et des variations métaboliques

sur la production d'embryons in vitro chez des donneuses superovulées de race Prim'Holstein présentant des profils/niveaux d'AMH contrastés.

Notre étude avait un objectif finalisé qui était d'améliorer l'efficacité de la technique d'OPU-FIV par l'obtention d'ovocytes de haute qualité qui assurent la production des embryons et le maintien de la gestation après transfert. Les retombées de ce travail sont donc directement valorisables pour les entreprises de sélection : amélioration potentielle de l'efficacité des schémas de sélection, recommandations pratiques pour la gestion des donneuses en station.

La revue bibliographique synthétise les connaissances sur la physiologie de la folliculogénèse et les étapes précoces du développement embryonnaire chez les bovins, puis décrit les principaux indicateurs du métabolisme énergétique et leurs effets dans la fonction de reproduction. Enfin, les modifications physiologiques de l'insuline et l'IGF1 et les évolutions induites par les apports alimentaires, l'administration de PG sont abordées, en rapportant les impacts sur la fonction de reproduction chez les bovins.

## Chapitre 2. Revue de la bibliographie

### **1. Stimulation de la croissance folliculaire et biotechnologies de la reproduction : bases physiologiques et applications chez la vache.**

#### **1.1 Bases physiologiques de la folliculogénèse, de l'ovogénèse et du développement embryonnaire précoce chez la vache.**

L'utilisation des traitements de stimulation de la croissance folliculaire et le développement des biotechnologies de l'embryon chez les bovins sont basés sur la physiologie du cycle œstral, la fonction ovarienne et la stimulation de poly-ovulations aboutissant à la fécondation et au développement d'embryons collectés 7 jours après insémination *in vivo* ou cultivés *in vitro*. Ces mêmes bases sont indispensables pour mieux maîtriser les effets de l'alimentation sur la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire et la production d'embryons.

##### **1.1.1 Cycle œstral de la vache.**

La vache est une espèce polyœstrienne de type continu, caractérisée par des cycles successifs d'une durée moyenne de 21 jours (de 18 à 24 jours), comprenant une phase folliculaire de 4-6 jours suivie d'une phase lutéale (14 à 18 jours). La phase lutéale débute après l'ovulation quand le corps jaune est formé tandis que la phase folliculaire correspond à la période comprise entre la lutéolyse et l'ovulation (Forde et al., 2011). L'activité sexuelle débute à la puberté (6 à 12 mois selon les races), quand l'animal a atteint 40 - 50 % de son poids adulte, période à laquelle cette activité cyclique apparaît. La quasi-totalité des génisses laitières sont cyclées à 15 mois (Mialot et al., 2001 ; Forde et al., 2011).

L'œstrus ou chaleur correspond au comportement observé au cours de la période d'acceptation du mâle et de la saillie. Au niveau ovarien, c'est la période de maturation folliculaire et ovocytaire pré-ovulatoire, suivie de l'ovulation qui à la différence avec d'autres espèces a lieu 10 -14 h après la fin de l'œstrus (Forde et al., 2011). La connaissance du moment de l'ovulation est très importante chez la vache pour déterminer le moment optimum de l'accouplement ou de l'insémination artificielle, l'œstrus étant la seule manifestation extérieure du cycle sexuel, il est commode de situer l'ovulation par rapport à l'œstrus (Gayrard, 2007). Cet œstrus se caractérise par des manifestations comportementales

extérieures: excitation, inquiétude, beuglements, recherche de chevauchement de ses compagnes, acceptation passive du chevauchement et écoulement de mucus. La durée des chaleurs en race Holstein (de la première à la dernière acceptation du chevauchement) était évaluée à 18-20 heures dans les années 80. Les études de ces dix dernières années rapportent une durée de 4 à 8 heures dans les mêmes conditions (Disenhaus, 2010) et d'environ 14 h si l'on intègre les autres signes sexuels secondaires à la définition de l'œstrus (Kerbrat et Disenhaus, 2004 ; Roelofs et al., 2005). Après l'ovulation, la formation du corps jaune induit l'installation d'un état prégravidique de l'utérus (Derivaux et al., 1986 ; Thibault et Levasseur, 2001).

La détection d'œstrus est donc très importante chez cette espèce. En effet, la fertilité diminue rapidement après la fin de l'œstrus, la fertilité maximale est obtenue lorsque l'insémination est pratiquée 13-18h avant l'ovulation. L'ovocyte doit être fécondé au cours des 8 à 12 h qui suivent (Gayrard, 2007).

Les profils hormonaux au cours du cycle œstral permettent de distinguer la phase folliculaire et la phase lutéale. La régulation du cycle œstral fait notamment intervenir les hormones hypothalamo-hypophysaires au niveau central (GnRH, FSH et LH), les hormones stéroïdiennes au niveau ovarien (progestérone et œstradiol) et les prostaglandines au niveau utérin. L'activité cyclique résulte d'un système de rétrocontrôles positifs et négatifs (Figure 1).

L'hypothalamus sécrète de façon pulsatile un décapeptide, la gonadolibérine ou GnRH qui stimule la synthèse et la sécrétion de deux hormones au niveau de l'hypophyse antérieure, la FSH (Follicule Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone). La sécrétion de GnRH est principalement régulée par les hormones stéroïdiennes (Pawson et McNeilly, 2005). La sécrétion de FSH se produit par pics (mais de façon moins marquée que la LH), régulés par la sécrétion folliculaire d'œstradiol et d'inhibine. La sécrétion de LH est pulsatile et régulée par la GnRH (chaque décharge de GnRH provoque une décharge de LH) et la progestérone (régulation de la fréquence des décharges de LH). Le rôle de la FSH est de stimuler la croissance folliculaire, celui de la LH est de stimuler la maturation finale du follicule dominant (FD), l'induction de l'ovulation et la stimulation de la sécrétion de progestérone par le corps jaune (CJ). L'évolution type des hormones LH, FSH, œstrogènes et progestérone au cours du cycle œstral est présentée en Figure 2.

L'inhibine est une protéine dimérique composée d'une sous-unité  $\alpha$  et une ou deux sous-unités  $\beta$  (A ou B = inhibine A ou l'inhibine B). Selon les études qui ont caractérisé les molécules d'inhibine dans le liquide folliculaire bovin, les cellules de la granulosa bovines des follicules antraux produisent principalement l'inhibine A plutôt que l'inhibine B, (Hasegawa et al., 1994 ; Knight et al., 1996). Le rôle le mieux établi de l'inhibine chez les animaux femelles est endocrine ; une suppression de la sécrétion de FSH. Chez les vaches avec des cycles œstraux normaux, des études d'immunisation ont montré les fonctions de l'inhibine comme régulateur négatif de la secretion de FSH (Akagi et al., 1997 ; Takedomi et al., 1997).

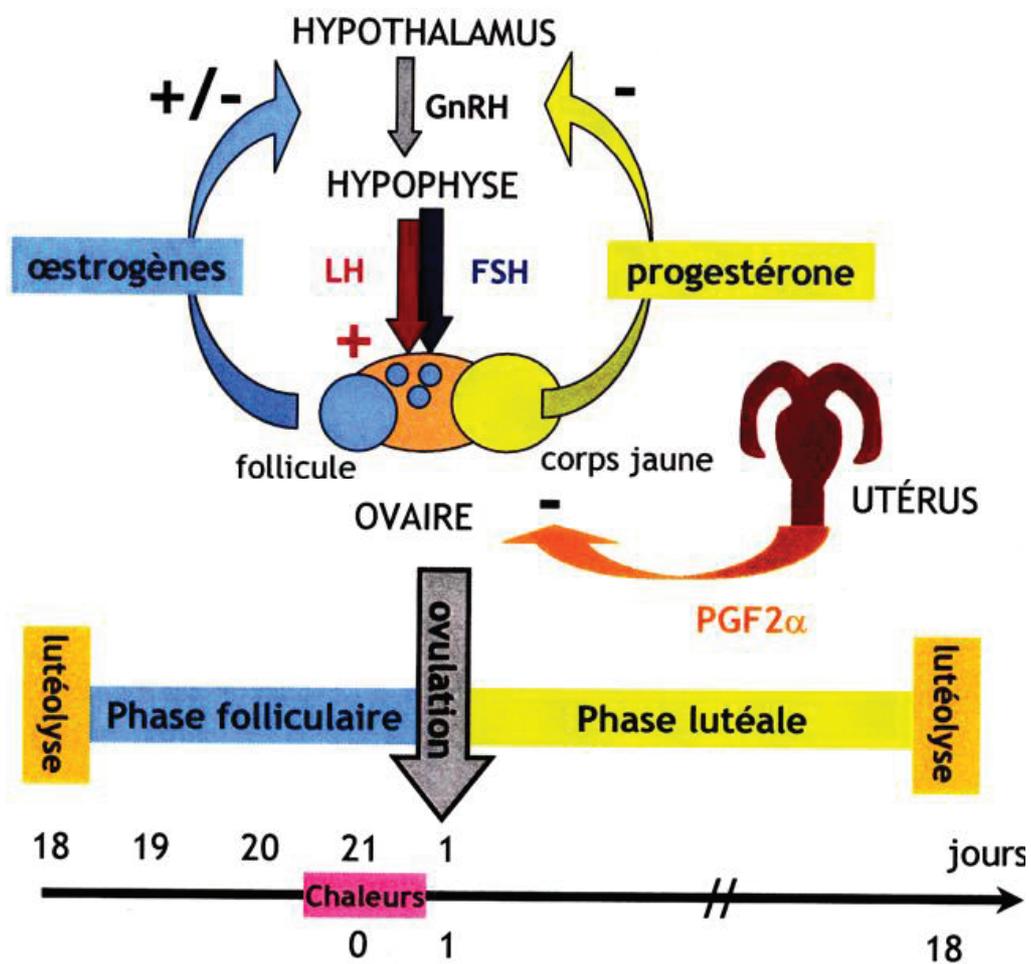
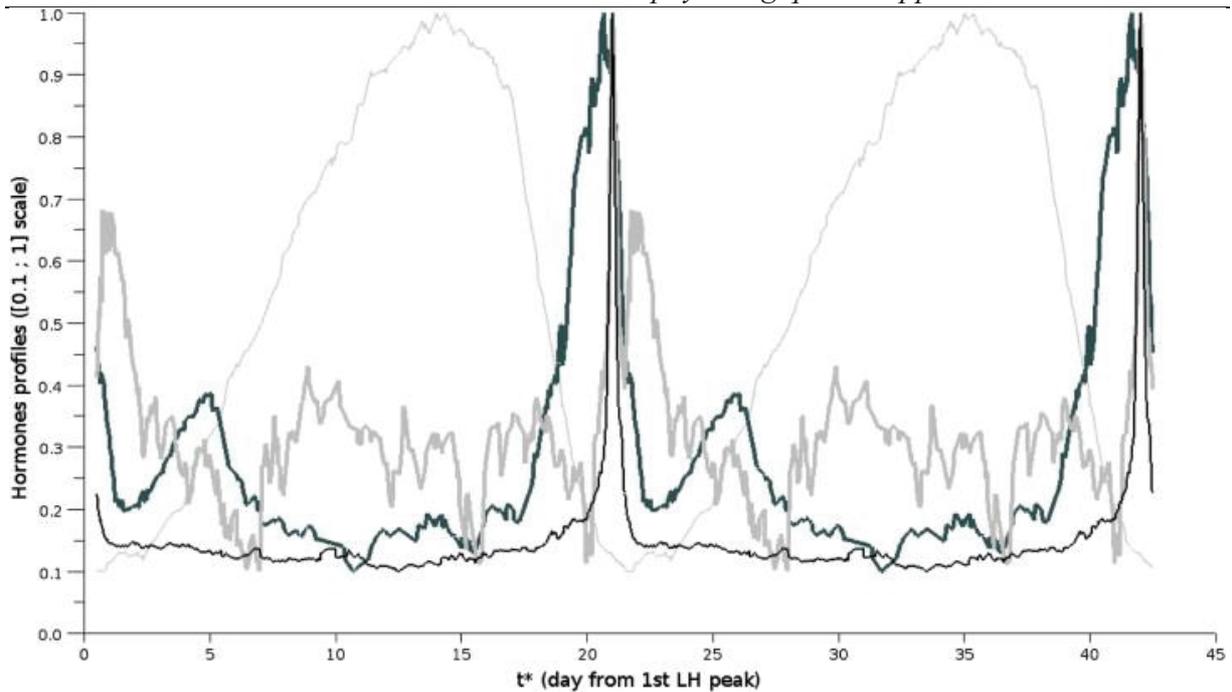


Figure 1. Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel. (Reproguide UNCEIA, 2013).



**Figure 2. Profils de références des hormones circulantes au cours du cycle œstral échelonnés sur deux périodes successives de 21 jours.** Hormone lutéinisante (LH) : courbe noire fine, Hormone folliculostimulante (FSH): courbe grise-clair gras, progestérone (P4): courbe gris-clair fine et Œstradiol (E2): courbe gris-foncé gras. Echelle normalisée (Martin et al., 2013).

### 1.1.2 Ovogenèse et folliculogenèse.

#### 1.1.2.1 Croissance folliculaire et ovocytaire.

L'ovogenèse implique des changements fonctionnels et morphologiques coordonnés dans le follicule qui conduisent à la différenciation cellulaire et au développement des ovocytes ultérieurs. Au cours de leur migration du sac vitellin aux gonades, les cellules germinales primordiales continuent à se multiplier par mitose. A partir de 2 millions d'ovogonies, on obtient 235 000 follicules primordiaux à la naissance chez la vache qui constituent la réserve ovarienne. Cette dernière décline progressivement au cours de la vie de l'animal (Hanzen et al., 2000). Au cours de la succession des cycles, seuls quelques ovocytes iront jusqu'à la maturation et la ponte ovulaire, tandis que la majorité dégènera dans les follicules atrétiques.

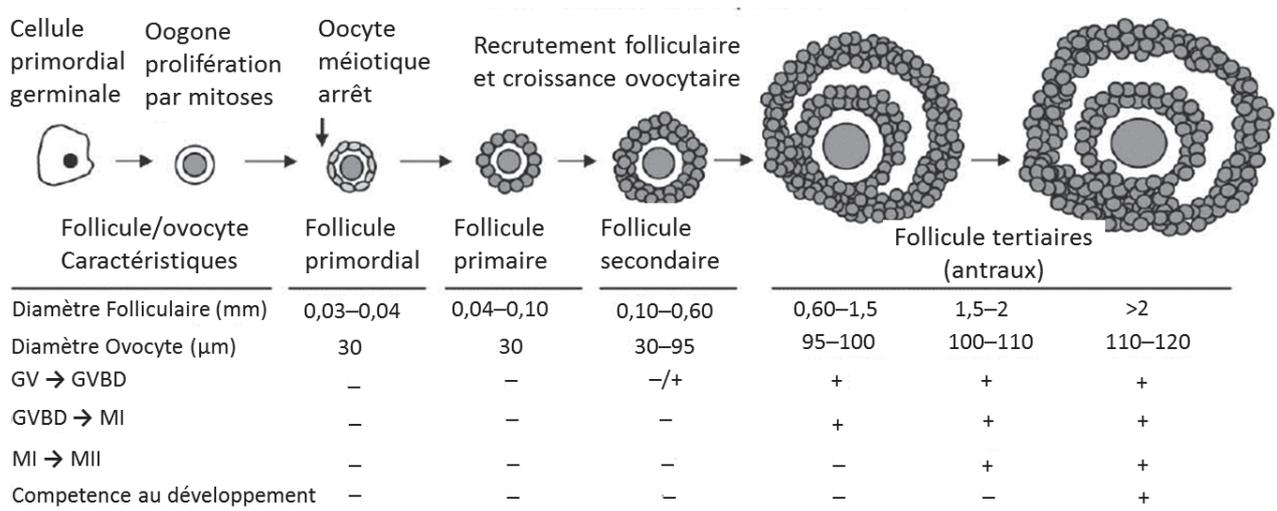
Au cours du processus de folliculogenèse, les follicules primordiaux se développent à travers différentes stades : follicules primaires, secondaires et tertiaires (Campbell et al.,

1999 ; Sirard 2001). Pendant ce processus, le diamètre des ovocytes augmente de 30 à 120  $\mu\text{m}$ . Les ovocytes bovins n'atteignent pas la compétence méiotique jusqu'au stade de follicule à antrum, lorsque le diamètre de l'ovocyte est supérieure à 100  $\mu\text{m}$  (Fair et al., 1995). L'ovocyte acquiert alors la capacité à poursuivre son développement jusqu'à la rupture de la vésicule germinale (germinal vesicle breakdown ou GVBD). Il devient capable de progresser jusqu'au stade métaphase I (MI), puis continue jusqu'au stade métaphase II (MII) (Fair, et al., 1995). Les ovocytes atteignent l'entière compétence méiotique quand ils atteignent un diamètre de 110  $\mu\text{m}$  et peuvent atteindre ainsi le stade MII (Fair, et al. 1995). Lorsque la taille des follicules augmente à 2 mm et les ovocytes à 110-120  $\mu\text{m}$  de diamètre, la compétence au développement est acquise et l'ovocyte devient capable d'accepter la fécondation et le développement embryonnaire (Hyttel et al., 1997 ; Figure 3).

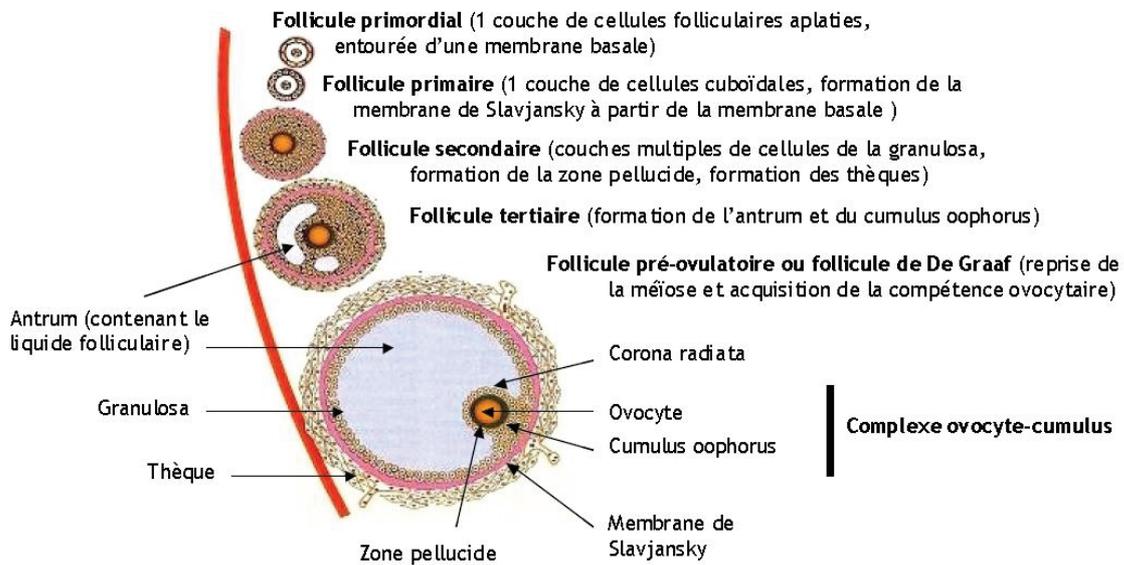
Au cours de la période d'arrêt de la méiose (prophase I), pendant le développement folliculaire, la croissance de l'ovocyte continue avec induction de nombreuses modifications ultrastructurales et une activité transcriptionnelle et traductionnelle forte, permettant le stockage de transcrits et de protéines (Rodriguez et Farin, 2004). Le bon déroulement du programme moléculaire permet à l'ovocyte de stocker les ARNm nécessaires au développement ultérieur du zygote et de l'embryon œuf. Les communications intercellulaires avec la granulosa (qui apportent un support physique, des nutriments et interviennent dans les régulations hormonales) sont indispensables pour obtenir un ovocyte de qualité et donc un développement embryonnaire ultérieur normal (Gosden, 2002). La transcription diminue pendant la maturation ovocytaire pour atteindre un niveau faible au moment des 1ères étapes du développement embryonnaire (expression génique sous contrôle des facteurs maternels). Les transcrits stockés sont soumis à une régulation temporelle précise et seront traduits si nécessaire dans l'ovocyte et le jeune embryon (Pennetier, 2005).

La folliculogénèse est le processus au cours duquel les follicules passent par plusieurs stades définis jusqu'aux follicules ovulatoires (Figure 3, 4, 5 et 6). La plus commune classification peut être décrite dans quatre catégories: 1) follicules primordiaux, 2) primaires, 3) secondaires et 4) tertiaires (Fortune 2003, Hyttel, et al., 1997). Dans les follicules primordiaux (30-40  $\mu\text{m}$ ), l'ovocyte a une seule couche des cellules folliculaires aplaties, entourée d'une membrane basale. Les follicules primaires (40-100  $\mu\text{m}$ ) ont initié la croissance et la couche unique de cellules granuleuses est devenue cubique. Les follicules secondaires (100-600  $\mu\text{m}$ ) sont caractérisés par deux ou plusieurs couches de cellules de la granulosa, par

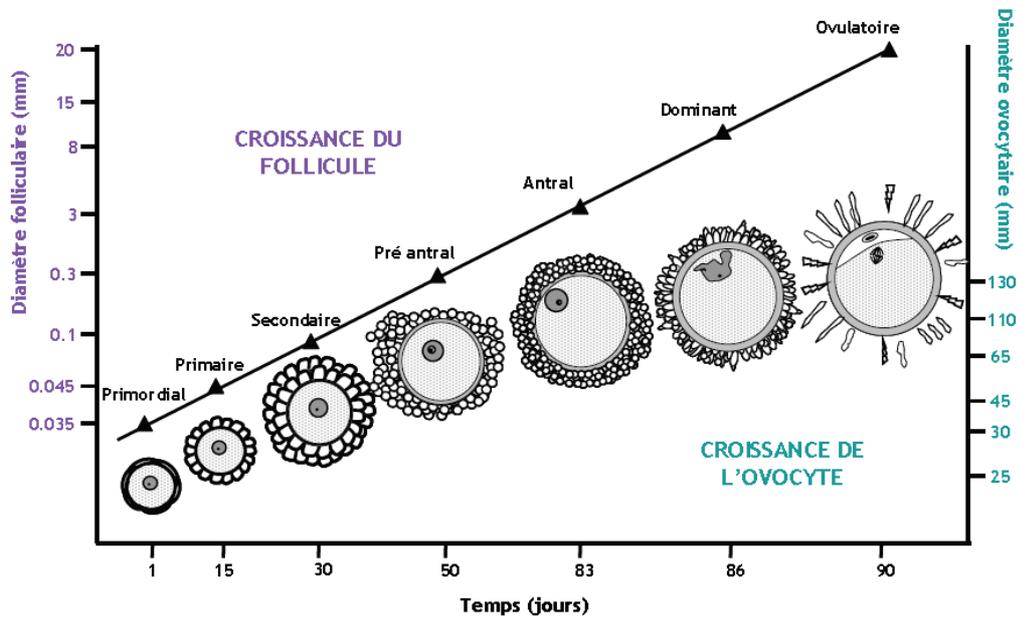
la formation de la zone pellucide et des thèques (Fair 2003). Les follicules tertiaires (600  $\mu\text{m}$  - > 2 mm) peuvent être subdivisés en petits et grands follicules antraux. Les follicules antraux matures sont aussi appelés «follicules de Graaf» (Aerts et Bols 2010). La transition vers le follicule tertiaire se caractérise par la prolifération continue et la différenciation des cellules de thèques interne et externe, la lame basale et les cellules du cumulus ainsi que la formation d'un fluide rempli dans la cavité antrale. Au cours de cette croissance, les follicules acquièrent également des récepteurs les rendant potentiellement capables de répondre à une stimulation gonadotrope : récepteurs à LH (Luteinizing Hormone) pour les cellules de la thèque interne et récepteurs à FSH (Follicle Stimulating Hormone) pour les cellules de la granulosa (Fair, 2013). Le développement du follicule primordial à follicule pré-ovulatoire est estimé à 90 jours chez la vache (Lussier, et al., 1987 ; Fair 2003). Le développement de follicules antraux nécessite en moyenne 42 jours chez la vache, ou l'équivalent de deux cycles oestriques; cependant la majorité du temps total de développement folliculaire est passé dans les stades pré-antraux. L'activation continue de follicules primordiaux est en contraste par rapport au recrutement cyclique de follicules antraux pendant les cycles d'oestrus (environ 21 jours).



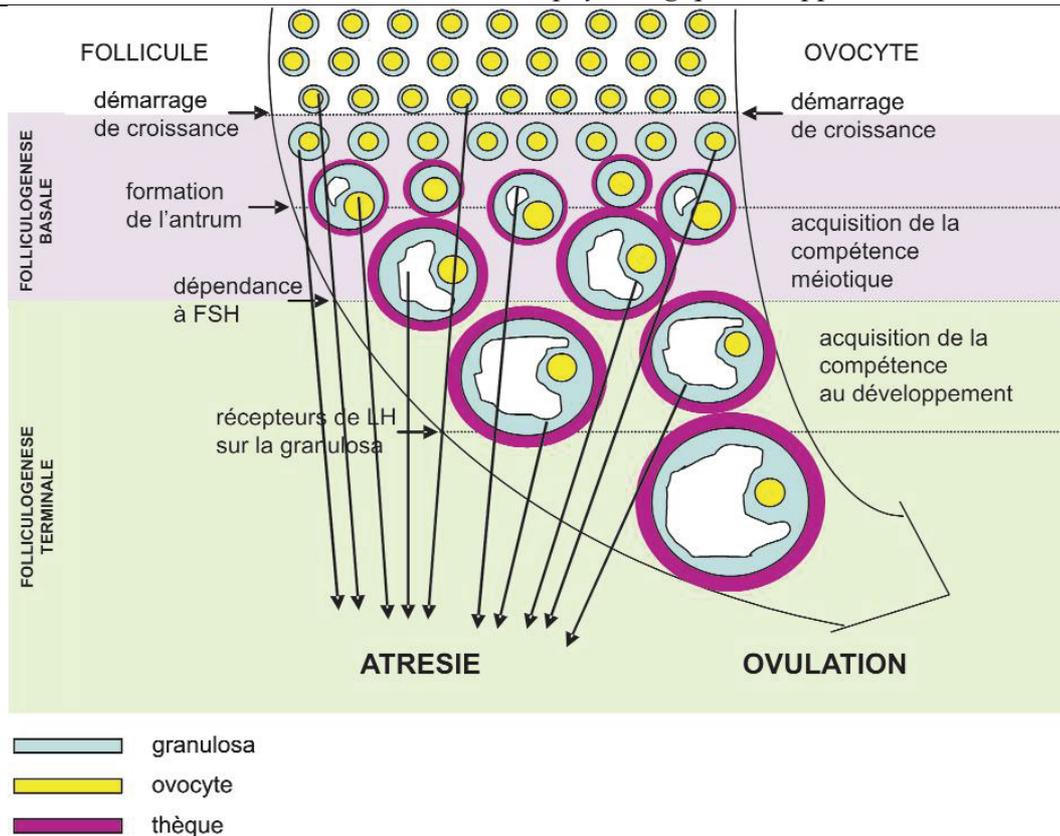
**Figure 3. Résumé de l'ovogenèse et folliculogénèse chez les bovins.** Augmentation de l'acquisition de la compétence meiotique au développement à mesure que le diamètre des ovocytes et des follicules augmente. Présence (+) ou l'absence (-) de vésicule germinale (GV), rupture de la vésicule germinale (GVBD), métaphase I (MI) et métaphase II (MII), respectivement. Modifié depuis Matoba (2012).



**Figure 4. Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien** (D'après Drion et al., 1996 ; modifié par Fréret, 2007).



**Figure 5. Relation entre la croissance folliculaire et ovocytaire chez la vache** (Fair, 2003).



**Figure 6. Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire** (Monniaux et al., 2009).

D'un point de vue fonctionnel, le développement folliculaire peut se subdiviser en deux phases successives (Figure 6): la folliculogenèse basale - non gonado-dépendante est suivie d'une phase de croissance cyclique, dite folliculogenèse terminale - dépendante de la variation des concentrations en gonadotrophines (Webb et al., 2003 ; Monniaux et al., 2009).

#### 1.1.2.1.1 Folliculogenèse basale - Phase non gonado-dépendante.

La croissance folliculaire débute par l'activation d'un groupe de follicules primordiaux (Figure 5 et Figure 6). Les follicules de petite taille (inférieure à 3-4 mm de diamètre) sont capables de se développer en absence d'hormones gonadotropes (Picard-Hagen et al., 2008).

La folliculogenèse basale est contrôlée par de nombreux facteurs de croissance, d'origine ovocytaire et somatique, agissant essentiellement selon un mode paracrine de régulation. C'est au cours de cette phase que s'effectue l'essentiel de la croissance de l'ovocyte, à partir d'un diamètre initial de 20 à 30 microns, et que l'ovocyte acquiert la

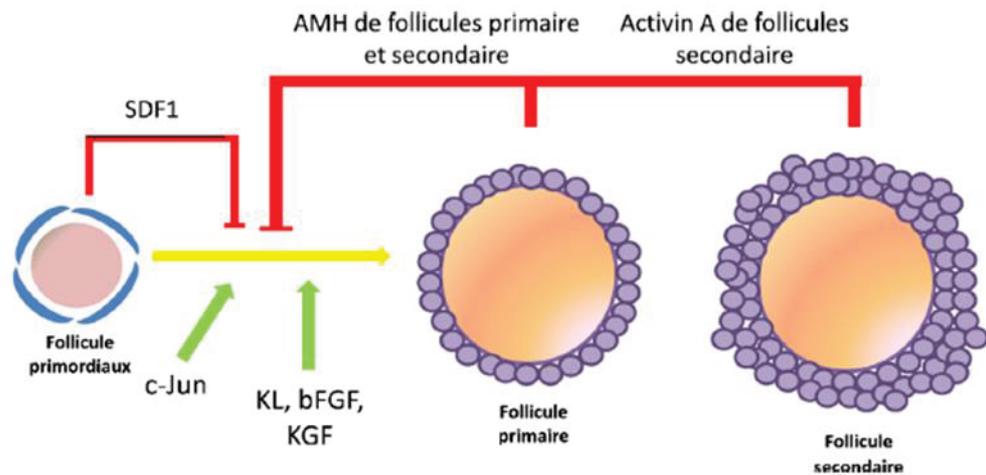
compétence méiotique, c'est-à-dire la capacité à reprendre la méiose (bloquée au stade diplotène/diacinèse) quand il est extrait de son follicule (Monniaux et al., 2009).

La croissance folliculaire pendant cette période se traduit par l'augmentation de la taille de l'ovocyte, par la prolifération des cellules de la thèque et de la granulosa. Le follicule secondaire préantral devient capable de répondre à la stimulation gonadotrope et de synthétiser des oestrogènes, grâce à l'acquisition de récepteurs à FSH par les cellules de la granulosa. Son ovocyte commence à synthétiser des ARN messagers qui lui permettront d'acquies sa compétence au développement (Fair, 2010).

Avec l'arrivée de la technologie des systèmes knock-out (KO), il a été possible d'identifier plusieurs facteurs stimulant ou inhibant le recrutement des follicules primordiaux. La perte de fonction par la technologie « KO » du tumour suppressor tuberous complex (Tsc-1), phosphatase and tensin homologue retiré du chromosome 10 (PTEN), Foxo3a et Foxl2, entraîne une activation prématurée du stock de follicules primordiaux. Une telle activation globale des follicules primordiaux entraîne inévitablement un épuisement de ce stock et des défaillances ovariennes. Cependant, seulement deux molécules de signalisation extracellulaire ont été identifiées comme inhibitrices de l'activation folliculaire. Il s'agit de l'hormone anti-Müllerienne (AMH) et le stromal-derived-factor-1 (SDF1). L'activine A joue un rôle similaire et récemment, l'implication de la voie de signalisation impliquant c-Jun a été observée (Bertoldo et al., 2013).

La Figure 7 montre l'interaction possible de différents acteurs dans la transition de follicules primordiaux à primaires. Stromal derived factor-1 (SDF1) sécrété par les follicules primordiaux, et l'anti-Müllerian hormone (AMH) sécrétée par les cellules de la granulosa des follicules en croissance semblent inhiber le recrutement des follicules primordiaux tandis que le kit ligand (KITL), le basic fibroblast growth factor (bFGF) et le keratinocyte growth factor (KGF) semblent activer la transition. KITL est connu pour son action mitogène sur les cellules de la granulosa et a été décrit pour soutenir l'activation des follicules primordiaux (Parrott et Skinner, 1999). Des données récentes suggèrent que la phosphorylation de c-Jun (protéine favorisant la prolifération cellulaire, avec un rôle anti-apoptotique) est également nécessaire dans la transition du follicule primordial à primaire (Bertoldo et al., 2013). L'AMH est capable d'inhiber KITL (kit ligand), bFGF (basic fibroblast growth factor) et KGF

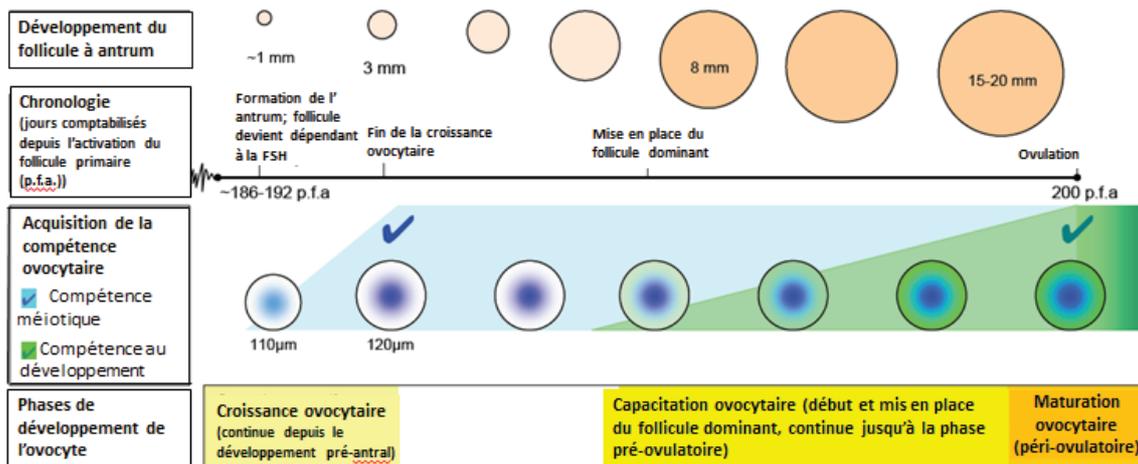
(keratinocyte growth factor), indiquant que l'AMH peut agir sur les différents types cellulaires du follicule (Nilsson et al., 2007).



**Figure 7. Interactions possibles de différents acteurs dans la transition de follicules primordiaux à primaires.** (vert, stimulation ; le rouge, inhibition) (Bertoldo et al., 2013).

#### 1.1.2.1.2 Folliculogenèse terminale - Phase gonado-dépendante.

La folliculogenèse terminale correspond à la maturation de l'ovocyte et la différenciation des cellules de la granulosa. Cette phase est strictement dépendante de la présence de FSH et, pour les stades terminaux de maturation du follicule préovulatoire, de la présence de LH. La taille folliculaire à laquelle apparaît la dépendance aux gonadotropines est de 3 mm chez la vache (Driancourt et al., 2001). L'apparition de récepteurs de la LH sur les cellules de granulosa est la «signature» d'une maturité complète du follicule, qui devient apte à ovuler. Bien que la folliculogenèse terminale soit contrôlée essentiellement par FSH et LH, de nombreux autres facteurs (facteurs de croissance, matrice extracellulaire, protéases, stéroïdes), d'origine locale ou endocrine, agissent en synergie avec les gonadotropines pour réguler son déroulement (McGee et Hsueh, 2000). Chez les bovins, l'ovocyte et le follicule ont une croissance parallèle jusqu'à ce que le follicule atteigne un diamètre de 3 mm : le diamètre folliculaire continue alors à augmenter alors que celui de l'ovocyte atteint un plateau (Figure 3 et Figure 8).



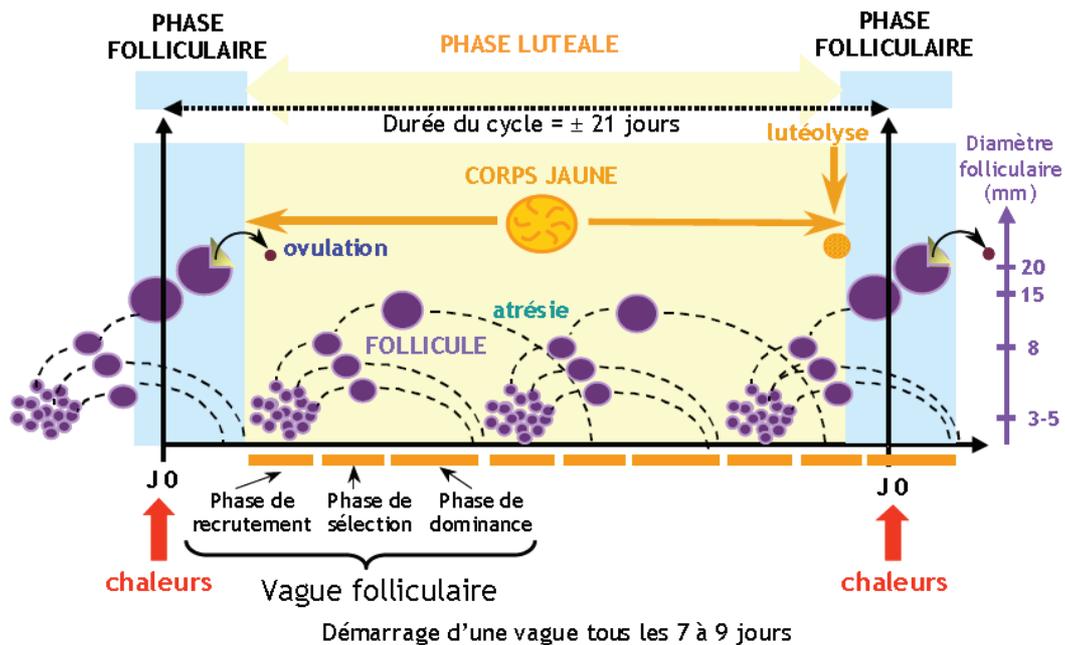
**Figure 8.** L'acquisition de la compétence ovocytaire et les phases de développement des ovocytes par rapport à la folliculogénèse terminale chez le bovin. Case cochée sur ovocytes indiquent pleine acquisition de compétences. Modifié depuis Hennet et al. (2012).

En début de la folliculogénèse terminale, l'ovocyte termine sa croissance pour atteindre un diamètre de 15 à 20 mm chez la vache. Puis il subit des remaniements chromatinien associés à l'acquisition de la compétence au développement, c'est-à-dire la capacité à assurer un développement embryonnaire normal après fécondation (Monniaux et al., 2009 ; Hennet et al., 2012 ; Figure 8).

### 1.1.2.2 Vagues folliculaires.

Le développement folliculaire terminal se déroule sous forme de vagues folliculaires. Une vague folliculaire correspond à la croissance synchrone d'une cohorte de follicules, suivie de la sélection d'un follicule appelé dominant, et de son évolution vers l'ovulation ou de sa régression quand les conditions endocriniennes sont défavorables (phase lutéale du cycle ou gestation) (Monniaux et al., 2009). La majorité des vaches présente de 2 à 3 vagues folliculaires durant un cycle (Jaiswal et al., 2009). La vague de développement folliculaire terminal qui aboutit à l'ovulation est la dernière et démarre au moment de la lutéolyse, l'ovulation ayant lieu en fin de phase folliculaire du cycle sexuel. La durée d'une vague est comprise entre 7 et 10 jours selon le nombre de vagues dans un cycle (Picard-Hagen et al., 2008).

L'émergence des vagues est observée à J1 et J9-10 du cycle pour les cycles à 2 vagues, alors qu'elle se fait à J1, J8-9 et J16 pour les cycles à 3 vagues. Un follicule dominant (diamètre  $\geq 10$  mm) se développe au cours de chaque vague folliculaire. Le follicule dominant est anovulatoire dans la première vague du cycle. Le follicule dominant de la deuxième vague peut être ovulatoire ou anovulatoire, selon qu'il y ait 2 ou 3 vagues par cycle respectivement (Ginther et al., 2014). Les différences du nombre de vagues par cycle expliquent en partie la variation de la longueur du cycle, de 18 à 21 jours pour des cycles à 2 vagues, de 21 à 25 jours pour des cycles à 3 vagues (Picard-Hagen et al., 2008). Le phénomène de vagues folliculaires, depuis la croissance folliculaire d'un groupe de follicules sous influence des gonadotropines jusqu'à l'émergence d'un seul follicule ovulatoire, est communément décrit par les concepts de recrutement, sélection et dominance (Figure 9).



**Figure 9. Cycle oestral et vagues folliculaires (UP de Reproduction ENVA).**

#### 1.1.2.2.1 Recrutement.

Lors du recrutement, une dizaine de follicules émerge d'un groupe de follicules tertiaires, passent de 2 à 3 mm à 5 à 6 mm et deviennent dépendant à l'hormone folliculostimulante (FSH). Tous les follicules recrutés sont aptes à ovuler (Driancourt et al., 2001).

Le recrutement est provoqué par une montée transitoire du niveau de FSH de 1 à 2 jours (Ponsart, 2003). La FSH se fixe sur les récepteurs des cellules de la granulosa, stimule l'aromatase des androgènes produits par les cellules thécales en œstrogènes et induit la formation de récepteurs à LH. En synergie avec la FSH, les œstrogènes sécrétés provoquent la croissance des follicules et le développement de leur cavité antrale (Ennuyer, 2000).

La concentration de FSH doit atteindre un seuil minimum afin que le recrutement ait lieu (Driancourt 2001). La FSH va induire l'apparition de l'activité aromatasase au sein de la granulosa, permettant la synthèse d'oestradiol à partir des androgènes produits par la thèque. L'oestradiol exerce sa rétroaction positive sur la sécrétion de GnRH. L'augmentation de la fréquence des décharges de LH stimule la production d'oestradiol (rétroaction négative) et d'inhibine, d'où une diminution de la libération de FSH (la LH étant très peu affectée). IGF1 agit en synergie avec la FSH pour stimuler l'activité aromatasase (Driancourt 2001).

#### **1.1.2.2.2 Sélection.**

La croissance des follicules pendant la phase de recrutement s'accompagne d'une élévation de la production folliculaire d'oestradiol et d'inhibine. L'oestradiol exerce un rétrocontrôle positif, se traduisant par une augmentation de la fréquence des pulses de LH; alors qu'il exerce également concomitamment un rétrocontrôle négatif sur la production de FSH (Figure 10 ; Monniaux et al., 2009).

La sélection correspond à l'émergence du follicule ovulatoire parmi les follicules recrutés. Elle résulte de la diminution de la concentration de FSH due à la croissance du groupe de follicules recrutés, à un niveau inférieur à celui induisant le recrutement. Lorsqu'un follicule a acquis un nombre suffisant de récepteurs à LH pour lui permettre de survivre à de faibles taux de FSH, il sécrète de grandes quantités d'oestrogènes et continue à croître en raison de l'augmentation de sa propre sensibilité à la FSH et à la LH. Il croit également avec la production de facteurs de croissance locaux, en particulier l'IGF1. Deux à trois follicules parmi les 15 sont alors sélectionnés. Le follicule qui acquiert le plus précocement des récepteurs à la LH devient dominant (Gayrard, 2007).

Pour les follicules non sélectionnés, la sécrétion insuffisante de FSH ne permet plus leur croissance. Lorsque la concentration de FSH atteint un niveau inférieur à celle ayant

provoqué le recrutement, les follicules rentrent en atrophie, à l'exception du ou des follicules sélectionnés (Driancourt et al., 2001).

#### **1.1.2.2.3 Dominance.**

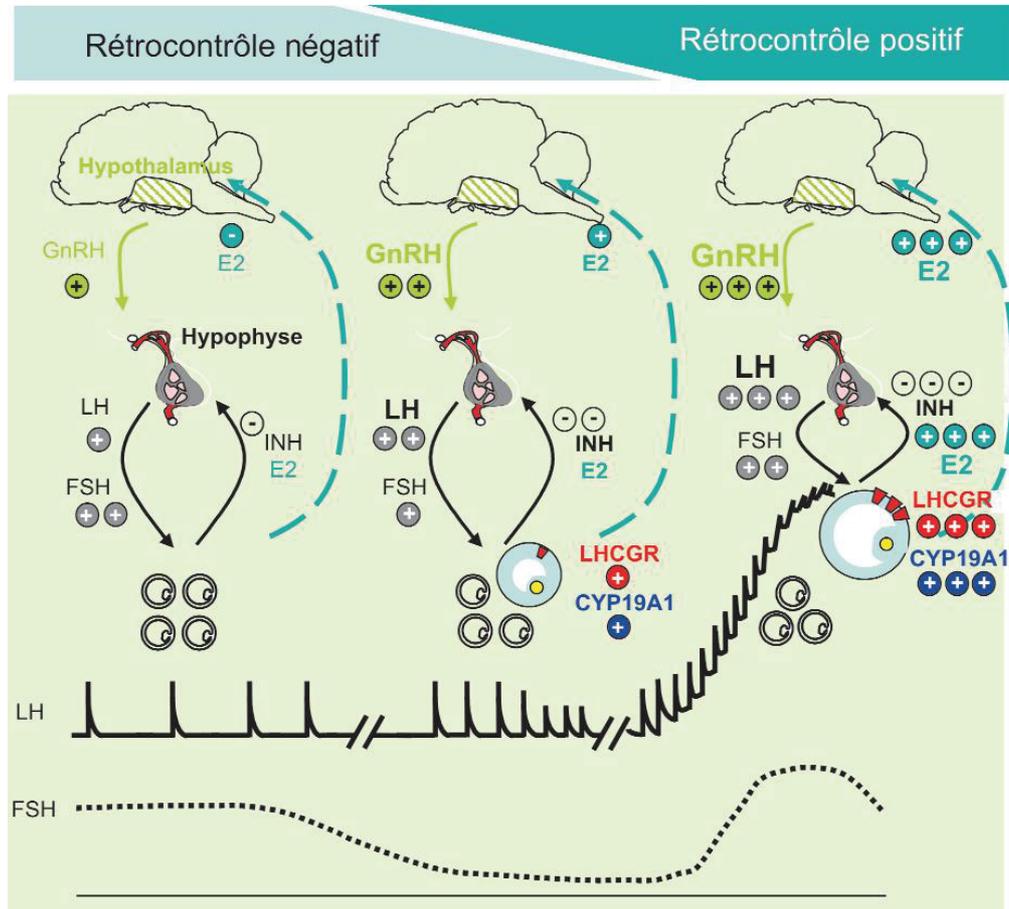
La dominance est l'étape ultime dans le processus de croissance folliculaire. Elle est associée à l'amorce de la régression des autres follicules recrutés et au blocage du recrutement de nouveaux follicules (Driancourt et al., 2001). Le follicule dit «dominant» ne souffre pas quant à lui de cette baisse des teneurs en FSH, puisqu'il induit, par rétroaction positive cette fois, via l'oestradiol, une forte augmentation de la fréquence des pulses de LH à laquelle il devient hypersensible, grâce à la très forte expression de récepteurs de LH dans ses cellules de granulosa. L'expression des deux marqueurs-clés de la différenciation folliculaire, CYP19A1 (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1) et LHCGR (luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor), est donc critique à l'établissement de la sélection du follicule préovulatoire (Figure 10 ; Monniaux et al., 2009). Le follicule dominant provoque l'atrophie des autres follicules 2 à 4 jours après le début de la vague folliculaire (Huyart, 2004).

La LH assure la maturation du follicule dominant, dont l'avenir dépend de la fréquence des décharges de LH, régulée par la GnRH. Lorsqu'un corps jaune (CJ) est présent, la fréquence d'une décharge de LH toutes les 3 à 4 heures provoque l'atrophie du follicule dominant (et par suite, l'absence d'ovulation et d'œstrus). Une nouvelle vague folliculaire a lieu, également précédée d'une augmentation transitoire de FSH. Lorsque la fréquence est d'un pic par heure, l'ovulation peut avoir lieu. Cette fréquence n'est atteinte que lors de la levée de l'inhibition de la progestérone sur la production de GnRH, à la suite de la lutéolyse. Le devenir du follicule dépend finalement de la présence ou non d'un corps jaune (Fair, 2003; Fair et al., 2013).

#### **1.1.2.2.4 Atrésie folliculaire.**

Les follicules de la cohorte débutent un processus d'atrophie qui se traduit, dès leurs premiers stades, par une augmentation de synthèse d'éléments inhibiteurs (IGFBP, androgènes, TP53, BAX ...) et la perte de synthèse d'éléments stimulants (oestradiol, BCL2L1), changements qui ne font que précipiter leur dégénérescence, 99 % des follicules qui entrent en croissance dégèrent (Monniaux et al., 1999). L'atrophie est sous le contrôle d'un mécanisme de mort cellulaire programmée, appelé apoptose. Pour les stades antraux,

l'atrésie est souvent entraînée lors de la sélection, par une réduction de la FSH, secondaire aux sécrétions d'œstradiol et d'inhibine par le follicule dominant. Seul le follicule de la dernière vague échappe à l'atrésie en devenant relativement indépendant de la FSH (Huyard et al., 2004 ; Mihm et Evans, 2008).



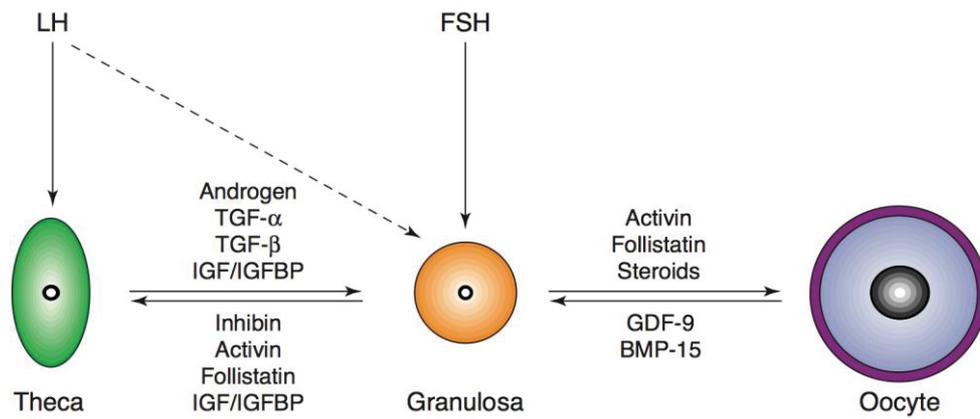
**Figure 10. Régulations de la sélection et du développement terminal du follicule ovulatoire pendant la phase folliculaire du cycle ovarien chez une espèce mono-ovulante.** La figure représente le dialogue endocrine existant entre les follicules ovariens de la vague ovulatoire et le système hypothalamo-hypophysaire, au début, au milieu et à la fin de la phase folliculaire. Au cours du temps, un seul des follicules de la vague devient progressivement l'acteur essentiel de ce dialogue et du déclenchement de la décharge préovulatoire de LH, et c'est ce follicule qui ovulera en réponse à cette décharge. E2 = œstradiol, INH = inhibine (Monniaux et al., 2009).

### **1.1.2.3 Régulation de la croissance folliculaire.**

#### **1.1.2.3.1 Facteurs de croissance.**

Chez les bovins, comme dans la plupart des autres espèces de mammifères, il est bien établi que la fonction ovarienne est principalement contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Mann et al. 2003) mais aussi par des facteurs à action locale comme les facteurs de croissance. Les facteurs de croissance sont polypeptidiques, ubiquistes et interviennent dans tous les processus de croissance, différenciation et mort cellulaire de l'organisme. Ils peuvent agir sur les cellules responsables de leur synthèse (autocrine), ou sur d'autres cellules du follicule par la voie locale (paracrine) ou sanguine (endocrine). Par ailleurs, ils peuvent également agir par des mécanismes additionnels tels, la juxtacrinie (activation de récepteurs sur la cellule adjacente via des facteurs de croissance attachés à la membrane cellulaire) et l'intracrinie (stimulation de la cellule où le facteur de croissance est produit sans production préalable de ce facteur de croissance) (Drion et al., 2000).

La croissance folliculaire basale est non gonado-dépendante et dépend des facteurs paracrines locaux impliqués dans les interactions cellulaires entre l'ovocyte, la granulosa et la thèque. Quatre systèmes sont à ce jour classiquement distingués: l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF (Insulin like Growth Factor : IGF1, IGF2 et les IGFBP-binding proteins), les TGF- $\beta$  (Transforming growth factors  $\beta$ ), l'inhibine, l'activine, la follistatine et les FGFs (Fibroblast growth factors). Certains, comme le GDF-9 (Growth and differentiation factor 9) ou le BMP-15 (Bone morphogenetic protein 15) sont produits par l'ovocyte lui-même (facteurs ovocytaires). Les gonadotropines influencent cependant pour partie la croissance folliculaire basale : FSH et LH jouent un rôle dans l'initiation et le maintien de la croissance des follicules pré-antraux via leur action respective sur les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque (Knight et Glistler, 2001 ; Figure 11).



**Figure 11. Principaux facteurs impliqués dans le développement folliculaire et la communication intercellulaire (Knight et Glister, 2001).**

Le tableau 1 présente les principales fonctions des facteurs qui interviennent dans la croissance et le développement de follicules préantraux (Palma et al., 2012).

**Tableau 1. Facteurs qui peuvent promouvoir la croissance et le développement des follicules préantraux (Palma et al., 2012).**

| Facteur                 | Origine                      | Fonction principale   |
|-------------------------|------------------------------|---|
| TNF $\alpha$            | Ovocyte                      | Régule l'apoptose des ovocytes  |
| BMP15                   | Ovocyte                      | Différenciation et prolifération des follicules primaires   |
| GDF9                    | Ovocyte                      | Différenciation et prolifération des follicules primaires   |
| EGF/Bfgf                | Ovocyte                      | Induit le développement des follicules primordiaux et préantraux  |
| Fig $\alpha$<br>(Figla) | Ovocyte                      | Coordination des gènes de structure pour le développement des follicules primordiaux comme Zp1, Zp2, et ZP3 du ZP       |
| Protein<br>ckit         | Ovocyte et thèque            | Transition de follicules primordiaux à follicules primaires, migration et prolifération des cellules germinales         |
| Activin                 | Cellules de la granulosa     | Prolifération des cellules de la granulosa  |
| KL                      | Cellules de la pré granulosa | Induction du développement de follicules primordiaux à follicules primaires   |
| GH                      | Endocrine                    | Développement des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque des follicules préantraux                       |
| Insuline                | Endocrine                    | Induction du développement des follicules primordiaux en follicules primaires   |
| IGF-I                   | Cellules de la granulosa     | Stimulation du développement de follicules préantraux en follicules antraux   |
| AMH                     | Cellules de la granulosa     | Inhibition du développement des follicules primordiaux  |
| AhR                     | Cellules de la granulosa     | Régulation de la taille de la population des ovocytes   |
| BMP4                    | Thèque, stroma               | Promoteur de la transition des follicules primordiaux en follicules primaires et intervient dans la survie des ovocytes |
| KGF                     | Thèque                       | Prolifération des cellules de la granulosa  |

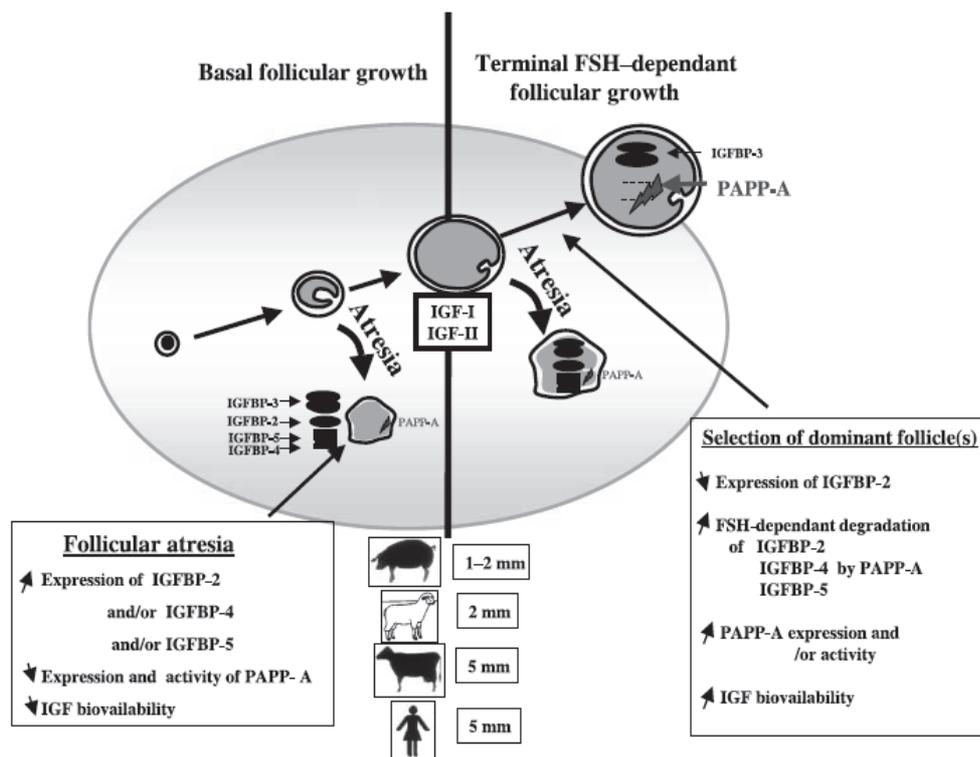
AhR: Aromatic hydrocarbon receptor, AMH: anti-Mullerian hormone, BMP: bone morphogenic protein, EGF/bFGF: epidermis growth factor/basic fibroblast growth factor, GDF: growth differentiation factor, GH: growth hormone, Fig $\alpha$ : factor in the germline alpha, IGF: insulin growth factor, KGF: keratinocyte growth factor, KL: Kit ligand, TNF: tumor necrosis factor.

Les rôles de ces facteurs de croissance dépendent des concentrations en gonadotropines et de l'état de différenciation du follicule.

Dans le cas de petits follicules antraux qui ne sont pas strictement dépendants de l'approvisionnement en gonadotrophine il est suggéré que les facteurs des familles FGF, EGF et IGF influencent directement sur la croissance folliculaire en stimulant la prolifération des cellules de la granulosa. Dans ces follicules, la vascularisation est peu développée, ce qui suggère que la régulation paracrine pourrait être d'une importance particulière. Par exemple, TGF- $\alpha$  et de l'IGF-II, synthétisés par les cellules de la thèque, peuvent jouer un rôle déterminant dans le contrôle de la prolifération des cellules de la granulosa adjacentes (Knight et Glister, 2001). Toutefois, une action endocrinienne des facteurs de croissance ne peut être exclue. L'administration de GH stimule la croissance des petits follicules antraux *in vivo* probablement par un mécanisme indirect impliquant l'IGF-I d'origine endocrinienne. En outre, un effet stimulant de FSH sur la croissance des petits follicules antraux est bien établi chez différentes espèces animales (Greenwald et Roy, 1994). Dans les follicules de hamster, EGF par l'action de la FSH peut intervenir sur la prolifération des cellules de la granulosa (Roy et Greenwald, 1991).

Le développement folliculaire terminal est strictement un processus « gonadotropine dépendante » correspondant à l'initiation des vagues folliculaires, la sélection du follicule dominant et la maturation terminale des follicules préovulatoires. Les facteurs de croissance peuvent jouer un rôle important dans ces processus. Les facteurs de la famille des FGF, EGF et IGF peuvent contrôler la croissance des petits follicules antraux et, de cette manière, participer avec la FSH à l'initiation de vagues folliculaires (Monniaux et al., 1997). Le système IGF constitue un des plus importants facteurs de régulation de la dominance folliculaire. Il stimule l'aromatase des cellules folliculaires en augmentant ainsi la production d'œstradiol. Il stimule la stéroïdogénèse des cellules thécales (Mc Ardle et Holtorf, 1989 ; Giudice, 1992) et il joue un rôle autocrine sur sa propre sécrétion par les cellules de granulosa. Le système IGF augmente la sensibilité des cellules de la granulosa à la stimulation des hormones gonadotropes en amplifiant leur synthèse de récepteurs à ces hormones lorsque les follicules ovariens entrent dans la croissance folliculaire terminale (Spicer et Echterkamp, 1995 ; Monget et Bondy, 2000 ; Mazerbourg et al., 2003).

Chez toutes les espèces pour lesquelles des informations sont disponibles, les concentrations d'IGFBP-2 et IGFBP-4 dans le liquide folliculaire diminuent fortement au cours de la croissance folliculaire et augmentent pendant l'atrésie, conduisant à une augmentation et une diminution de la biodisponibilité de l'IGF, respectivement. La diminution de ces IGFBP résulte d'une diminution de l'expression de l'ARNm (IGFBP-2) et d'une augmentation de la dégradation protéolytique de PAPP-A dans le liquide folliculaire (IGFBP-2, IGFBP-4 et IGFBP-5). Ces fonctions participeraient à la sélection du follicule dominant. Toutefois, les niveaux et/ou sites d'expression de l'IGF1, IGF2, IGFBP-4, IGFBP-5 et type récepteur II dans les cellules folliculaires diffèrent fortement entre les espèces de mammifères, ce qui suggère que ces phénomènes pourraient jouer un rôle spécifique à chaque espèce ou un rôle secondaire dans la folliculogénèse ovarienne (Figure 12 ; Mazerbourg et al., 2003).



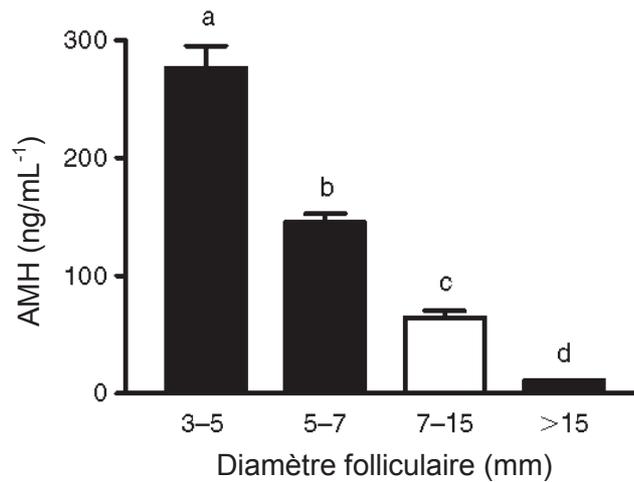
**Figure 12.** Changements dans les niveaux et l'activité des éléments du système IGF pendant la croissance folliculaire et l'atrésie dans les ovaires chez les mammifères (Mazerbourg et al., 2003).

### **1.1.2.3.2 Hormone anti-Müllérienne (AMH).**

L'hormone anti-Müllérienne (AMH) est un homodimère glycoprotéique de 140 kD appartenant à la superfamille du transforming growth factor (TGF- $\beta$ ). L'AMH exerce son action en se liant à un récepteur membranaire appartenant à la famille des récepteurs du TGF- $\beta$ , à activité sérine-thréonine kinase.

L'AMH, sécrétée par les cellules de Sertoli dans les testicules, est responsable de la régression des conduits de Müller chez les fœtus mâles (Jost et al., 1973). Des études ultérieures ont montré que l'AMH exerce des effets inhibiteurs sur le développement et le fonctionnement des organes reproducteurs chez les deux sexes (Teixeira et al., 2001; Josso et Clemente, 2003). Dans l'ovaire, AMH inhibe le recrutement des follicules primordiaux dans la réserve de follicules en croissance (Durlinger et al., 1999; Gigli et al., 2005), afin d'éviter l'épuisement prématuré de la réserve folliculaire ovarienne.

Dans l'ovaire de la vache, l'AMH est localisée dans les cellules de la granulosa des follicules préantraux et antraux, ainsi que dans le cumulus oophorus, mais elle est indétectable dans les follicules primordiaux avant l'activation de la croissance. De plus, les concentrations d'AMH sont plus élevées dans le liquide folliculaire des petits follicules antraux et diminuent de façon marquée quand les follicules augmentent leur taille pré-ovulatoire (Figure 13 ; Monniaux et al., 2013). D'autre part, les follicules kystiques qui n'ovulent pas ou qui régressent contiennent des concentrations d'AMH plus faibles. Dans ces follicules plus grands a été trouvée une corrélation négative entre la progestérone et les concentrations d'AMH, indiquant que les faibles concentrations d'AMH dans les kystes sont associées à une lutéinisation (Monniaux et al., 2008).

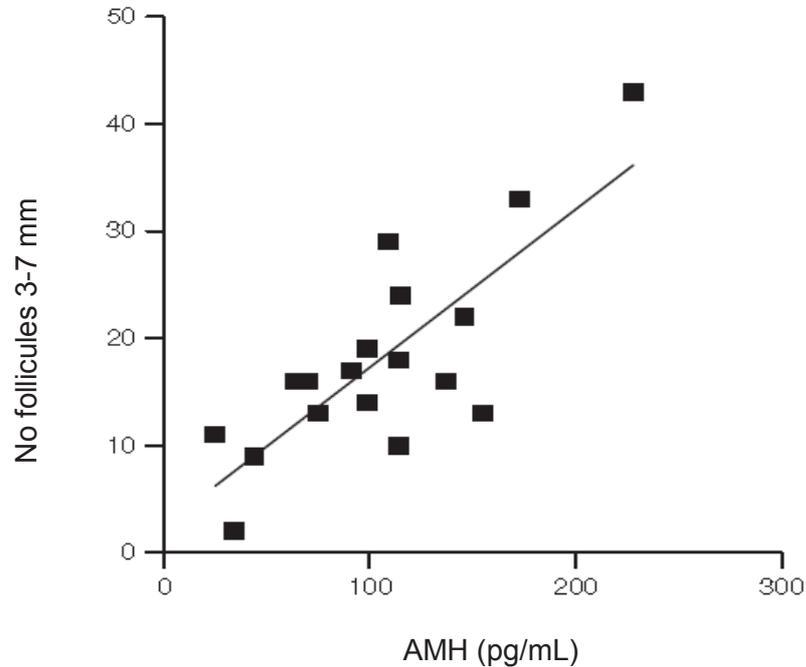


**Figure 13. Concentration dans le liquide folliculaire de l'hormone (AMH), déterminée par ELISA (Monniaux et al., 2013).**

Les effets de la taille folliculaire et l'atrésie sur l'expression de l'AMH ont été évalués plus précisément chez la vache (Rico et al., 2009). Les concentrations d'AMH dans le liquide folliculaire et l'expression de l'ARNm de l'AMH dans les cellules de la granulosa diminuent au cours du développement des follicules antraux jusqu'au stade préovulatoire et sont clairement affectés par les phénomènes d'atrésie. Rico et al. (2009) ont montré que les follicules sains de 3 à 7 mm, non-oestrogéniques sont hautement producteurs d'AMH, tandis que les follicules sains de plus de 7 mm oestrogéniques produisent de faibles concentrations d'AMH.

De plus, les relations entre les populations des petits follicules (3 à 7 mm) et les concentrations plasmatiques de l'AMH ont été étudiées chez les vaches (Rico et al., 2009). Le nombre de follicules de 3 à 7 mm est fortement en relation avec les concentrations plasmatiques de l'AMH suggérant que ces follicules contribuent de manière significative aux niveaux endocriniens de l'AMH (Figure 14). Des relations similaires ont été établies chez les humains (van Rooij et al., 2002), les souris (Kevenaar et al., 2006) et les génisses (Ireland et al., 2008). En plus, les concentrations d'AMH rapportées dans les follicules de 3 à 7 mm ont été corrélées avec la concentration plasmatique de l'AMH ( $r=0.95$ ,  $P < 0,001$ ,  $n=9$  vaches ; Rico et al., 2009). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle l'AMH est un marqueur endocrine fiable de la population de petits follicules antraux chez les ruminants, comme chez les humains, mais ces auteurs n'excluent pas la possibilité que les autres classes de follicules,

particulièrement les follicules pré-antraux les plus grands, peuvent contribuer aux concentrations plasmatiques de l'AMH (Monniaux et al., 2013).



**Figure 14. Relation entre le nombre de follicules antraux et les concentrations plasmatiques anti-Müllerian hormone (AMH) chez les vaches Holstein (n=18).** Les follicules ont été comptés par échographie. Le coefficient de corrélation chez les vaches a été de 0,79 ( $P < 0,001$ ). Adapté de Monniaux et al. (2013).

Les concentrations plasmatiques d'AMH apparaissant stables sur une durée de plusieurs mois pour un même animal, elles sont un bon marqueur endocrinien de la folliculogénèse basale (en particulier de la population de petits follicules à antrum, principale cible des traitements de stimulation ovarienne utilisant des hormones gonadotropes), sa mesure est proposée comme méthode prédictive simple d'évaluation du niveau d'activité ovarienne et de capacité de production d'embryons par une potentielle vache donneuse (Monniaux et al., 2010 ; Rico et al., 2012 ; Monniaux et al., 2013).

Différents travaux ont investigué les liens entre les concentrations plasmatiques d'AMH et les nombres de follicules, d'ovocytes ou d'embryons chez les bovins (Tableau 2). Des différences significatives pour les nombres de follicules, ovocytes et embryons ont été rapportées entre les femelles présentant des concentrations d'AMH élevées et celles présentant des niveaux peu élevés.

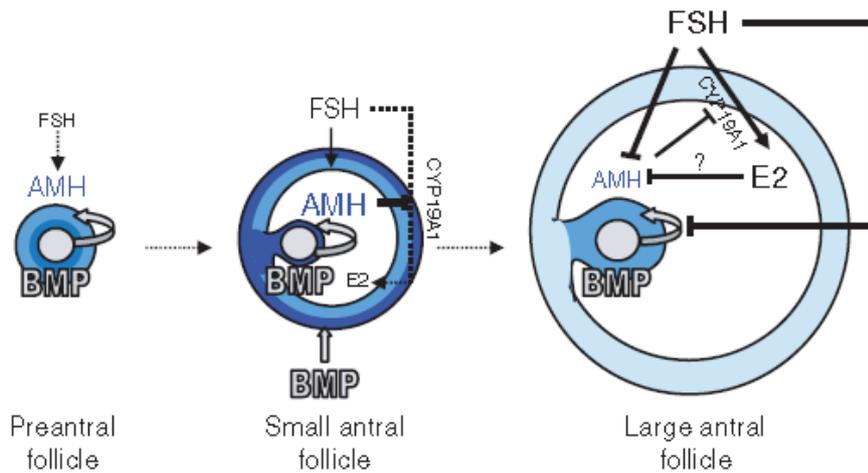
**Tableau 2. Catégories de population de follicules à antrum en relation avec la concentration d'AMH chez les bovins.**

| Animaux                      | n        | Concentration plasmatique d'AMH (pg/mL) | Classification selon niveaux d'AMH ou Nombre de Follicules* | Nombre de follicules       | Nombre d'ovocytes (OPU) | Nombre d'embryons in vivo               | Référence              |
|------------------------------|----------|---|---|----------------------------|-------------------------|---|------------------------|
| Génisses (Holstein)          | 8        | 60a ± 20                                | LFC   | 13,4 <sup>a**</sup> ± 1,40 |                         |   |                        |
| Génisses (Holstein)          | 7        | 570b ± 260                              | HFC   | 34,3 <sup>b</sup> ± 3,12   |                         |   | Batista et al. (2014)  |
| Génisses (zebus)             | 8        | 780c ± 160                              | LFC   | 28,4 <sup>b</sup> ± 2,15   |                         |   |                        |
| Génisses (zebus)             | 7        | 1200d ± 160                             | HFC   | 48,1 <sup>c</sup> ± 2,33   |                         |   |                        |
| Génisses (Holstein)          | 41 (OPU) | <100                                    | B   |                            | 5,6 <sup>b</sup> ± 3,9  | 10,9 <sup>a</sup> ± 7,9                 |                        |
|                              | 125      | 100-400                                 | N   |                            | 9,2 <sup>b</sup> ± 5,2  |   |                        |
|                              | (MOET)   | >400                                    | H   |                            | 13,8 <sup>a</sup> ± 9,2 | 5,7 <sup>b</sup> ± 5,0                  |                        |
| Génisses (Aberdeen Angus)    | 89       | 14,61 <sup>a</sup> ± 6                  | LFC   | 4,16a ± 1,02               |                         |   | Ereno et al. (2012)    |
|                              |          | 47,17 <sup>b</sup> ± 6,2                | HFC   | 19,35b ± 1,0               |                         |   |                        |
| Génisses (Aberdeen Angus)    | 131      | 77,24 <sup>c</sup> ± 4,71               | LFC   | 10,9c ± 1,21               |                         |   |                        |
|                              |          |   | HFC   | 27,28d ± 1,0               |                         |   |                        |
| Vaches (Holstein x Normande) | 10       | 0-100                                   | B   |                            |                         | 8.3 <sup>a</sup> ; (5.4) <sup>a</sup>   | Monniaux et al. (2010) |
| Vaches (Holstein x Normande) | 13       | 100-200                                 | N   |                            |                         | 11.8 <sup>b</sup> ; (9.) <sup>4b</sup>  |                        |
| Vaches (Holstein x Normande) | 10       | >200                                    | H   |                            |                         | 15.8 <sup>b</sup> ; (10.9) <sup>b</sup> |                        |

\*LFC : low follicle population (population de follicules peu élevée), HFC : High follicle population (population de follicules élevée) ; H : Haut niveaux d'AMH, B : Bas niveaux AMH, N : Niveau moyen d'AMH. \*\*Valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d) dans une colonne pour des mêmes autours différent significativement (P <0,05).

En outre, les travaux réalisés par Rico et al. (2012) dans des conditions expérimentales et en ferme ont proposé des valeurs seuil de l'AMH afin d'identifier les vaches avec faible réponse ou « mauvaises donneuses » à des traitements de superovulation. Les vaches stimulées avec des gonadotropines produisant moins de 15 grands follicules à l'œstrus et moins de 10 embryons dans les protocoles MOET pourraient être éliminées efficacement avec des concentrations plasmatiques d'AMH inférieures à 87 et 74 pg.mL<sup>-1</sup> respectivement. Par conséquent, il apparaît possible d'éliminer les animaux avec une capacité basse de production d'embryons dans une population de vaches Holstein par la détermination d'un seul échantillon de plasma sanguin pris plusieurs mois avant l'entrée en MOET ou en programme d'OPU (Rico et al., 2012). Cependant, il reste à préciser les conditions optimales pour la réalisation de ce diagnostic, en prenant en compte l'âge de l'animal, sa race, son état physiologique et les facteurs environnementaux liés à ses conditions d'élevage (Monniaux et al., 2010). Pour exemple les génisses *Bos indicus* (Nelore) ont un niveau élevé d'AMH plasmatique et une population élevée de follicules à antrum par comparaison aux génisses *Bos Taurus* (Batista et al., 2014 ; Tableau 2).

L'induction hormonale de la production de AMH dans les cellules de la granulosa des follicules précoces en croissance n'a pas encore été élucidée (Monniaux et al., 2013). Des travaux chez la vache ont montré que les cellules de la granulosa commencent à exprimer de l'AMH dès que le follicule démarre sa croissance au stade de follicule primaire et que cette expression s'éteint progressivement dans les follicules à antrum au cours de leur développement terminal. D'après les données disponibles chez les vaches et les brebis, les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) produites par l'ovocyte et thèque et FSH (lorsqu'ils agissent à faible concentration), peuvent augmenter l'expression des gènes dans les cellules de la granulosa des follicules préantraux et des petits follicules antraux chez les ruminants. En revanche, des concentrations élevées d'AMH dans les petits follicules antraux participent à l'inhibition des différents effets de la FSH sur les cellules de la granulosa. Au cours de l'évolution des follicules antraux, les cellules de la granulosa deviennent de plus en plus stéroïdogènes et extrêmement sensibles à la FSH. Dans les cellules différenciées de la granulosa, la FSH pourrait inhiber l'expression de l'AMH et contrarier l'action stimulatrice de BMP, conduisant à une diminution des concentrations d'AMH intrafolliculaires. Il est suggéré que l'action inhibitrice de la FSH sur l'expression de l'AMH peut-être véhiculée, au moins en partie, par des concentrations élevées intrafolliculaires d'œstradiol (E2) résultant d'une expression accrue de CYP19A1 dans les cellules de la granulosa des grands follicules antraux lorsqu'ils se développent en phase pré-ovulatoire (Figure 15).



**Figure 15. Hypothèses actuelles de régulations paracrines et endocrines sur la production d’hormone anti-Müllerienne au cours de la folliculogénèse chez les mammifères.** L’intensité de la coloration bleue représente la concentration de l’AMH dans les cellules de la granulosa. L’expression de l’AMH est plus élevée dans les cellules de la granulosa extérieure et dans les cellules du cumulus de petits follicules antraux (Monniaux et al., 2013).

#### 1.1.2.4 Compétence ovocytaire et maturation ovocytaire.

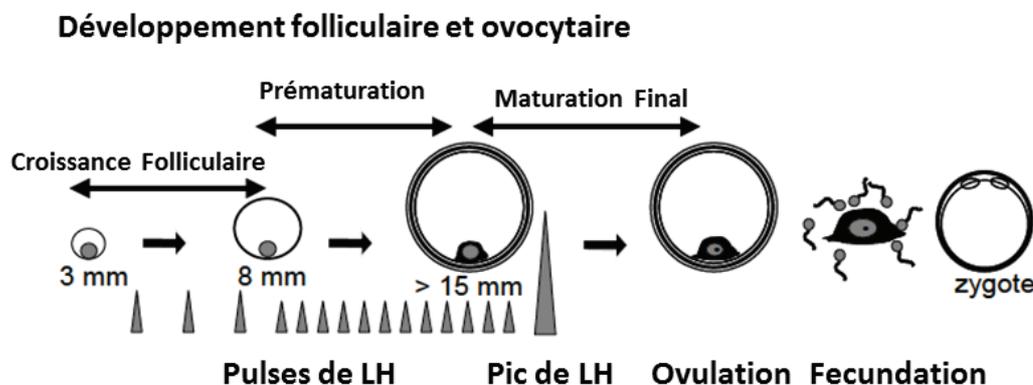
La compétence ovocytaire est définie par la succession de la compétence méiotique et de la compétence au développement. La compétence méiotique correspond à la capacité de l’ovocyte à reprendre sa méiose et à la poursuivre jusqu’au stade métaphase II. La compétence au développement correspond à la capacité de l’ovocyte à assumer avec succès la fécondation, développement embryonnaire et donner naissance à une progéniture normale et saine (Sirard et al., 2006). Ces capacités peuvent provenir par événements distincts, réussir dans les premiers événements mais ne pas assurer le succès des suivants (Boni 2012).

Chez la vache, l’ovocyte acquiert sa compétence méiotique à partir du stade de follicule tertiaire, présentant un diamètre de 2 à 3 mm et contenant un ovocyte d’un diamètre d’environ 110 µm. La compétence au développement est acquise à des stades plus tardifs. La proportion d’ovocytes compétents augmente en effet progressivement avec le diamètre folliculaire (Lonergan et al., 1994 ; Marchal et al., 2002) pour atteindre un maximum dans les follicules préovulatoires (diamètre folliculaire supérieur à 14 mm, contenant un oocyte de

diamètre supérieur à 120  $\mu\text{m}$ ) (Fair, 2003 ; Sirard et al., 2006 ; Hennet et al., 2012 ; Figure 3 et Figure 8).

Le microenvironnement folliculaire ovarien et les signaux maternels, mis en place principalement par les cellules de la granulosa et cellules du cumulus, sont responsables du soutien de la croissance des ovocytes, du développement et de l'acquisition progressive de la compétence au développement. La communication bidirectionnelle entre les ovocytes et les cellules somatiques dans le follicule est complexe, se produisant par l'intermédiaire de multiples acteurs et événements de signalisation (pic de LH, GAP - junctions, Meiosis Activating, Sterols, PKA (isoformes I et II), voie de signalisation des protéines kinases (Royere 2006). Ce haut niveau de complexité a rendu difficile de définir les caractéristiques essentielles d'un ovocyte qui sont nécessaires pour atteindre la compétence pour la fécondation et développement de l'embryon (Zuccotti et al., 2011).

L'ovocyte acquiert l'aptitude à être fécondé et à soutenir le développement embryonnaire précoce au cours de sa croissance, de la prématuration et de la maturation finale avant l'ovulation (Dieleman et al., 2002 ; Figure 16).



**Figure 16. Phases de la croissance du follicule, prématuration de l'ovocyte, développement de follicule pré-ovulatoire et de l'ovule et la fécondation.** Modifiée depuis Knijn (2004) et Dieleman et al. (2002).

L'étude de la maturation in vivo a permis de connaître les changements cytologiques et la chronologie de leur évolution avec précision. Les recherches in vitro se sont appuyées sur ces

connaissances pour aborder l'étude des mécanismes moléculaires impliqués (Mermillod et Marchal, 1999).

#### **1.1.2.4.1 Maturation ovocytaire in vivo.**

Au cours de la phase lutéale du cycle, le follicule dominant de la première vague subit l'atrésie, mais au cours de la dernière vague, la croissance du follicule dominant est accompagnée par une augmentation de la fréquence de pulses de LH, ce qui probablement induit le début de la prématuration ovocytaire laquelle est complétée peu de temps avant le pic de LH (Wiltbank et al., 2002 ; Dieleman et al., 2002 ; Figure 16).

La prématuration ou capacitation débute lorsque le follicule dominant atteint un diamètre de 8 mm. Au cours de ce phénomène, des changements morphologiques ultra structuraux se produisent telles que la migration des granules corticaux et l'ondulation de la membrane nucléaire de l'ovocyte. Une synthèse de protéines a lieu dans le COC, contribuant probablement à l'accomplissement de la maturation finale ou aux premiers stades de l'embryogenèse (Dieleman et al. 2002).

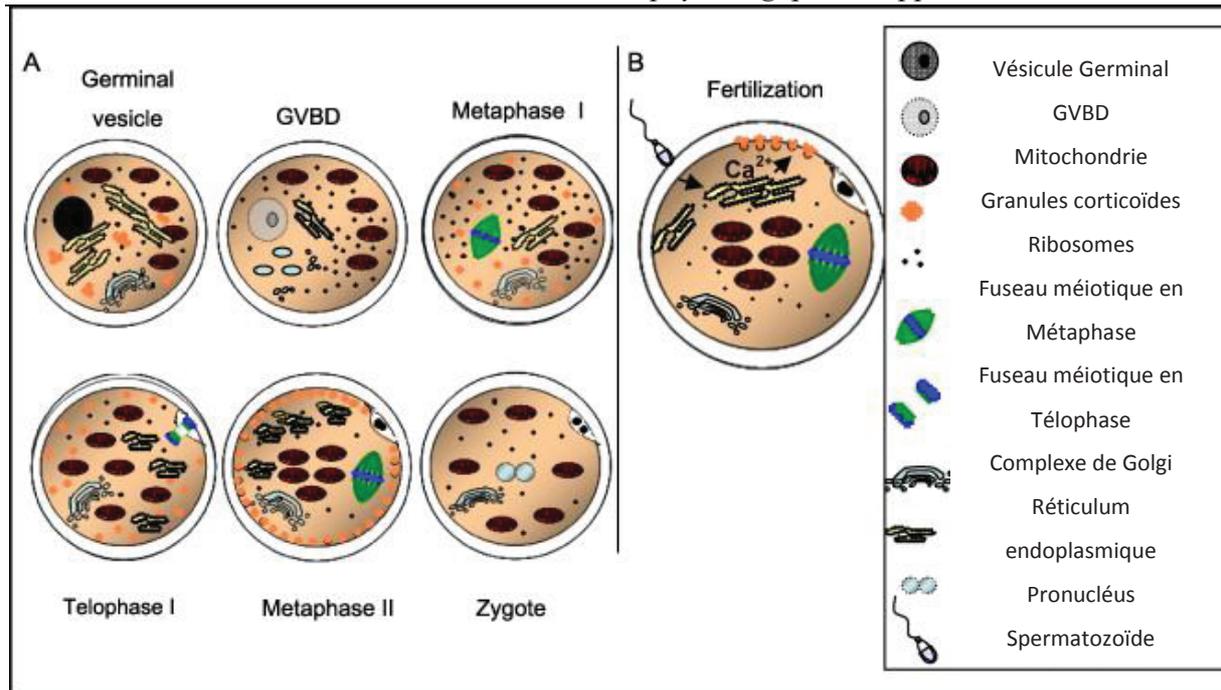
Chez la vache, la maturation finale du follicule ovulatoire et de son ovocyte est initiée par le pic préovulatoire de LH. La maturation finale est complétée en 24 h et prend fin avec l'ovulation d'un ovocyte dit mature et prêt à être fécondé. Les maturations nucléaires (méiotique), cytoplasmiques, et moléculaires s'accomplissent simultanément et représentent une série de processus complexes qui vont permettre à l'ovocyte de s'équiper pour passer avec succès les étapes de la fécondation et du développement de l'embryon pré-MZT (Transition Materno-Zygotique) (Sirard et al. 2003 ; Sirard et al. 2006).

L'évolution nucléaire de l'ovocyte est très particulière. Le processus méiotique de l'ovocyte est bloqué au stade de vésicule germinale depuis la vie fœtale (stade diplotène, à la fin de prophase de la première division méiotique, ovocyte I). L'ovocyte, bloqué en prophase de première division méiotique tout au long de la folliculogenèse, entame les processus de maturation suite à la décharge pré-ovulatoire de LH. Cette méiose une fois reprise, sera poursuivie jusqu'au stade de métaphase de seconde division méiotique (métaphase II), après expulsion du premier globule polaire (ovocyte II), stade auquel l'ovocyte connaît un nouveau blocage produit par un signal folliculaire inhibiteur (OMI = Ovocyte Meiotic Inhibitor). C'est à ce stade qu'ont lieu l'ovulation et la fécondation.

L'OMI serait originaire de la thèque interne et transmis à la granulosa. La granulosa activerait ce signal et le transmettrait à l'ovocyte via les jonctions perméables ou le fluide folliculaire. Lors de la décharge gonadotrope ovulante (LH), ce signal inhibiteur ne serait plus transmis par la granulosa (Mermillod et Marchal, 1999).

La maturation cytoplasmique dépend de signaux externes stimulateurs comme l'EGF ou d'autres facteurs (GH, activine, inhibine) contenus dans le liquide folliculaire (Driancourt et Thuel, 1998). Les cellules du cumulus-oophorus subissent également des modifications: elles produisent de l'acide hyaluronique qui va provoquer l'expansion du cumulus lors de sa sécrétion dans les espaces extra-cellulaires. De plus, des remaniements structuraux (migration des granules corticaux, réarrangement du cytosquelette...) et biochimiques (changement des profils de synthèse protéiques...) ont lieu en parallèle dans le cytoplasme de l'ovocyte, le préparant à la fécondation et au développement embryonnaire (Ferreira et al., 2009 ; Figure 17).

Un phénomène invisible au microscope et pourtant fondamental pour le devenir de l'embryon est la maturation moléculaire. La maturation moléculaire désigne les modifications de l'expression génique dont le patron permettra à l'ovocyte de mener à terme ou non son développement jusqu'au stade embryon (Mourot 2006). Au cours de sa croissance, l'ovocyte accumule des transcrits maternels dont il se servira progressivement jusqu'à la MZT puisque la transcription est très faible à partir de la maturation finale. Il est donc probable que le niveau de compétence soit lié à l'accumulation de ces transcrits. C'est à partir de cette idée que de nombreuses études ont entrepris de comparer l'expression de gènes ou de comparer le transcriptome entre ovocytes ou embryons de différents niveaux de compétence (Rodriguez et Farin, 2004 ; Penetier, 2005 ; Mourot 2006).



**Figure 17.** Schéma de la distribution des organites cytoplasmiques pendant la maturation, la fécondation et la formation du zygote bovin. A. Progression de la maturation nucléaire et développement des organites cytoplasmiques du stade immature de vésicule germinale aux stades métaphase II et formation du zygote. B. Répartition des organites et du mécanisme de la libération du contenu des granules corticaux, suivi de la libération du calcium intracellulaire ( $Ca_2^+$ ) après l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de la fécondation (Ferreira et al., 2009).

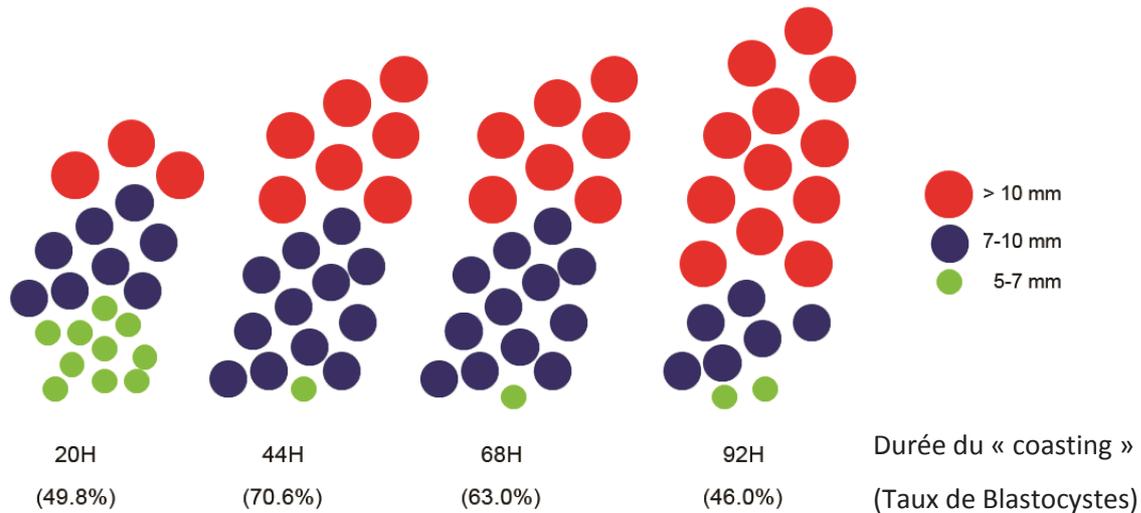
#### 1.1.2.4.2 Maturation ovocytaire in vitro.

La maturation in vitro (MIV) est la première étape du processus de production d'embryons in vitro (PIV) chez les bovins : elle permet la production d'ovocytes matures, aptes à être fécondés et à supporter le développement embryonnaire précoce à partir d'ovocytes collectés au stade « immature ». Elle permet également d'approcher certains phénomènes physiologiques et cellulaires difficilement accessibles in vivo, tels que le déroulement et la régulation de la méiose ou encore la maturation cytoplasmique de l'ovocyte.

Le modèle de maturation in vitro d'ovocytes est largement utilisé chez les bovins, à partir d'ovocytes prélevés sur des ovaires d'abattoir. Il comprend l'aspiration des complexes ovocyte-cumulus (COC) des follicules tertiaires de 2 à 6 mm de diamètre (Imai et al., 2006) et la culture de ces COCs dans un milieu de maturation in vitro (MIV) pendant 24 heures. Dans

ces conditions, il a été montré que 90% des ovocytes parviennent au stade MII (métaphase II). Parmi ceux-ci, 75-80% seront fécondés et présenteront au moins une division ou segmentation. Cependant, seulement 30 à 40% d'entre eux vont se développer jusqu'au stade de blastocyste contre 60 à 80% des ovocytes prélevés après maturation in vivo (Greve et al., 1987 ; Marquant-Le Guienne et al., 1989 ; Mermillod et al., 1999 ; Rizos et al., 2002a). Cette situation a néanmoins évolué depuis 2002 avec l'introduction de la technique du « coasting » (Blondin et al., 2002). Chez la vache, le « coasting » correspond à l'intervalle de temps entre la dernière injection de gonadotrophine (FSH) et le prélèvement des ovocytes (OPU). Ce délai entre l'administration de gonadotrophine et la collecte des ovocytes exerce une pression sélective qui élimine les petits follicules et augmente la proportion de moyens à grands follicules (Fluker et al., 1999 ; Blondin et al., 2002). De plus, la technique du « coasting » induit une légère atrésie dans les couches extérieures des cellules du cumulus, qui se traduit par un plus grand nombre de COCs de qualité 3 et l'amélioration de la compétence au développement (Blondin et Sirard, 1995). Ce début d'atrésie est conforme avec le rôle « pro-survie » de la FSH sur les follicules antraux (Chun et al., 1996). Les travaux de Blondin et al. (2012) concluent que la stratégie du « coasting » est un outil efficace pour améliorer la compétence des ovocytes et la production d'un plus grand nombre de populations homogènes d'ovocytes compétents (Blondin et al., 2012). Cependant, cette même équipe avait montré en 2006, lors d'une étude rétrospective de 5 ans incluant différents traitements de stimulation de la croissance folliculaire et une période plus ou moins longue de « coasting », que ce délai n'avait pas d'effet sur la réponse ovarienne et sur le taux de développement des embryons après FIV (Durocher et al., 2006). Ces résultats pourraient être expliqués en partie par l'utilisation de systèmes de production in vitro différents ou par une préparation différente des donneuses.

La taille des follicules est un paramètre important qui influe sur la compétence de l'ovocyte. Les travaux de Nivet et al. (2012) ont démontré que le pourcentage le plus élevé d'embryons transférables provenait de follicules présentant un diamètre supérieur à 7 mm après stimulation et ponctionnés après une courte période de « coasting » (44 à 68 h ; Figure 18). Ces mêmes auteurs ont déterminé un délai optimal de  $54 \pm 7$  h pour des vaches laitières superovulées. Les ovocytes provenant de follicules inférieurs à 4 mm manqueraient de facteurs folliculaires additionnels qui ne leur permettraient d'acquérir une compétence complète (Lonergan et al., 1994 ; Blondin and Sirard, 1995 ; Marchal et al., 2002).



**Figure 18. Relation entre la période (durée) de « coasting », le diamètre folliculaire et le pourcentage de blastocystes.** La représentation graphique correspond à la proportion de follicules de chaque classe déterminée par échographie (Blondin et al., 2012).

De plus, des protocoles ont été testés, afin de collecter des ovocytes ayant terminé leur maturation in vivo et présentant une compétence de développement supérieure par rapport à celle obtenue in vitro (Hendriksen et al., 2000 ; Rizos et al., 2002a ; Humblot et al., 2005). Ainsi, Humblot et al. (2005) ont rapporté un développement supérieur de blastocystes à partir d'ovocytes prélevés 20 h après l'administration de GnRH et immédiatement inséminés, par rapport aux ovocytes collectés maturés in vitro.

L'utilisation d'ovocytes ayant accompli leur maturation in vivo, permet donc d'augmenter le taux de développement in vitro (Rizos et al., 2002a ; Matoba et al., 2013). L'origine de l'ovocyte et ses conditions de maturation constituent donc les points limitants au succès de la production d'embryons in vitro (Mermillod et al., 1999), en lien avec les aspects nucléaires de la maturation.

En outre, les aspects cytoplasmiques dépendent principalement des conditions du milieu de maturation. Les hormones gonadotropes ont une action sur certains aspects de la maturation (par exemple, sur l'expansion du cumulus). D'autres facteurs peuvent intervenir sur la maturation nucléaire et cytoplasmique, comme le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor, EGF) dont l'action a été rapportée chez plusieurs espèces dont les bovins (Lonergan et al., 1996). Les facteurs de croissance de la famille de l'insuline sont

largement impliqués dans le contrôle de la folliculogénèse (Monget et Monniaux, 1995) et l'IGF1 pourrait agir en synergie avec l'EGF dans le contrôle de la maturation ovocytaire (Lorenzo et al., 1995).

Le milieu plus généralement utilisé pour la maturation est le TCM 199, un milieu tamponné au bicarbonate, contenant des sels minéraux, des sources de carbone et d'énergie (glucose) ainsi que des acides aminés (cystine, cystéine, glutamine, etc) et des vitamines. A ce milieu de base sont ajoutées des molécules de hauts poids moléculaires, dont l'effet surfactant empêche l'adhésion des complexes cumulus ovocytes entre eux, ainsi qu'au support de culture comme l'albumine sérique bovine (BSA) ou le sérum fœtal bovin. Cependant, l'utilisation de ces additifs d'origine animale peut poser des problèmes d'ordre sanitaire (Ponsart et Pozzi, 2013). De plus, des hormones ou additifs sont ajoutés pour enrichir ce milieu de maturation, comme la FSH qui potentialise l'action des facteurs de croissance et stimule l'expression des récepteurs LH dans les cellules du cumulus, la LH qui a une action directe sur le métabolisme ovocytaire en augmentant la glycolyse et la phosphorylation oxydative, l'oestradiol qui augmente la capacité de développement des ovocytes humains après MIV, sans affecter la maturation nucléaire (Tesarik et al., 1997) et l'EGF, dont les effets ont été mentionnés ci-dessus.

Les signes morphologiques de la maturation *in vitro* sont l'expansion des cellules du cumulus, l'évolution du matériel chromosomique et l'expulsion du premier globule polaire. Avant la maturation, l'ovocyte immature, au stade de vésicule germinale (VG), est entouré par le cumulus compact. Après 3 heures de MIV, les chromosomes se condensent dans la vésicule germinale. Le stade de rupture de la vésicule germinale (VGBD : vesicule germinal break down) a lieu vers 6 heures de MIV. Après 10 heures de MIV, l'ovocyte achève la méiose I et les cellules du cumulus commencent à s'expanser, pour atteindre un niveau maximal d'expansion en fin de MIV (après 24 h), lorsque l'ovocyte est au stade de MII, après expulsion du premier globule polaire (ovocyte secondaire, mature). Chez les ruminants, l'opacité du cytoplasme ovocytaire riche en lipides et la présence des cellules du cumulus interdisent l'observation visuelle des événements méiotiques. Le seul signe visible de maturation dans ces espèces est donc l'expansion du cumulus, contrairement aux rongeurs et aux primates dont la transparence du cytoplasme ovocytaire autorise le suivi du déroulement méiotique.

### **1.1.3 Fécondation.**

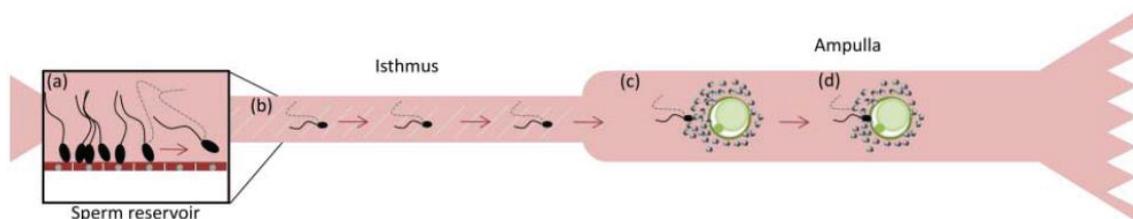
#### **1.1.3.1 Fécondation in vivo.**

Pendant l'accouplement, des milliards de spermatozoïdes sont déposés (5-8 ml/taureau, 1 milliard spz/ml, IA (Insémination artificielle) = 8 millions de spz reviviscents) dans le vagin à proximité du cervix lors de la saillie ou directement dans l'utérus en avant du col lors d'une IA (Thibault, 2001). Le transport des spermatozoïdes dans le tractus génital vers l'ovocyte est régulé et est efficacement contrôlé par les différents composants du tractus génital femelle, en plaçant des filtres et des pièges dans le trajet de spermatozoïdes (Suarez et al., 2003). Seul un très faible pourcentage de spermatozoïdes sélectionnés atteint le site de fécondation : l'ampoule oviductale ipsi-latérale au corps jaune chez les bovins (Coy et al., 2012 ; Figure 19). Les spermatozoïdes dans ce lieu de stockage sont attachés et stabilisés pendant l'intervalle pré-ovulatoire avec suppression de la motilité et les membranes de surface restent intactes (Hunter, 2012), mais plus tard le sperme se détache et acquiert un autre modèle de motilité nommé « motilité suractivée » du à l'augmentation de  $Ca^{2+}$  (Figure 19 ; Coy et al., 2012). Un travail récent utilisant des modèles de souris transgéniques a montré qu'une étape critique dans le transport du sperme est leur migration à travers la jonction utéro-tubaire (Tokuhiro et al., 2012).

L'ovule bloqué en métaphase II reprend alors la division cellulaire. L'ovocyte reste fécondable 6 à 12 heures après l'ovulation, les spermatozoïdes restent féconds 24 à 40 heures dans les voies génitales femelles (Dalton et al., 2001). La fonction principale des cellules épithéliales de l'oviducte est de maintenir la viabilité des spermatozoïdes, de synchroniser les transports des ovocytes et des spermatozoïdes au sein de l'oviducte et de faciliter la capacitation des spermatozoïdes, la fécondation et le développement embryonnaire précoce (Georgiou et al., 2007). La capacitation implique des modifications enzymatiques et structurelles à la partie antérieure de l'acrosome et de la membrane de la tête du spermatozoïde. Ceux-ci comprennent: i) une augmentation de la perméabilité de la membrane au calcium, ii) la modification de la structure de la membrane, iii) l'activation de l'enzyme adényl cyclase, iv) la conversion de la protéine proacrosine en acrosine (Bal et Peters, 2004). La liaison du sperme à la zone pellucide déclenche une cascade de signalisation conduisant à l'activation de la réaction de l'acrosome, qui implique la libération d'enzymes: la hyaluronidase (qui provoque la décomposition de l'acide hyaluronique, la principale composante de la matrice intercellulaire des cellules de la granulosa entourant l'ovocyte) et

l'acrosine (qui digère le revêtement acellulaire autour de l'ovocyte) de la tête acrosomique, permettant ainsi au sperme de pénétrer et de fusionner avec l'ovocyte (Gayrard, 2007). La capacitation et la réaction de l'acrosome sont très étroitement liées et par conséquent, il n'est pas toujours possible de faire la distinction entre les deux processus (Bal et Peters, 2004).

Après la pénétration par le sperme, le contenu des granules corticaux sont libérés dans l'espace périvitellin (Figure 17). Les granules corticaux contiennent entre autre des enzymes hydrolytiques qui modifient la zone pellucide en la rendant impénétrable pour les spermatozoïdes surnuméraires. L'exocytose des granules corticaux joue ainsi un rôle prépondérant dans la défense de l'ovocyte contre la pénétration de plusieurs spermatozoïdes (polyspermie) (Coy et Aviles, 2010). Ce blocage n'est pas limité à la zone pellucide ; il intervient également au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte (Gayrard, 2007). La fécondation réussie conduit à la formation d'un zygote diploïde contenant le code génétique pour un nouvel individu. Le début du développement est étayé par un environnement nutritionnel adéquat au sein de l'oviducte.



**Figure 19. Rôles de l'hyperactivation induits par l'oviducte sur le sperme lors de l'approche de l'ovocyte: (a) détachement des spermatozoïdes des cellules épithéliales, (b) transport vers le lieu de la fécondation (c) traversée des cellules du cumulus, et (d) pénétration de la zone pellucide (Coy et al., 2012).**

### 1.1.3.2 Fécondation in vitro.

La première naissance d'un veau issu de fécondation in vitro (FIV) fut rapportée en 1981 aux Etats-Unis (Brackett et al., 1982). Cette technique est une partie du processus de la production in vitro d'embryons et consiste à féconder les ovocytes matures in vivo ou in vitro dans des boîtes de pétri avec des milieux spéciaux dans des incubateurs avec une atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> qui se rapproche des conditions de fécondation in vivo.

Les techniques utilisées pour la fécondation *in vitro* sont bien établies chez les bovins, ainsi que chez les petits ruminants (Mermillod et al., 2006). Les milieux utilisés pour la FIV sont du Tyrode dérivé salin supplémenté avec de la BSA, du lactate et pyruvate et d'un agent de capacitation (Parrish et al., 1986). De nombreux protocoles ont été éprouvés pour induire la capacitation des spermatozoïdes *in vitro*. Il a été démontré que la capacitation peut être induite par l'addition d'héparine dans les systèmes de FIV et que les concentrations doivent être ajustées pour avoir un taux optimal de blastocystes (Walters et al., 2004 ; Blondin et al., 2009 ; Parrish, 2014).

Le sperme congelé est utilisé généralement pour la FIV mais une étape de sélection est nécessaire pour enrichir la suspension de spermatozoïdes vivants et mobiles. Dans la méthode de swim-up, les spermatozoïdes sont déposés au fond d'un tube, la nature dense du sperme liée au milieu de conservation et du cryoprotecteur maintient le sperme dans un premier temps dans la partie inférieure. Après une période d'incubation, le sperme commence à migrer hors du milieu et du cryoprotecteur vers la partie supérieure du tube. Cette fraction récupérée correspond à la population du sperme mobile ou viable proche de 100% (Parrish et al., 2013). Une variante consiste à purifier les spermatozoïdes mobiles par centrifugation dans un gradient de densité discontinu (Percoll). La fraction des spermatozoïdes mobiles est recueillie au fond du tube après la centrifugation (Mermillod et al., 2006). Pour ces deux méthodes, la population de spermatozoïdes mobiles peut être facilement calculée pour ajuster une concentration spécifique de sperme dans le milieu de fécondation avec les ovocytes.

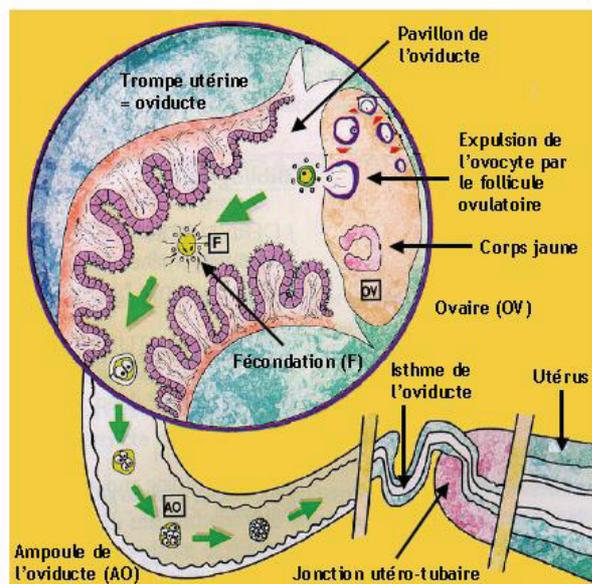
La concentration spermatique utilisée pour la fécondation *in vitro* varie entre 0,5 et  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes par ml dans le milieu de fécondation. Cette concentration doit être optimisée pour chaque mâle et même pour chaque éjaculat d'un mâle donné. Le taux de fécondation augmente avec la concentration des spermatozoïdes. Cependant, après une valeur donnée, une proportion croissante d'ovocytes devient polyspermiq. Pour une meilleure commodité, le sperme et les ovocytes sont habituellement co-incubés pendant 18 à 24 heures, bien que six heures d'incubation semblent être suffisantes pour atteindre le niveau de fécondation normal (Mermillod et al., 2006).

Un fort effet mâle influe sur le succès des taux de FIV (Blondin et al., 2009). Cet effet peut se traduire par des taux de segmentation différents (en lien avec une fécondance différente) ou des taux de développement variables, pour des mâles présentant des taux de

fécondations similaires mais une capacité hétérogène à promouvoir le développement jusqu'au stade blastocyste (Mermillod et al., 2006). Ces différences entre mâles peuvent être liées à leur capacité respective à réguler le métabolisme du glucose au cours de la phase G1 de l'état pronucléaire (Comizzoli et al., 2003) et par conséquent permettre l'apparition précoce de la phase S dans le zygote, se traduisant par un taux plus élevé de développement (Comizzoli et al., 2000). Dans le cas de collectes d'ovocytes par ovum pick up (OPU) chez des femelles de grande valeur génétique, les éjaculats de taureaux doivent être testés au préalable sur des ovocytes d'abattoir (Mermillod et al., 2006). Cependant dans la pratique, il n'est pas toujours possible de mettre en œuvre ces tests, compte tenu du changement fréquent des taureaux utilisés dans un programme commercial. Dans ce cas (aucun test préalable), il est malgré tout possible d'obtenir des taux de développement intéressants, proches de 50 % (Gamarra et al., 2014).

#### 1.1.4 Développement embryonnaire précoce.

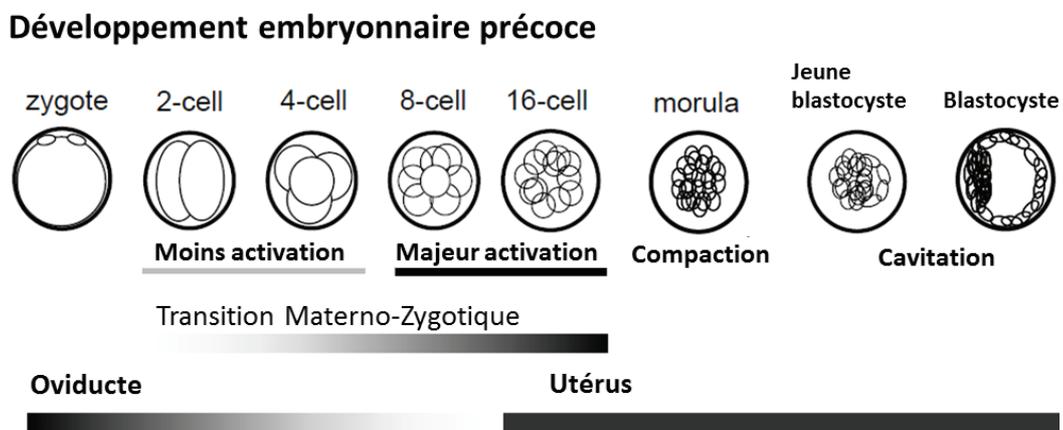
La fécondation, fusion des gamètes mâle et femelle, a lieu in vivo dans l'ampoule de la trompe utérine (Figure 20).



**Figure 20. Progression de l'embryon dans les voies génitales femelles après la fécondation** (Reproguide UNCEIA, 2013).

La pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde se fait environ 2 heures après l'ovulation. Le second globule polaire est expulsé à ce moment-là. Une trentaine d'heures

après la fécondation, il y a formation des 2 premiers blastomères. Cette étape est considérée comme critique pour le développement ultérieur de l'embryon (Poll, 2007). L'activation du génome embryonnaire se produit à un moment précis du développement embryonnaire, au stade 8-16 cellules chez la vache et marque le passage du contrôle maternel au contrôle embryonnaire du développement. Chez le jeune embryon, des produits issus de l'expression des gènes ovocytaires et des gènes embryonnaires (néo-synthèse de transcrits) coexistent. Tout retard à la mise en route de la lecture du génome embryonnaire met l'embryon en danger (Betteridge KJ et Fléchon, 1988 ; Dieleman et al., 2002 ; Figure 21).



**Figure 21. Schéma des stades du développement embryonnaire précoce produit dans l'oviducte et l'utérus.** Les transcriptions maternelles sont essentielles pour soutenir les premiers cycles cellulaires de l'embryon précoce jusqu'à une activation majeure du génome embryonnaire au cours du 4ème cycle cellulaire. Modifié depuis Knijn (2004) et Dieleman et al. (2002).

Pendant l'étape de segmentation de l'œuf (ou zygote), des mitoses répétées aboutissent à la formation des blastomères, cellules semblables et de plus en plus petites jusqu'au stade morula (Tableau 3). L'entrée dans l'utérus se fait au stade 16-32 cellules. Au stade morula (32-64 cellules), la compaction permet la liaison intime entre les blastomères, environ 4 à 5 jours après la fécondation. Puis des divisions différentielles et la polarisation des blastomères permettent la formation du blastocyste: les blastomères les plus périphériques forment le trophoctoderme (ou trophoblaste, qui a un rôle nourricier très important et qui va former le

placenta) et les plus internes forment la masse cellulaire interne (ou bouton embryonnaire) à l'origine de l'embryon/fœtus. Le blastocyste de 7-10 jours est sphérique et caractérisé par une cavité centrale : le blastocœle. Après l'éclosion (sortie de la zone pellucide 9 à 10 jours après l'ovulation), le blastocyste commence à s'allonger (élongation). Sa croissance est rapide et il envahit la cavité utérine. L'implantation dans l'utérus se produit vers le 19ème jour chez la vache (Lonergan et al., 2014 ; Tableau 3 ; Figure 21)

**Tableau 3.** Stades du développement embryonnaire de la fécondation à l'élongation du blastocyste (Reproguide UNCEIA, 2013).

| Jour * | Etape                       | Lieu                       | Description   |   |
|--------|-----------------------------|----------------------------|---|---|
| 1      | Fécondation                 | O<br>V<br>I<br>D           | La fécondation marque le début de la période embryonnaire. C'est l'ensemble des transformations qui se produisent dans l'œuf, suite à l'interaction et à la fusion des gamètes.   |    |
| 2 - 4  | Segmentation                | U<br>C<br>T<br>E           | La première étape du développement de l'œuf fécondé ou zygote est appelée segmentation et correspond à des divisions répétées, qui aboutissent à la formation de cellules semblables de plus en plus petites ou blastomères.  |    |
| 5      | Morula<br>(150 µm)          | U<br>T<br>E<br>R<br>U<br>S | L'étape de compaction, c'est-à-dire la liaison intime entre les cellules, survient au stade morula (32-64 cellules), environ 5 jours après les chaleurs. Pendant la compaction, la morphologie des blastomères évolue de façon différenciée pour aboutir à la formation du blastocyste.                                 |   |
| 7-8    | Blastocyste<br>(150-350 µm) |                            | Le blastocyste est défini par la présence d'une cavité centrale, le blastocœle, entouré par une couche de cellules appelée trophoblaste (futur placenta) et par un petit groupe de cellules formant le bouton embryonnaire (futur veau). Il est entouré de la zone pellucide, qui joue le rôle de barrière protectrice. |  |
| 9-10   | Éclosion<br>(400 µm > 2 cm) |                            | L'éclosion correspond à la perte de la zone pellucide par le blastocyste. Celle-ci s'amincit puis se rompt suite à l'expansion du blastocœle de l'embryon.  |  |
| 11     | Elongation                  |                            | A partir du 11 <sup>e</sup> jour, le blastocyste perd sa forme sphérique et s'allonge très rapidement: c'est l'élongation. Pendant cette période, il envahit progressivement la cavité utérine, qu'il occupe en totalité vers le 18 <sup>e</sup> jour. Il atteint alors 40 cm.  |  |

\* par rapport aux chaleurs

photos 1 à 5, UNCEIA et photo 6, INRA

Lors de sa descente vers l'utérus, l'embryon utilise la sécrétion tubaire comme source de nutriment. Elle permet le développement de l'œuf. Ce milieu est cependant peu favorable au développement prolongé de l'embryon puisque, si les œufs sont maintenus dans l'oviducte, ils dégénèrent (Picard-Hagen et al., 2001). Pendant cette phase de vie libre, un grand nombre de facteurs régulent le développement de l'embryon : des chemokines, des cytokines, des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques et des facteurs régulant l'apoptose (Kölle et al., 2010). Ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle du développement embryonnaire. Parmi les facteurs de croissances, peuvent être cités les IGF1 et 2, l'EGF, les TGFs, le PDGF et les

FGF (Kaye, 1997; Allan et al. 2001; Sinclair et al., 2003). Les concentrations en glucose, acides aminés, cations divalents et d'autres métabolites augmentent aussi dans la lumière utérine au cours de la gestation précoce (Bazer et al., 2008; Gao et al., 2009).

## **1.2 Utilisation des biotechnologies de la reproduction chez la vache : la collecte d'ovocytes par ovum pick up (OPU) et production d'embryons in vitro (PIV).**

Les biotechnologies de la reproduction permettent à l'éleveur d'améliorer le potentiel de reproduction des femelles tout en contribuant à améliorer l'efficacité des schémas de sélection. Ce dernier point est crucial pour mener à bien la sélection multi-caractères associant les caractères de production aux caractères dits fonctionnels inscrits dans le cadre de l'agriculture durable et du bien-être animal (fertilité, longévité, résistance aux maladies, qualités maternelles...).

Depuis 40 ans, plusieurs biotechnologies ont été développées aux côtés de l'insémination artificielle (IA), comme la transplantation embryonnaire conventionnelle (TE) et la production d'embryons par fécondation in vitro (FIV) et représentent des outils disponibles commercialement, utilisés chez les femelles de haute valeur génétique (Hasler, 2014). De plus, des technologies complémentaires comme le sexage de semence, sexage des embryons et la congélation des embryons réduisent les frais de gestion des receveuses et conservent pour un temps illimité le matériel génétique facilitant ainsi les échanges et la commercialisation (De Vries et al., 2008 ; Arruda et al., 2012 ; Hall et Glaze, 2013 ; Seidel et al., 2014).

Le transfert d'embryons est une méthode de reproduction qui consiste à faire naître par des femelles porteuses (receveuses) des veaux issus d'une même mère génétique appelée donneuse d'embryons. Les embryons transplantés peuvent être produits in vivo après superovulation de la femelle donneuse ou, in vitro après maturation, fécondation et culture in vitro (CIV) d'ovocytes. Utilisé à partir d'animaux génétiquement supérieurs, le transfert d'embryon permet d'accélérer le progrès génétique annuel en agissant sur quatre facteurs: l'intensité de la sélection, l'intervalle entre les générations, la pression de sélection et la précision de la valeur génétique des reproducteurs (Ponsart et al., 2004). Il est également le moyen le plus sécurisant sur le plan sanitaire et le plus économique pour les échanges commerciaux de génétique entre les troupeaux et les pays (Ponsart et Pozzi, 2013).

Pour la TE, l'augmentation du nombre de follicules pré-ovulatoires est obtenue par l'injection d'hormones gonadotropes de type FSH/LH d'origine porcine ou ovine pendant la phase lutéale, entre le 8ème et le 12ème jour du cycle (J0 = œstrus), ceci afin de se situer au moment du démarrage d'une vague de croissance folliculaire. La demi-vie très courte de cette hormone nécessite des injections biquotidiennes pendant 4 jours. Les doses dépendent des préparations commerciales et sont injectées à un rythme décroissant. L'utilisation concomitante de progestagènes permet de démarrer des traitements de superovulation, à tout moment du cycle oestral (Bo et al., 2008).

Au début des années 1990, l'introduction de la technique d'Ovum Pick-Up suivie par la production in vitro d'embryons (OPU-IVP) a ouvert de nouvelles possibilités pour optimiser la descendance des donneuses vivantes de haute valeur génétique. Couplée aux outils de sélection génomique, cette technique permet d'accélérer le progrès génétique, en diminuant l'intervalle de génération et en augmentant le nombre d'accouplements possibles pour une période donnée (Ponsart et al., 2004, 2013).

Le tableau 4 montre l'avantage de l'OPU-FIV par rapport à la production d'embryons in vivo pour une période de 60 jours. Quatre cycles d'OPU-FIV avec des donneuses superovulées peuvent être répétés dans le même intervalle de temps qu'une collecte. Par conséquent, les producteurs laitiers peuvent espérer avec l'utilisation de semence conventionnelle (non sexée) obtenir 5,2 fois plus d'embryons femelles (11,0 vs 2,1, respectivement) et 4,8 fois plus de femelles pour une durée de 60 jours (5,7 vs 1,2 respectivement) par OPU-FIV par rapport à la collecte d'embryons in vivo. En outre, avec l'utilisation de semence sexée, ils peuvent espérer 9,4 fois plus d'embryons femelles (19,8 vs 2,1 respectivement) et 7,9 fois plus de femelles après 60 jours de gestation (9,5 vs 1,2, respectivement) par OPU-FIV par rapport à la production in vivo (Blondin et al., 2012).

**Tableau 4 . Avantages de l'OPU-FIV sur la production d'embryon in vivo: comparaison d'une période de 60 jours (Adapté de Blondin et al., 2012).**

| Critères d'évaluation/semence    | In vitro    |              | In vivo (collecte) |
|----------------------------------|-------------|--------------|--------------------|
|                                  | Non sexée   | Sexée        | Non sexée          |
| OPU ou Flushing                  | 4           | 4            | 1                  |
| Ovocytes                         | 41,6        | 41,6         | 7,3                |
| Embryons viables                 | 23,3        | 20,4         | 4,3                |
| Embryons femelles                | 11          | 19,8         | 2,1                |
| Gestation (jour 30)-veau femelle | 6,3 (57,0%) | 11,1 (56,0%) | 1,3 (61,0%)        |
| Gestation (jour 60)-veau femelle | 5,7 (52,0%) | 9,5 (48,0%)  | 1,2 (59,4%)        |

Taux moyens estimés sur la base de 895 séances d'OPU de 275 génisses ou vaches de race Holstein superovulées

Par conséquent, cette technique est utilisée de façon croissante au niveau mondial depuis une dizaine d'année par les entreprises de sélection, mais aussi par les instituts de recherche, sachant qu'elle peut constituer un modèle expérimental de choix pour de nombreux travaux de recherche. En effet, la technique OPU-FIV permet d'accéder aux différents stades du développement précoce de l'embryon, de façon non invasive, et facilite le suivi longitudinal des femelles lors de protocoles expérimentaux, puisque les collectes répétées sont possibles, sans impact sur le bien-être des femelles et le succès des productions d'embryons (Chastant-Maillard et al., 2005). Une limite importante des embryons issus de culture in vitro reste leur sensibilité aux techniques de cryoconservation. En effet, les conditions de culture in vitro induisent des déviations morphologiques, métaboliques ou génétiques qui affectent la cryo-résistance des embryons. Les statistiques au niveau mondial montrent que environ 50% des embryons in vivo sont transférés après congélation-décongélation, alors que 90% des embryons in vitro sont transférés en frais compte tenu de leur faible cryotolérance (Stroud, 2011).

### 1.2.1 Préparation des donneuses d'ovocytes.

Les caractéristiques des femelles donneuses d'ovocytes (race, âge, statut physiologique, alimentation) et leur préparation influencent les résultats obtenus (Tableau 5) : en particulier,

les vaches de races Zébu ou croisées Zébu-Holstein produisent plus d'ovocytes et d'embryons que les vaches de race Holstein (Pontes et al., 2010).

De plus, il est possible de regrouper les donneuses par catégories de population folliculaire : les nombres d'ovocytes collectés et d'embryons produits par OPU-FIV sont en relation avec la réserve folliculaire de départ. Cette réserve peut être estimée par le nombre de follicules compté quelques jours avant le début de la stimulation hormonale (Monniaux et al., 1983). Ainsi, les donneuses ayant une population folliculaire plus élevée donnent plus d'ovocytes et d'embryons. Cependant il n'y a pas de différences significatives entre ces différentes catégories de vaches et l'aptitude au développement : les taux de production d'embryons ne varient pas systématiquement avec les ovocytes mis en fécondation (Pontes et al., 2011 ; Durocher et al., 2006 ; Tableau 5).

Les donneuses sont préparées avec différents protocoles, avec ou sans stimulation de la croissance folliculaire (Knijn et al., 2012, Tableau 6). L'augmentation du nombre de follicules peut être obtenue par l'injection d'hormones gonadotropes de type FSH/LH d'origine porcine ou ovine. La demi-vie très courte de cette hormone nécessite des injections biquotidiennes pendant 2 à 3 jours. Les résultats d'une étude rétrospective indiquent que le traitement de stimulation de la croissance folliculaire augmente d'une manière significative les nombres de follicules ponctionnés et d'ovocytes collectés. Une comparaison entre la production d'embryons par OPU-FIV à partir d'ovaires sans stimulation de la croissance folliculaire (4 sessions par quinzaine vs. 1 session bimensuelle après stimulation de la croissance folliculaire) n'a pas mis en évidence de différence sur les nombres d'embryons produits indiquant que la stimulation FSH/LH précédant une OPU pourrait avoir un effet positif sur la compétence des ovocytes in vitro avec une augmentation des rendements (Roover et al., 2007). Des résultats récents confirment ces observations, puisque les donneuses traitées avec FSH ont présenté une plus grande proportion de follicules de taille moyenne, une meilleure proportion de COCs récupérés, un taux plus élevé d'embryons produits par session d'OPU et un meilleur taux de blastocystes que les donneuses non superovulées (Viera et al., 2014, Tableau 5).

**Tableau 5. Résultats d'OPU-FIV en bovins : collecte d'ovocytes, production d'embryons et taux de gestation. (Mean ± S.E.M.).**

| Donneuses               | n   | Catégorie         | Traitement<br>SO | Type de<br>Semence | Nombre<br>OPU | Total<br>oocytes/<br>OPU | Oocytes<br>viables/<br>OPU | %Embryons/total<br>Ovocytes viables | Embryons/<br>OPU-IVP     | Taux de<br>Gestation<br>(%) | Référence                     |
|-------------------------|-----|-------------------|------------------|--------------------|---------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Holstein                | 12  | HFC               | S <sup>2</sup>   | NS                 | 67            | 15,7 ± 7,1 <sup>a</sup>  |                            | 54±24                               | 8,4 ± 5,5 <sup>a</sup>   |                             | Durocher et al.<br>(2006)     |
| Holstein                | 11  | MFC               | S <sup>2</sup>   | NS                 | 86            | 10,2 ± 4,0 <sup>b</sup>  |                            | 53±24                               | 5,2 ± 3,5 <sup>b</sup>   |                             |                               |
| Holstein                | 8   | BFC               | S <sup>2</sup>   | NS                 | 49            | 5,7 ± 3,2 <sup>c</sup>   |                            | 47±25                               | 2,7 ± 2,2 <sup>c</sup>   |                             |                               |
| Montbéliard             | 249 |                   | S <sup>1</sup>   | NS                 | 249           | 12,9 ± 8,9               | 10,3 ± 7,6                 | 34,2                                | 2,9 ± 2,6                | 50                          | Guyader-Joly et al.<br>(2010) |
| Holstein                | 132 |                   | S <sup>1</sup>   | NS                 | 132           | 13,9 ± 6,9               | 10,5 ± 5,3                 | 32,9                                | 2,8 ± 2,4                | 51                          |                               |
| Gir                     | 617 |                   | Non              | S                  | 3778          | 17,1 ± 4,5 <sup>a</sup>  | 12,1 ± 3,9 <sup>a</sup>    | 26,0                                | 3,2 <sup>a</sup>         | 40                          | Pontes et al. (2010)          |
| Holstein                | 180 |                   | Non              | S                  | 1138          | 11,4 ± 3,9 <sup>b</sup>  | 8,0 ± 2,7 <sup>b</sup>     | 26,3                                | 2,1 <sup>b</sup>         | 36                          |                               |
| ¼ Holstein ¾ Gir        | 44  |                   | Non              | S                  | 267           | 20,4 ± 5,8 <sup>c</sup>  | 16,8 ± 5,0 <sup>c</sup>    | 23,2                                | 3,9 <sup>ac</sup>        | 37                          |                               |
| Vaches ½ Holstein ½ Gir | 37  |                   | Non              | S                  | 224           | 31,4 ± 5,6 <sup>d</sup>  | 24,3 ± 4,7 <sup>d</sup>    | 22,6                                | 5,5 <sup>c</sup>         | 37                          |                               |
| Nelore                  | 78  | VHFC              | Non              | NS                 |               | 58,94 ± 2,0              | 47,6 ± 1,6 <sup>a</sup>    | 31,6                                | 15,06 ± 0,9 <sup>a</sup> | 37                          | Pontes et al. (2011)          |
| Nelore                  | 80  | HFC               | Non              | NS                 |               | 32,61 ± 0,5              | 25,0 ± 0,3 <sup>b</sup>    | 36,8                                | 9,17 ± 0,6 <sup>b</sup>  | 37                          |                               |
| Nelore                  | 79  | MFC               | Non              | NS                 |               | 22,13 ± 0,5              | 15,6 ± 0,26 <sup>c</sup>   | 38,5                                | 6,00 ± 0,4 <sup>c</sup>  | 39                          |                               |
| Nelore                  | 80  | LFC               | Non              | NS                 |               | 10,26 ± 0,6              | 6,3 ± 0,38 <sup>d</sup>    | 38,4                                | 2,42 ± 0,3 <sup>d</sup>  | 38                          |                               |
| Nelore (Total)          | 317 |                   | Non              | NS                 | 656           | 30,84 ± 0,9              | 23,4 ± 0,7                 | 34,8                                | 8,13 ± 0,3               | 35                          |                               |
| Holstein                | 9   | DFA <sup>4</sup>  | S <sup>4</sup>   | S                  |               |                          | 12,4 ± 2,3                 | 54,9 ± 7,5 <sup>a</sup>             | 4,1 ± 1,0 <sup>6a</sup>  |                             | Matoba et al.<br>(2013)       |
| Holstein                | 9   | GnRH <sup>5</sup> | S <sup>5</sup>   | S                  |               |                          | 14,7 ± 3,6                 | 21,5 ± 11,8 <sup>b</sup>            | 0,9 ± 0,2 <sup>6b</sup>  |                             |                               |
| Holstein                | 6   |                   | Non              | S                  |               |                          | 13,8 ± 2,7                 | 36,1 ± 14,9                         | 1,5 ± 0,4 <sup>6</sup>   |                             |                               |
| Holstein (control)*     | 15  | L                 | Non              | NS                 |               | 13,0 ± 1,7               | 10,0 ± 1,3                 | 10,8 <sup>a</sup>                   | 1,0 ± 0,4 <sup>a</sup>   |                             | Viera et al. (2014)           |
| Holstein                | 15  | NL                | S <sup>3</sup>   | NS                 |               | 10,7 ± 1,5               | 8,9 ± 1,3                  | 17,3 <sup>b</sup>                   | 1,5 ± 0,5 <sup>b</sup>   |                             |                               |
| Holstein (control)*     | 15  | L                 | non              | NS                 |               | 10,9 ± 1,6               | 8,5 ± 1,4                  | 31,3 <sup>c</sup>                   | 2,7 ± 0,6 <sup>c</sup>   |                             |                               |
| Holstein                | 15  | NL                | S <sup>3</sup>   | NS                 |               | 9,9 ± 1,5                | 8,3 ± 1,3                  | 52,8 <sup>d</sup>                   | 4,4 ± 0,8 <sup>d</sup>   |                             |                               |

Valeurs avec des lettres différentes (a, b, c, d) dans la colonne et référence différent significativement ; S: semence sexée, NS: semence non sexée ; S: avec traitement superovulation ; N: sans traitement de superovulation ; LFC: Population basse de follicules; MFC: Population moyenne de follicules; HFC: Population Haute de follicules; VHFC: Population très haute de follicules ; L: Lactate; NL: Non lactate.

\* Les 15 vaches ont été leur propre témoin.

<sup>1</sup> Donneuses superovulées avec FSH (Stimufol®) répartie en 5 doses décroissantes sur 2.5 jours, la 1<sup>o</sup> FSH administrée le jour 12 du cycle œstral après synchronisation. Les OPU ont été réalisés 12 h après la dernière FSH.

<sup>2</sup> 36 heures après l'ablation du follicule dominant 4 traitements de superovulation ont été réalisés avec Follitropin® ou Ovagen®, les OPU ont été faites 40 heures après la dernière FSH (période de coasting) ou 28 heures après la dernière FSH.

<sup>3</sup> Superovulation avec 200 mg NIH-FSH-P1 (Follitropin®) répartis en 4 doses décroissantes (57, 57, 43, et 43 mg, chaque 12 heures) le jour 4 et 5 (jour 0 : insertion de CIDR). Le jour 7 retrait de CIDR et OPU (40 heures après la dernière FSH, période de "coasting").

<sup>4</sup> DFA : Ablation du follicule dominant le jour 5 (jour 0 insertion de CIDR), le jour 6 soir administration de 30 unités Armour (AU) de FSH (Antrin R10; Kyoritsu Seiyaku Co) 2 fois par jour avec des doses décroissantes (6, 6, 4, 4, 3,3, 2, et 2 AU) jusqu'au jour 10 matin, le retrait du CIDR a été effectué le jour 9 matin et GnRH a été administré le jour 10 matin, l'OPU a été réalisé le jour 11 (25 heures après GnRH), les ovocytes ont été mis en maturation pendant 3 heures avant la FIV. <sup>5</sup> GnRH : protocole similaire au N°4 mais avec 100 ug de GnRH pour induire l'ovulation du follicule dominant. <sup>6</sup> Embryons de qualité 1 (code 1 IETS) produits jusqu'au jour 9.

**Tableau 6 . Tableau récapitulatif du Workshop réalisé à l’AETE 2012 sur l’utilisation ou non des traitements de stimulation de la croissance folliculaire par différents équipes d’Europe (Knijn et al., 2012).**

| <b>Equipes d’OPU-PIV</b> | <b>Traitement avant OPU</b>                                      | <b>Hormone et doses</b> | <b>Fréquence d’OPU</b>                      |
|--------------------------|--|-------------------------|---|
| Italie                   | Aucun  | NA                      | 2 fois par semaine ou 1 fois par semaine    |
| Hollande                 | Aucun (sauf quand il y a de très basse production)               | Folltropin              | 2 fois par semaine ou 1 fois par semaine    |
| France (UNCEIA)          | Stimulation de la croissance folliculaire, 5 doses décroissantes | Stimufol                | 1 fois par semaine ou toutes les 2 semaines |
| France (MIDATEST)        | stimulation de la croissance folliculaire, 5 doses décroissantes | Stimufol                |   |
| France (Evolution)       | stimulation de la croissance folliculaire, 6 doses décroissantes | Stimufol et Pluset      |   |
| Allemagne                | Aucune   | NA                      | 1 fois par semaine ou toutes les 2 semaines |

En outre, ponctionner le follicule dominant (ou les follicules > 8 mm) 36 à 48 heures avant le début du traitement de stimulation de la croissance folliculaire (5 ou 6 injections de FSH à 12 heures d’intervalle en phase lutéale) permet d’initier une nouvelle vague de croissance folliculaire et d’améliorer les nombres d’ovocytes collectés (Matoba et al., 2013). Collecter les ovocytes à l’issue d’une période d’attente de 44 h ou « coasting » est une autre piste qui pourrait augmenter les nombres d’ovocytes collectés et les taux de développement embryonnaire (Nivet et al., 2012).

Enfin, la collecte d’ovocytes maturés in vivo reste une possibilité pour augmenter la compétence de développement des ovocytes par rapport à la maturation in vitro (Hendriksen et al, 2000 ; Rizos et al., 2002a ; Humblot et al., 2005). Les ovocytes maturés in vitro sont généralement aspirés à partir de follicules de 2 à 6 mm de diamètre à des stades inconnus du cycle ou de la vague folliculaire (Imai et al., 2002 et 2006). En adaptant le protocole de stimulation, il est possible de collecter des ovocytes maturés in vivo 20 heures après une injection de GnRH (induction d’un pic de LH). Ces ovocytes ont un taux supérieur de production

de blastocystes par rapport à ceux récupérés au moment du pic pré-ovulatoire et maturés in vitro (58,2 vs 39,2%, respectivement ; Rizos et al., 2002a).

Il est également possible de combiner différents aspects, comme la maturation in vivo des ovocytes et l'ablation du follicule dominant. Matoba et al. (2013) ont obtenu un taux plus élevé de blastocystes et une meilleure qualité embryonnaire (après fécondation avec la semence sexée) en comparant l'utilisation de GnRH pour synchroniser la vague folliculaire et l'élimination du follicule dominant (Matoba et al., 2013; Tableau 5).

### **1.2.2 Impact du système de culture sur la production d'embryons.**

De très nombreux auteurs ont testé l'ajout de différents composants aux milieux de maturation : EGF, cystéamine, FGF, IGF, ITS (l'insuline, sélénite transferrine de sodium) (Galli et al., 2001 ; Nedambale et al., 2004 ; Deleuze et Goudet, 2010 ; Merton et al., 2013). En particulier, l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphodiesterase (PDE), enzyme qui dégrade l'AMP cyclique (AMPC) a conduit récemment à améliorer significativement les rendements. En effet, l'AMPC permet de bloquer in vivo la reprise de méiose, qui se déclenche précocement, dès la ponction de l'ovocyte in vitro. (Albuz et al., 2010). Toutefois, peu d'auteurs ont réussi à reproduire les résultats, du fait d'une grande variabilité entre les lots. Malgré les nombreux essais publiés, cette étape reste un facteur limitant de l'efficacité de la production in vitro.

De même, de nombreux travaux de recherche ont visé à optimiser les milieux de culture. Il existe différents systèmes disponibles pour culture in vitro de zygotes. Celles-ci comprennent la co-culture avec différents types de cellules tels que des cellules épithéliales bovines de l'oviducte (BOEC) (Eyestone et Firts, 1989), des cellules du cumulus ou vésicules trophoblastiques, des lignées cellulaires de foie (Buffalo rat liver) (BRL) (Rehman et al., 1994) ou des cellules Vero etc. De nos jours la tendance a changé vers l'utilisation des milieux chimiquement définis comme les milieux SOF, CR1a, Chatot Ziomek Bavister milieu (CZB, Chatot et al., 1989 ; Suthar et Shah, 2009) Ces milieux nécessitent généralement un taux O<sub>2</sub> faible (5%) le taux de rendement en blastocyste est plus élevé par rapport à 20 % d'O<sub>2</sub> (Gutierrez-Adan et al., 2001).

Récemment, des milieux séquentiels ont été proposés, avec l'objectif de « mimer » les évolutions de l'environnement tubaire au cours du développement embryonnaire. En particulier, l'ajout de CSF-2 dans les milieux de culture, 5 jours après insémination a des effets favorables sur le développement embryonnaire (Block et al., 2011 ; Loureiro et al., 2011). Les

consommables et modalités pratiques de culture (volumes utilisés, présence ou non d'huile, type de boîtes de pétri, micro-gouttes) sont autant de facteurs influençant les résultats (Smith et al., 2012). Enfin, la filtration de l'air des étuves pourrait également impacter la qualité des embryons produits (Merton et al., 2007).

Les taux de développement dépendent de la composition des milieux utilisés. Une difficulté liée à l'amélioration des milieux de culture réside dans le fait que les différents composants interagissent entre eux : lorsqu'on conduit une expérimentation comparant deux milieux, il est nécessaire d'étudier les modifications des composants un à un. Tester les modifications des milieux nécessite de multiplier les comparaisons et reste un travail de longue haleine, nécessitant de réaliser de nombreuses sessions à partir d'ovocytes d'abattoir. En outre, les ovocytes issus d'OPU se comportent différemment et peuvent conduire à des résultats différents (Merton et al., 2013).

La qualité des embryons produits in vitro est un élément majeur pour les perspectives d'amélioration de la technique, ce qui facilitera leur cryopréservation et l'utilisation de ces embryons dans le cadre des échanges internationaux (Matoba et al., 2013).

## **2. Indicateurs du métabolisme énergétique chez la vache : interactions avec la croissance folliculaire et le développement embryonnaire précoce.**

### **2.1 Bilan énergétique, poids vif et état corporel.**

Des évaluations précises du bilan énergétique des vaches laitières sont d'une grande importance pour la gestion de la performance, de la santé et de la reproduction. Le bilan énergétique est généralement calculé comme la différence entre les entrées d'énergie et les dépenses en énergie. Cependant, l'estimation de ce bilan nécessite la mesure des apports alimentaires et des sources d'énergies sortantes (énergie utilisée pour le lait, entretien, croissance et gestation). En dehors de la production laitière, les autres valeurs sont difficiles à mesurer en pratique et les évaluations comportent des sources d'erreurs importantes (Ellis et al., 2006). Ceci réduit considérablement l'utilisation du bilan énergétique en exploitation.

Une alternative consiste à estimer le bilan énergétique à partir des changements des réserves corporelles, qui comportent des mesures de poids vif (PV) et de note d'état corporel (NEC ; Coffey et al., 2001 ; Tedeschi et al., 2006 ; Friggens et al., 2007).

La NEC est considérée comme un outil simple et pratique, permettant d'évaluer à la fois le statut énergétique et la réserve de graisse corporelle d'un animal vivant via une évaluation visuelle et tactile (Murray, 1919 ; Edmonson et al., 1989). Le principe général est le suivant : une diminution des valeurs reflètent l'amaigrissement et une augmentation un engraissement (Roche et al., 2009). Plusieurs grilles de notation ont été proposées: une note de 0 à 5) points d'échelles (Lowman et al., 1973), de 1 à 5 (Wildman et al., 1982 ; Edmonson et al., 1989), de 1 à 6 (Mulvaney, 1977), de 1 à 8 (Earle, 1976) et de 1 à 10 (Roche et al., 2004). Dans la notation visuelle française, l'échelle des notes varie de 0 (vache très maigre) à 5 (vache très grasse) avec des quarts ou des moitiés de points autorisés selon l'échelle utilisée (Bazin, 1984). Elle s'obtient en faisant la moyenne d'une note arrière et d'une note latérale issues des observations de différentes zones morphologiques de l'animal en comparaison à une grille standard. Les trois grandes races laitières, Holstein (Bazin, 1984), Montbéliarde (Bazin, 1989) et Normande (Brunschwig et al., 1995) ont une grille de notation spécifique.

L'ingestion de matière sèche est le facteur le plus important déterminant l'évolution de la NEC, mais les régimes de pré-vêlage et de post-partum influencent également la vitesse et l'ampleur de la mobilisation des tissus (Hayirli et al., 2002 ; Wathes et al., 2007a). Les vaches qui sont en bon état voire grasses ( $NEC \geq 3,5$  sur une échelle de 1-5) avant le vêlage présentent

une réduction de l'appétit qui se traduit par une perte rapide d'état corporel après le vêlage. A l'inverse, les vaches qui sont maigres (NEC= 2,5) peuvent rester par la suite dans cet état, avec une perte d'état corporel plus limitée, voire inexistante. Les deux scénarios sont connus pour affecter la fertilité (Wathes et al., 2013).

La production de lait et les adaptations nutritionnelles requises post-partum induisent un état physiologique de bilan énergétique négatif (BEN) chez la vache (Esposito et al., 2014). Ce bilan énergétique négatif en début de lactation est associé à des troubles métaboliques tels que la stéatose hépatique, la cétose (Grummer, 1993), l'hypoglycémie et l'hypocalcémie (Aktas, 2011) et l'acidose ruminale quand les éleveurs essayent de rattraper le BEN en utilisant beaucoup de concentrés dans la ration (Owens et al., 1998). Le risque de développement de ces troubles métaboliques dans la période post-partum ( $60 \pm 10$  jours après le vêlage) est plus élevé chez les vaches ayant une NEC légèrement supérieur ( $2,81 \pm 0,05$  unités) que chez les animaux plus maigres ( $2,29 \pm 0,04$  unités ; Aktas, 2011).

Les métabolites et hormones métaboliques sont reconnus comme étant des signaux pouvant témoigner des interactions entre le bilan énergétique négatif et les troubles métaboliques chez les vaches laitières.

Les variations des apports, du bilan énergétique et de l'état corporel au cours de la lactation sont illustrées dans la figure 22.

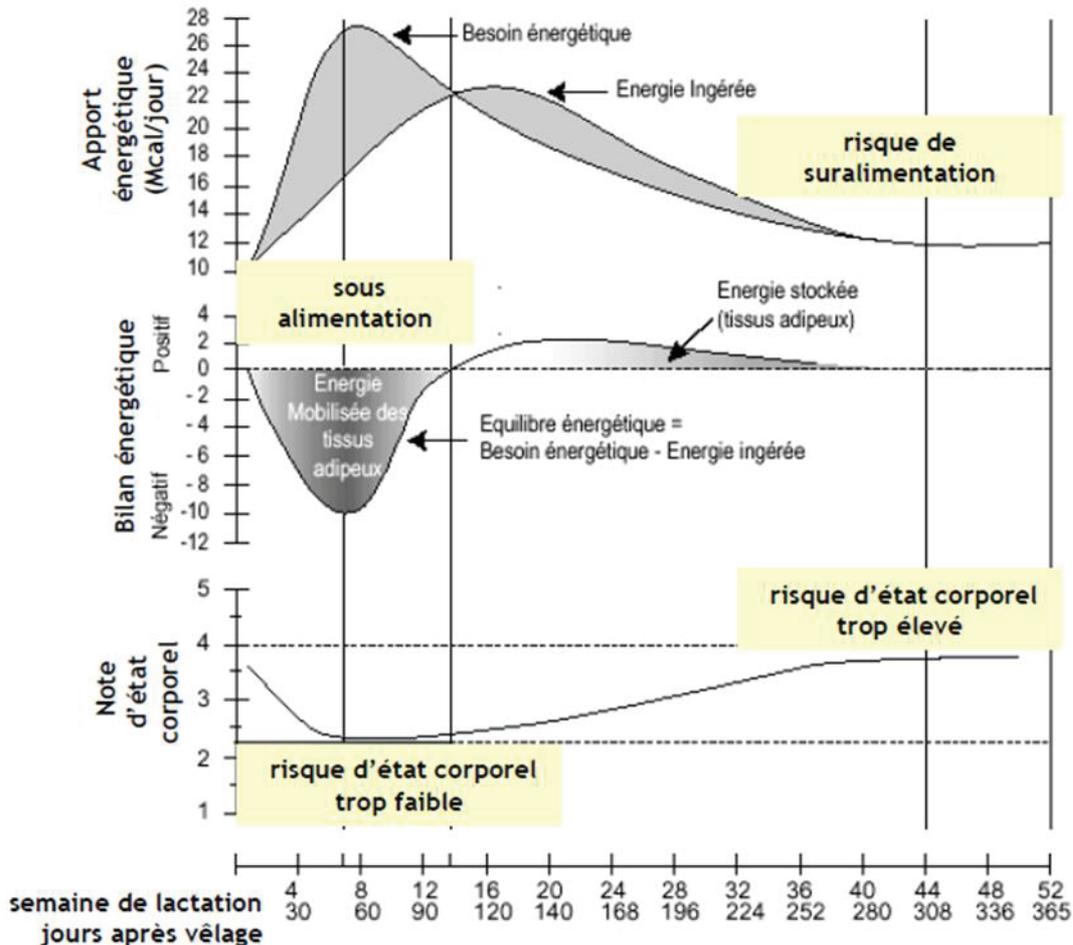


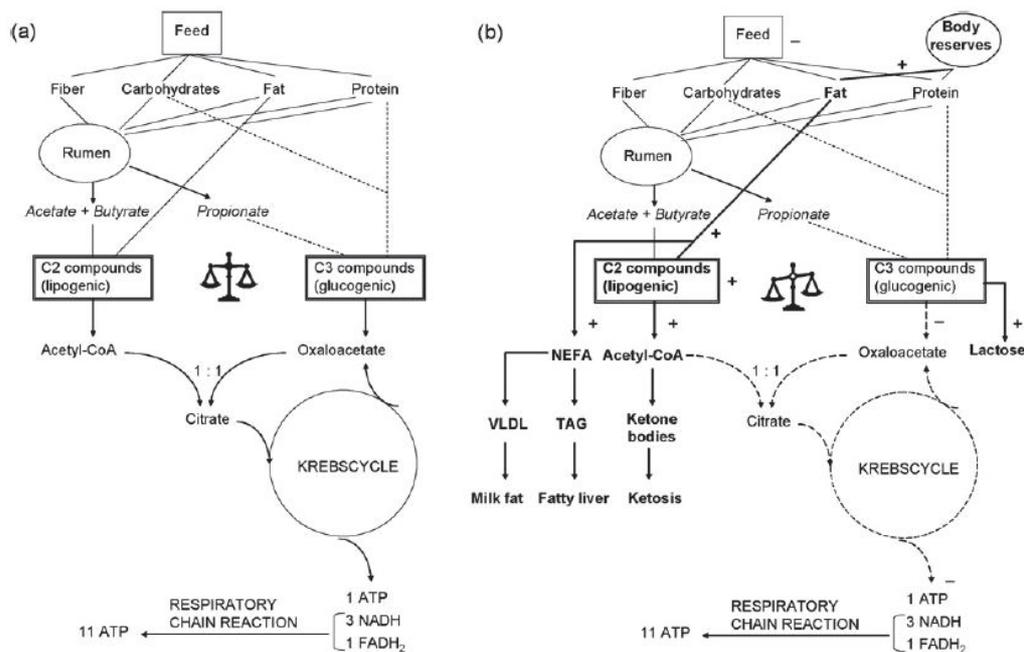
Figure 22. Evolution des apports énergétiques, du bilan énergétique et de la note d'état corporel au cours de la lactation chez la vache laitière (Wattiaux, 1999, modifiée par Fréret, 2007).

## 2.2 Métabolites sanguins et hormones métaboliques.

L'évolution des concentrations plasmatiques d'un certain nombre de paramètres métaboliques et hormonaux au cours de la croissance ou du post-partum constitue une méthode alternative pour suivre le bilan énergétique et les réserves corporelles après vêlage, notamment pour calculer le déficit énergétique post-partum. A la différence des vaches taries, les vaches en début de lactation ont une capacité d'ingestion restreinte par rapport aux besoins et sont en déficit énergétique (Van Knegsel et al., 2005). La Figure 23a illustre la voie de substrats utilisés pour le métabolisme énergétique chez les vaches en dehors de la période de lactation. Les sources principales de glucides sont les fibres, l'amidon et les sucres solubles. Les sources de glucides de la ration alimentaire se transforment en acides gras volatiles grâce à la fermentation

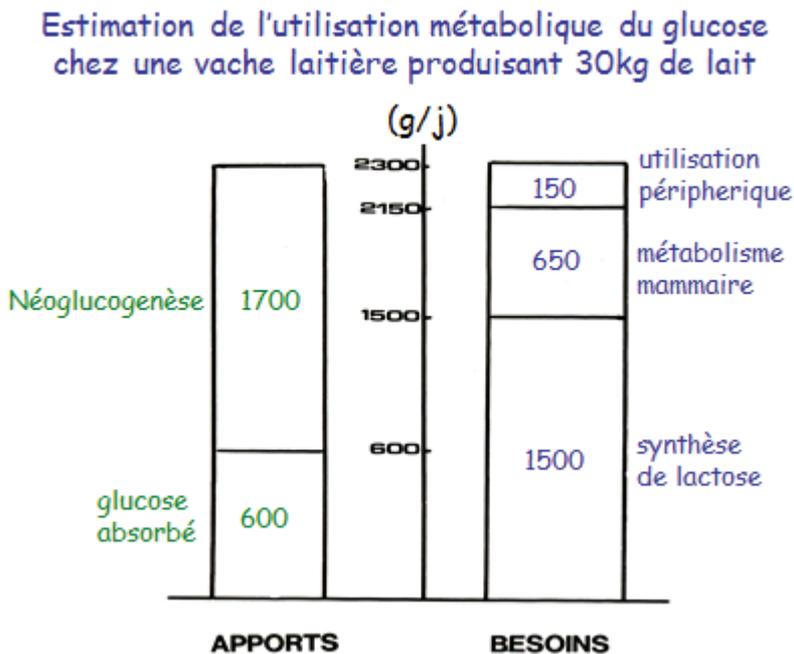
ruminale. Les principaux acides gras volatiles produits sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Les composantes de la ration alimentaire qui ne sont pas dégradées par la flore microbienne dans le rumen sont digérées en partie et absorbées par l'intestin afin de fournir des éléments nutritifs lipogéniques ou glycogéniques, comme l'amidon résistant, des protéines résistantes et des acides gras à chaînes longues. L'acétate et le butyrate sont des composés à nombre pair de carbones et sont considérés comme des nutriments lipogéniques. Le propionate est un composé à trois carbones et est considéré comme un nutriment glycogénique. Il est la principale source indirecte de glucose de la ration alimentaire. Le propionate peut aussi se transformer en oxaloacétate. L'acétylcoenzyme A, un composé lipogénique et l'oxaloacétate, un composé glycogénique se transforment en citrate. Le citrate entre dans le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP pour l'organisme (Van Knegsel et al., 2005). Le cycle de Krebs est la voie métabolique la plus efficace pour produire de l'énergie et permet en outre de fournir le substrat nécessaire à la néoglucogenèse.

De plus, dans le cas des vaches laitières en début de lactation, la mobilisation des réserves corporelles se fait principalement à partir des réserves de graisses (Figure 23b). D'une part, la mobilisation de la graisse du corps augmente la concentration sanguine en acides gras non estérifiés (AGNE), qui peuvent être oxydés en acétyl-CoA ou stockés dans le foie comme triglycérides. D'autre part, la production d'acétyl-CoA à partir de l'acétate et du butyrate (issu de la digestion des nutriments dans le rumen) et des acides gras (issus des réserves corporelles) est élevée, alors que dans le même temps la production d'oxaloacétate est réduite du fait de la déviation des composés en C3 issus de la dégradation du glucose et des précurseurs de la glycogenèse vers la production de lactose. En effet, la forte production lactée de début de lactation nécessite une importante production de lactose engendrant une diminution de la concentration sanguine de glucose et comme conséquence une diminution aussi d'insuline (Van Knegsel et al., 2005). Relativement peu de glucose est absorbé directement de la ration car la majorité de l'amidon de la ration, qui est formé de molécules de glucose, est fermenté dans le rumen pour donner majoritairement du propionate (Figure 24 ; Paragon, communication personnelle).



**Figure 23. Métabolisme énergétique chez des vaches n'étant pas en lactation (a) et chez des vaches en lactation (b) avec un bilan énergétique négatif entraînant une mobilisation des réserves corporelles. NEFA= non-esterified fatty acids (AGNE), TAG = triacylglycerids (triglycérides, forme de stockage des acides gras), VDL = very low density lipoproteins (forme de transport des acides gras) (Van Knegsel et al., 2005).**

Par conséquent, le ratio oxaloacétate / acétyl-CoA est déséquilibré en faveur de l'acétyl-CoA. La disponibilité en citrate (produit de l'oxydation d'un acétyl-CoA avec un oxaloacétate, à l'origine de la formation d'ATP du cycle de Krebs) diminue. L'excédent de l'acétyl-CoA est dévié vers la production de corps cétoniques : l'acétone, l'acétoacétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), ce qui peut entraîner un état de cétose (Van Knegsel, 2005).



**Figure 24.** Estimation de l'utilisation métabolique du glucose chez la vache laitière produisant 30 kg de lait (Paragon, communication personnelle).

Dans le cas d'apports insuffisants de composés glucogéniques et de glucose, une augmentation du catabolisme des acides aminés stockés dans le muscle squelettique et les autres tissus représente une source alternative de précurseurs de glucose. Le catabolisme des acides aminés induit également la production d'urée (Bell, 1995). Dans les conditions normales, l'ammoniac est le résultat de la dégradation ruminale de l'azote. L'ammoniac est ensuite utilisé par les micro-organismes pour la synthèse de protéines microbiennes cependant une partie n'est pas fixée par les microbes et il est transformé, après absorption, en urée dans le foie. L'accumulation de triglycérides dans le foie (conséquence de la mobilisation des réserves graisseuses) entraîne l'augmentation de la concentration plasmatique en ammoniac du fait de l'inhibition de la transformation en l'urée (Zhu et al., 2000). La production d'urée requiert énormément d'énergie à l'organisme et accentue le déficit énergétique. De plus, un excès d'ammonium peut causer une hyperglycémie, une hyperkaliémie et une acidose métabolique (Kitamura et al., 2003).

De faibles concentrations d'insuline dans le sang chez les animaux en déficit énergétique sont responsables de la faible production d'IGF1 par le foie (Butler et al., 2003a,b). Une diminution des concentrations d'insuline et d'IGF1 augmente les concentrations de l'hormone de croissance (GH). Les fortes concentrations en GH induisent un état catabolique généralisé qui se traduit par la perte de poids et d'état corporel (Lucy, 2003). Chez l'animal en croissance, en milieu ou en fin de lactation, la GH entraîne une sécrétion d'IGF1 au niveau du foie. En début de lactation, la concentration plasmatique de GH est élevée, mais celle d'IGF1 reste faible en raison d'une diminution du nombre de récepteurs à la GH dans le foie (Vandehaar et al., 1995) car le nombre de récepteurs à la GH est corrélé positivement avec le taux d'insuline (Rhoads et al., 2004), or, pendant la période post-partum, les concentrations en insuline sont faibles. Les taux plasmatiques d'IGF1 et d'insuline diminuent après le vêlage et remontent progressivement jusqu'au moment où le bilan énergétique redevient positif (Esposito et al., 2014).

La leptine est une hormone essentiellement produite par le tissu adipeux, qui régule l'appétit et les réserves lipidiques dans l'organisme. Ses actions principales sont de contrôler la prise alimentaire grâce à son action sur l'hypothalamus et induire une mobilisation des lipides. Chez les multipares, les concentrations en leptine avant vêlage sont corrélées positivement avec l'état corporel. Les concentrations de leptine diminuent après le vêlage et restent faibles, même lorsque le bilan énergétique s'améliore (Ingvarsen et Boisclair, 2001 ; Wathes et al., 2007a). L'hypoleptinémie peut contribuer à la résistance à l'insuline chez les ruminants en période péri-partum (Ingvarsen & Boisclair, 2001). La Figure 25 présente l'évolution des concentrations post-partum du glucose, de l'insuline, de l'IGF1, de l'urée, des AGNE et du BHB. Les concentrations en glucose, insuline, IGF1 et urée augmentent avec le temps post-partum et les concentrations en AGNE et BHB diminuent (Grimard et al., 2013).

## Indicateurs du métabolisme énergétique chez la vache : interactions avec la croissance folliculaire et le développement embryonnaire précoce

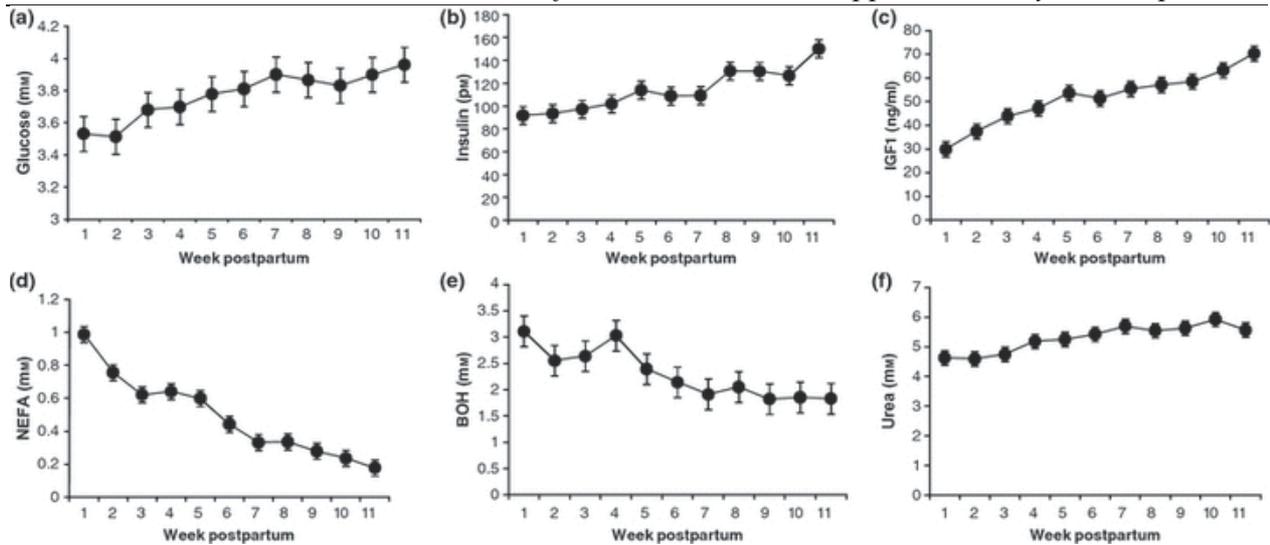


Figure 25. Evolution des concentrations des métabolites et hormones au cours du postpartum, 32 vaches laitières Holstein. (a) glucose, (b) insuline, (c) IGF1, (d) AGNE, (e) BHB, (f) Urée (Grimard et al., 2013).

### 2.3 Les effets du métabolisme énergétique sur la croissance folliculaire et développement embryonnaire précoce.

De nombreuses études ont montré que le bilan énergétique négatif agit par l'intermédiaire d'une combinaison de plusieurs signaux métaboliques : de faibles concentrations de glucose, de l'insuline et d'IGF1 et de façon concomitante, des concentrations élevées d'AGNE, de  $\beta$ -hydroxybutyrate, ainsi que l'accumulation de triglycérides au niveau du foie peuvent affecter la fertilité. Les vaches avec un bilan énergétique négatif sévère montrent un intervalle plus long entre le vêlage et le début de la cyclicité ovarienne par rapport aux vaches présentant un bilan énergétique équilibré (Butler et al., 1981 ; Opsomer et al., 2000 ; Wathes et al., 2007b). Cette constatation reflète la priorisation des fonctions après vêlage, indiquant que les vaches reportent leurs fonctions reproductives jusqu'à ce que l'équilibre énergétique ne compromette plus la survie de l'embryon ou du fœtus. Certaines associations connues entre l'énergie et la reproduction sont présentés dans le Tableau 7 (Scaramuzzi et al., 2006).

Les faibles concentrations d'insuline dans le sang sont responsables de la faible production d'IGF1 par le foie (Butler et al., 2003a,b) et ces deux signaux réduisent la réponse des follicules ovariens aux gonadotrophines. Physiologiquement, les signaux métaboliques qui contrôlent les signaux gonadotrophiques et le développement folliculaire précoce sont interdépendants. La FSH stimule les cellules de la granulosa dans les follicules pour développer les récepteurs à l'insuline, à l'hormone de croissance et aux IGF1. L'insuline et l'IGF1 fournissent alors le signal hormonal,

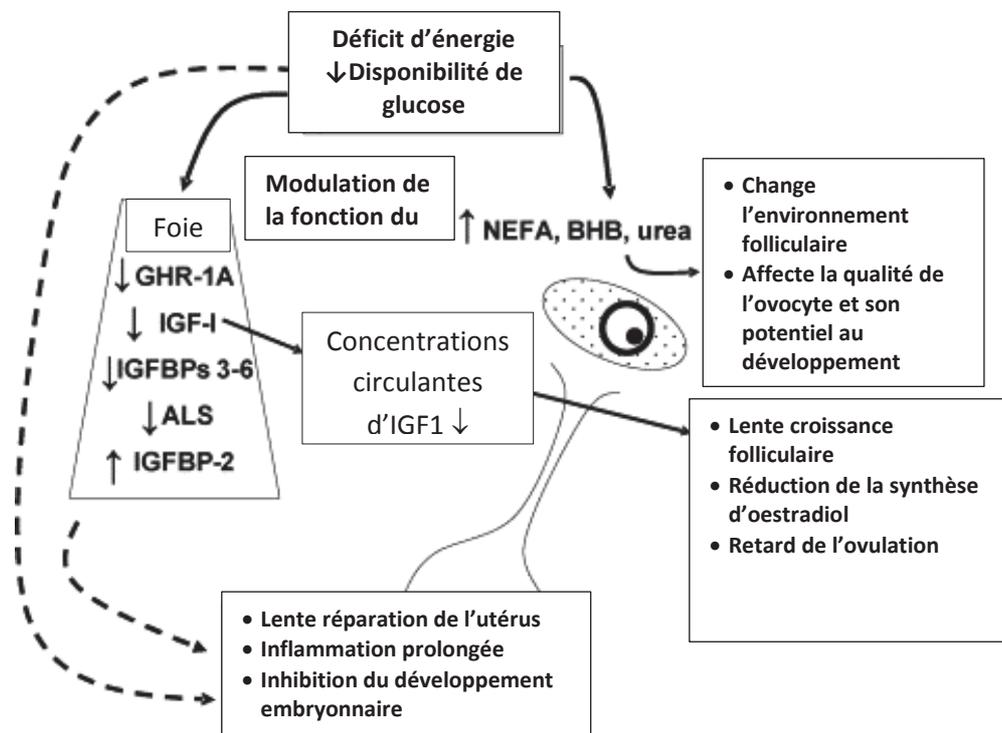
qui stimule le développement du follicule pré-ovulatoire (Bean and Butler, 1999 ; Kawashima et al., 2007a; Sudo et al., 2007; Shimizu et al., 2008; Kawashima et al., 2012).

**Tableau 7 : Quelques associations connues entre le bilan énergétique et la reproduction. Adapté de Scaramuzzi et al. (2006).**

| <b>Statut Métabolique</b>   | <b>Conséquences métaboliques</b>                             | <b>Effets sur la reproduction</b>                     |
|-----------------------------|--|---|
| Bilan énergétique négatif   | Perte de poids   | Inhibition de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus |
|                             | Réserves de graisses épuisées                                | Absence de pulsation de LH                            |
|                             | Atrophie musculaire  | Faible concentrations de FSH                          |
|                             | Hypoinsulinémie  | Inhibition de la folliculogénèse                      |
|                             | Hypoglycémie   | Baisse de l'œstradiol                                 |
|                             | BHB et AGNE élevée   | Sensibilité élevée de la rétroaction négative         |
|                             | GH élevée  | Anovulation   |
|                             | Basse leptine  | Anoestrus   |
|                             | Réduction de la température métabolique                      | puberté retardée                                      |
|                             | Système IGF supprimé   |   |
| Urée élevée                 |  |   |
| Bilan énergétique équilibré | Poids maintenu   | Sécrétion normale de GnRH par l'hypothalamus          |
|                             | Réserve grasseuse maintenue                                  | Pulsation normale de LH                               |
|                             | Taux normal d'insuline                                       | Concentrations normales de FSH                        |
|                             | Taux normal de glycémie                                      | Folliculogénèse normale                               |
|                             | Taux BHB, butyrates et NEFA bas                              | Œstradiol et inhibine normaux                         |
|                             | GH normale   | Rétroaction négative normale                          |
|                             | Leptine normale  | Ovulation   |
|                             | Système IGF normal   | Œstrus  |
|                             | Urée normale   | Taux d'ovulations naturelles au-dessous du maximum    |
|                             |  |   |
| Bilan énergétique positive  | Gain de poids à long terme                                   | Sécrétion normale de GnRH par l'hypothalamus          |
|                             | Augmentation réserves graisseuses                            | Pulsation normale de LH                               |
|                             | Hyperinsulinémie   | Concentrations augmentées de FSH                      |
|                             | Hyperglycémie  | Folliculogénèse améliorée                             |
|                             | Basse BHB et AGNE bas  | Œstradiol réduit                                      |
|                             | Basse GH   | Rétroaction négative réduite                          |
|                             | Leptine élevée   | Ovulation   |
|                             | Système IGF stimulé  | Œstrus  |
|                             | Urée normale mais peut être haute si azote alimentaire élevé | Taux d'ovulations naturelles maximum                  |
|                             |  | Puberté avancée                                       |

Le bilan énergétique négatif retarde également l'augmentation de la pulsativité de LH et FSH nécessaires pour la stimulation des follicules ovariens, la production d'œstradiol et l'ovulation (Butler et al., 2006 ). Dans ces conditions, il a été rapporté des diminutions du diamètre du follicule dominant, du poids du corps jaune et des concentrations des hormones au cours du péri-œstrus comme l'œstradiol et la progestérone (Canfield et Butler, 1991 ; Villa-Godoy et al., 1998 ; Beam et al., 1999 ; Butler, 2000). De plus, de profonds changements dans le

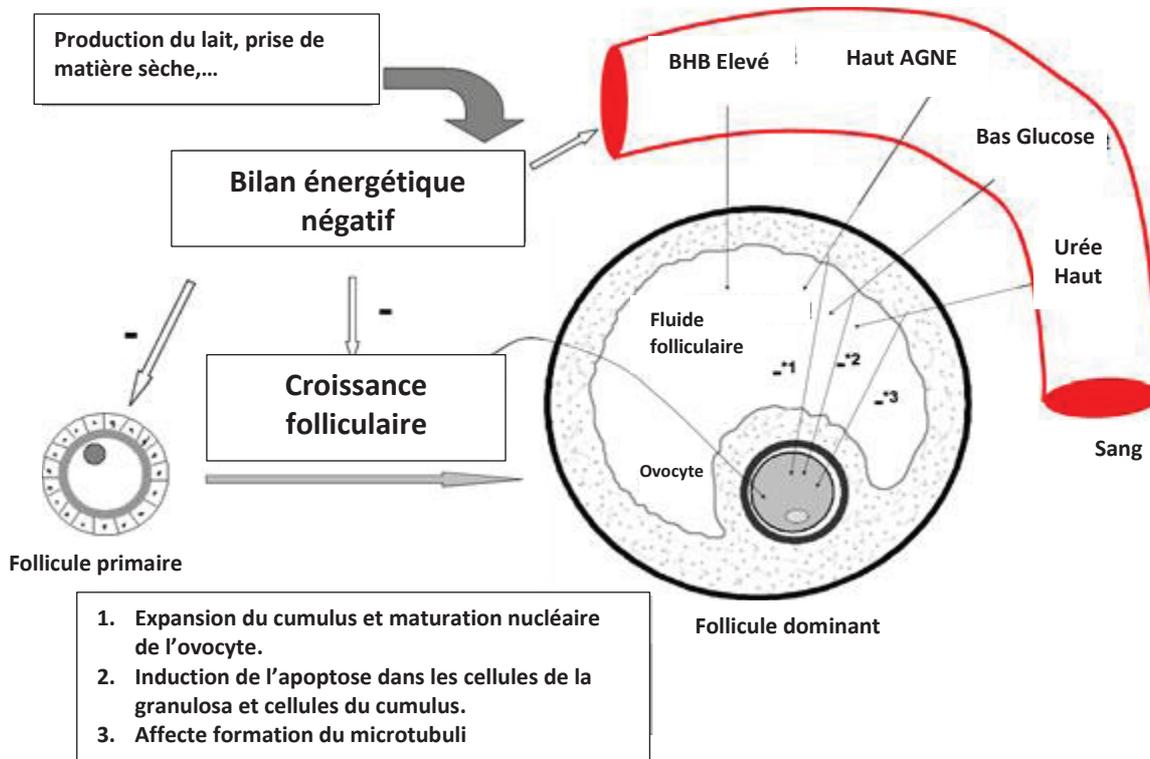
foie conduisent à la réduction de la concentration de récepteurs à la GH (GHR-1A), à l'IGF1, à plusieurs protéines de liaison de l'IGF (IGFBP-3, -4, -5 et -6), et à la sous-unité acide labile (ALS), tandis que l'IGFBP-2 est augmentée. Il en résulte une baisse marquée de la concentration circulante de l'IGF1 et de la durée de sa demi-vie. Il s'ensuit une possible diminution de la maturation folliculaire et de la stéroïdogénèse (Figure 26; Fenwick et al., 2008a ; Wathes et al., 2007). Le bilan énergétique négatif réduit la capacité de l'utérus à récupérer après le vêlage et peut entraîner des dommages liés aux mécanismes inflammatoires persistants.



**Figure 26. Résumé du schéma montrant comment le bilan énergétique négatif peut influencer la fécondité à travers des effets sur le foie, l'ovaire et l'utérus (Wathes et al., 2007). NEFA = non-esterified fatty acids (AGNE).**

Les changements métaboliques liés à la mobilisation des tissus peuvent affecter la qualité de l'ovocyte, directement ou indirectement par l'intermédiaire d'altérations de l'environnement folliculaire (Figure 27). Des hormones plasmatiques et des métabolites liés au bilan énergétique négatif sont corrélés avec les concentrations de métabolites et des hormones dans le liquide folliculaire du follicule dominant (Jorritsma et al., 2003 ; Leroy et al., 2004a). Des études ont démontré que les paramètres métaboliques résultant d'un bilan énergétique négatif affectent le

développement de l'ovocyte et la qualité des embryons (Leroy et al., 2008a ; Leroy et al., 2008b).



**Figure 27. Mécanismes métaboliques reliant le déficit énergétique et la qualité de l'ovocyte chez les vaches laitières hautes productrices. BHB:  $\beta$ -hydroxybutyrate (Adaptée de Leroy et al., 2008a).**

Les effets potentiels de conditions métaboliques défavorables au cours de la croissance et de la maturation de l'ovocyte sur les résultats ultérieurs de fertilité ont été proposés pour la première fois par Britt (1992). Cet auteur a émis l'hypothèse que le déficit énergétique pendant les premières semaines post-partum pourrait avoir un effet à long terme sur la qualité et la compétence au développement de l'ovocyte ovulé 60-80 jours plus tard ainsi que sur la quantité de progestérone synthétisée par le corps jaune suite à l'ovulation. Ceci est basé sur le fait qu'il faut plusieurs mois (60 à 80 jours) à l'ovocyte pour passer du stade pré-antrum à l'état de follicule mature pré-ovulatoire (Lussier et al., 1987 ; Britt, 1992 ; Fair, 2010).

L'organisation structurelle de la paroi du follicule quiescent fournit seulement un isolement partiel de l'ovocyte à partir des compartiments de l'ovaire extrafolliculaire. Les substances dans la région autour du stroma en contact quasi direct avec les vaisseaux sanguins peuvent facilement accéder au follicule par diffusion. (Zamboni, 1974). Au cours de la

croissance terminale du follicule pré-ovulatoire, la perméabilité de cette barrière sang-follicule semble augmenter (Edwards, 1974 ; Bagavandoss et al., 1983). De plus, un modèle de ponctions transvaginales répétées du liquide folliculaire chez la vache laitière haute productrice au cours du post-partum a permis de montrer que ce fluide reflète les modifications des concentrations sériques des paramètres métaboliques au cours des périodes de déficit énergétique, ce qui signifie que la croissance et la maturation ovocytaire sont directement exposées à ces variations (Leroy et al., 2004a).

En cas d'hypoglycémie, associée à une période de bilan énergétique négatif, la capacité de l'ovocyte pré-ovulatoire à se développer peut être compromise. Cependant, le follicule isolerait l'ovocyte des concentrations très basses du sérum en glucose (Leroy et al., 2004). De plus, dans les cellules du cumulus, le glucose est métabolisé en pyruvate et lactate qui servent de substrat à l'ovocyte pour générer de l'ATP. Dans l'ovocyte, le glucose est utilisé par la voie des pentoses phosphates pour être utilisé dans la synthèse d'ADN et d'ARN (Sutton et al., 2003). Malgré son faible niveau d'utilisation, le glucose est donc une molécule indispensable à la maturation des ovocytes, en particulier parce que la voie des pentoses phosphates est impliquée dans la progression de la méiose (pour assurer la production d'ATP) et donc essentielle à la capacité de développement de l'ovocyte (Downs et Utecht 1999 ; Cetica et al., 2002 ; Sutton et al., 2003).

Kruip et Kemp (1999) ont suggéré la possibilité d'effets toxiques directs de hautes concentrations d'AGNE au niveau de l'ovaire. De plus, Leroy et al. (2005) ont montré que les niveaux élevés d'AGNE, associés à un bilan énergétique négatif, sont reflétés dans le liquide folliculaire des follicules dominants chez les vaches laitières au début du post-partum. Les modifications de certains AGNES spécifiques compromettent probablement la fertilité, plutôt que les concentrations totales en AGNE (Sutton-McDowall, 2014).

Des études de maturation in vitro ont montré que des concentrations élevées des AGNE comme les acides stéarique, palmitique, oléique détériorent la maturation de l'ovocyte, conduisant à de faibles taux de fécondation, de segmentation et de développement au stade blastocyste (Homa et Brown, 1992 ; Jorritsma et al., 2004 ; Leroy et al., 2005 ; Aardema et al., 2011) ;

De plus, des ovocytes maturés in vitro dans des milieux avec des concentrations basses en glucose (2,75 mM et 5,5 mM) et des concentrations élevées en BHB (4,0 mM et 1,8 mM ),

semblables à celles de vaches en cétose clinique ou sub-clinique respectivement montrent un retard de maturation, de fécondation des ovocytes et de segmentation des zygotes (Leroy et al., 2006).

Les études *in vivo* ne confirment pas toujours l'effet négatif d'un bilan énergétique négatif, ni les observations *in vitro* sur la qualité des ovocytes citées ci-dessus (Tableau 8). Ainsi l'hypothèse selon laquelle la fertilité au sens « capacité à produire des gamètes fécondables » est modulée par le bilan énergétique semble controversée par certains auteurs. Ces constatations pourraient s'expliquer en partie par l'action du follicule qui isolerait l'ovocyte des concentrations négatives comme constaté par Leroy pour les concentrations basses en glucose circulant (Leroy et al., 2004a).

**Tableau 8. Différentes études concernant la qualité des ovocytes chez les vaches laitières en début de lactation. Adapté de Leroy et al., 2008.**

| Auteur                    | Diminution de la qualité de l'ovocyte (oui/non) | Résultats   |
|---------------------------|---|---|
| Krip et al. (1995)        | Oui   | Réduction de la capacité de développement <i>in vitro</i> des ovocytes de vaches avec BEN en comparaison au groupe témoin (80-120 jours post-partum)  |
| Kendrick et al. (1999)    | Oui   | Qualité morphologique des ovocytes diminue après 30 jours post-partum   |
| Gwazdauskas et al. (2000) | Oui   | Qualité morphologique des ovocytes est supérieure à 28 jours qu'à 117 jours post-partum   |
| Snijders et al. (2000)    | Oui   | Réduction de la compétence au développement <i>in vitro</i> des ovocytes de vaches de haute valeur génétique par rapport aux vaches de moindre valeur génétique   |
| Wiltbank et al. (2001)    | Oui   | Qualité morphologique des ovocytes est plus élevée chez les vaches laitières tarées que chez les vaches laitières en lactation.   |
| Walters et al. (2002b)    | Oui   | Qualité morphologique des ovocytes diminue dans les vaches laitières après 70 jours post-partum   |
| Argov et al. (2004)       | Non   | Pas de différence sur la qualité morphologique des ovocytes et leur capacité de développement entre 73 et 263 jours post-partum.  |
| Rizos et al. (2005)       | Non   | Pas de différence sur la qualité morphologique des ovocytes et leur capacité de développement entre les vaches laitières et génisses  |
| Roht et al. (2008)        | Non   | Pas de différence sur la qualité morphologique des ovocytes et leur capacité de développement entre génisses, vaches laitières (60-95 jours post-partum) et vaches laitières (120-225 jours post-partum)                        |
| Sartori (2010)            | Oui   | Réduction de la qualité et viabilité des embryons chez les vaches hautes productrices en début de lactation par rapport aux embryons des vaches tarées  |
| Grimard et al. (2012)     | Non   | Pas de différence sur la qualité des ovocytes ponctionnés avant la mise à la reproduction entre des vaches fertiles (gestantes après 1 ou 2 IA) et infertiles (non gestantes après 1 ou 2 IA) ni entre primipares et multipares |
| Matoba et al. (2012)      | Non   | Pas de différence sur la qualité morphologique des ovocytes et leur capacité de développement des vaches laitières (14-41 jours post-partum) et vaches laitières (42-80 jours post-partum).                                     |

### **3. Modifications de l'insuline et de l'IGF1 et impacts sur la fonction de reproduction chez les bovins**

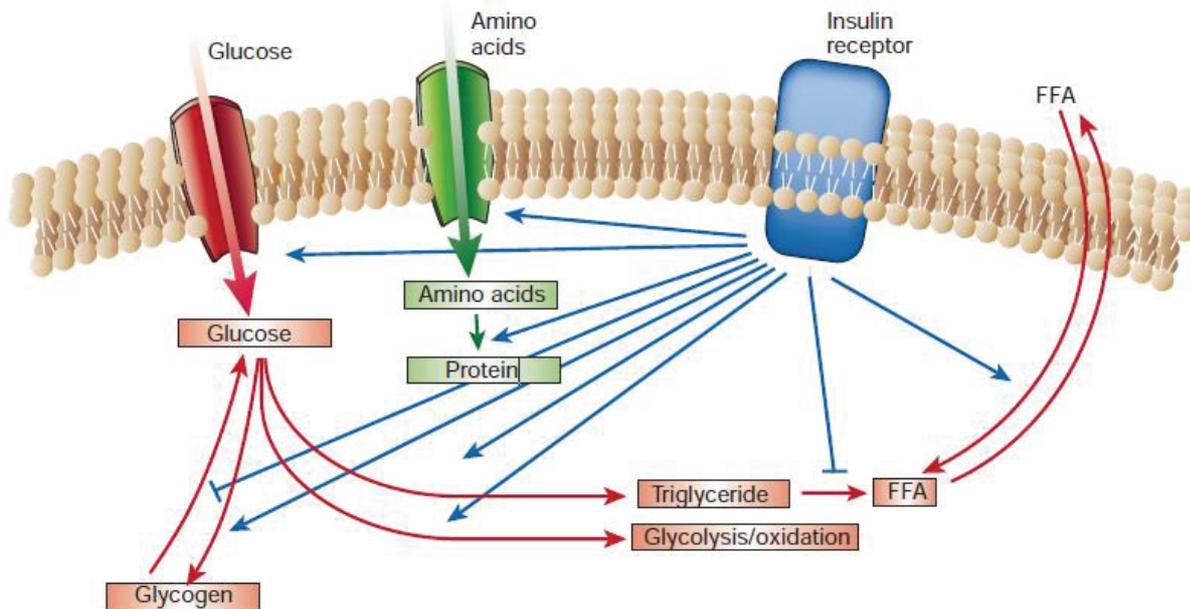
La partie 1 de la revue bibliographique a permis de préciser que le développement et la croissance folliculaire sont contrôlés par les gonadotrophines hypophysaires, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), et par des facteurs locaux tels que les hormones stéroïdiennes et les facteurs de croissance. Parmi les facteurs endocriniens, l'insuline, l'hormone de croissance (GH) et l'IGF, facteurs liés au métabolisme, sont des facteurs cruciaux pour le développement folliculaire chez les mammifères (Spicer et Echtenkamp, 1995; Webb et al., 1999 ; Gong et al., 2002 ; Monget et al., 2000 ; Shimizu et al., 2008).

Après un rappel du métabolisme physiologique de l'insuline et de l'IGF1, seront développées les modifications de ces hormones induites par les niveaux d'apports alimentaires, par le propylène glycol et d'autres méthodes, en décrivant leurs conséquences sur la fonction de reproduction chez les bovins.

#### **3.1. Modifications physiologiques de l'insuline et de l'IGF1 chez les bovins.**

##### **3.1.1 Insuline.**

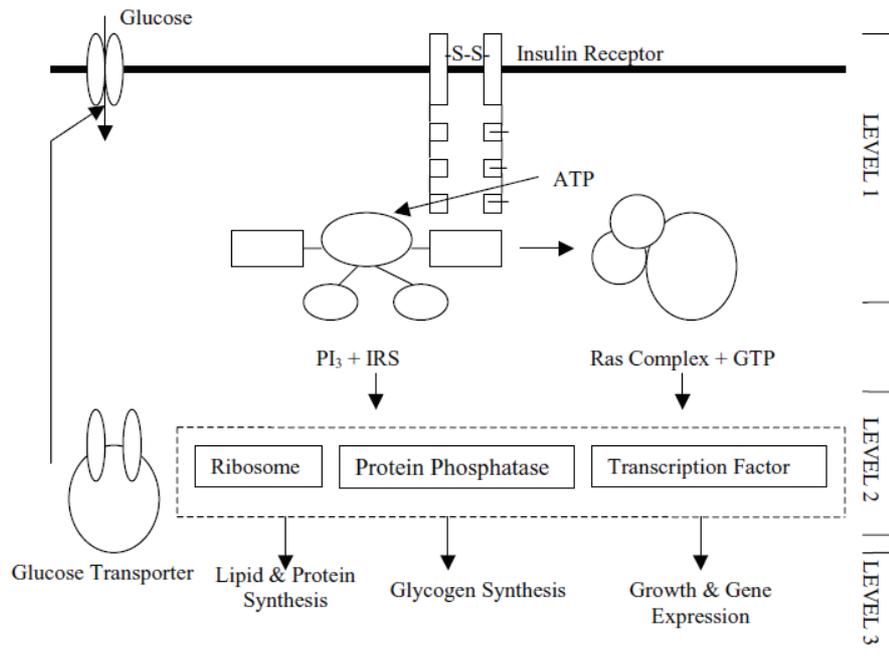
L'insuline, hormone peptidique, découverte en 1922 par Banting et Best, est un régulateur essentiel de la physiologie métabolique (Warram et al., 1995). En réponse à l'augmentation de la concentration de glucose dans le sang, les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas libèrent l'insuline dans le sang. Elle se déplace vers les tissus cibles primaires, tissus adipeux, muscles et foie (Myers et Whites, 1996). L'insuline augmente le captage du glucose par le muscle et le tissu adipeux et inhibe la production hépatique de glucose. Elle sert de premier régulateur de la concentration de glucose dans le sang. L'insuline stimule la croissance et la différenciation cellulaire, et favorise le stockage de substrats dans le tissu adipeux, le foie et le muscle en stimulant la lipogenèse, le glycogène, la synthèse des protéines, l'inhibition de la lipolyse, la glycogénolyse et la dégradation des protéines (Figure 28). La résistance à l'insuline ou une carence entraîne une profonde dérégulation de ces processus et produit des élévations à jeun des niveaux de lipides et de glycémie postprandiale (Saltiel et Kahn, 2001).



**Figure 28. La régulation du métabolisme par l'insuline.** L'insuline est la plus puissante hormone anabolique connue. Elle favorise la synthèse et le stockage des glucides, des lipides et des protéines, tout en inhibant leur dégradation et la libération dans la circulation. L'insuline stimule l'absorption du glucose, des acides aminés et des acides gras dans les cellules, et augmente l'expression ou l'activité d'enzymes que catalysent le glycogène, des lipides et des protéines, tout en inhibant l'activité ou l'expression de ceux qui catalysent la dégradation (Saltiel et Kahn, 2001).

**La transduction de signal** est un événement très complexe intracellulaire et se fait en trois étapes : la phosphorylation des récepteurs de l'insuline, la signalisation intracellulaire des messagers secondaires, et la translocation des transporteurs de glucose (GLUT) (Hayirli et al., 2006). Le récepteur de l'insuline (IR) qui régule l'action de l'insuline est un dimère de  $\alpha$  et  $\beta$  sous-unités. La sous-unité  $\alpha$  est située à la surface de la cellule, soit le domaine de liaison à l'insuline, tandis que la sous-unité  $\beta$  est située à l'intérieur de la cellule soit le domaine de tyrosine kinase (Kahn, 1994). La liaison à la sous-unité  $\alpha$  de l'insuline provoque une autophosphorylation de la sous-unité de l'ATP de  $\beta$ , ce qui génère de l'activité tyrosine kinase dans la cellule. Lors de la phosphorylation de la sous-unité  $\beta$ , le complexe hormone-récepteur est internalisé. L'internalisation est l'étape majeure où l'obésité ou l'hyperinsulinémie provoque une baisse de régulation des récepteurs de l'insuline par une augmentation de la dégradation des taux d'insuline et de ses récepteurs (Berne et Levy, 1993 ; Hadley, 1996). À la suite de l'internalisation de l'insuline, des messagers secondaires intracellulaires sont propagés dans une

réaction en chaîne par l'intermédiaire de sérine phosphorylation et de déphosphorylation en cascades. Ces messagers sont spécifiques pour les effets biologiques finaux de l'insuline (Figure 29). Par exemple, la phosphorylation de la guanosine triphosphate (complexe Ras) stimule la croissance et l'expression des gènes ; la phosphorylation de l'insuline substrat récepteur (IRS) stimule la synthèse de glycogène; la phosphorylation du phosphate phospho-kinase (PI3) stimule la lipogénèse et la synthèse des protéines, et la translocation de GLUT 2 (Kahn, 1994). Au cours de la translocation du GLUT et l'internalisation de l'insuline, du potassium est nécessaire pour la  $\beta$  dépolariation de la membrane cellulaire (Berne et Levy, 1993). Les transporteurs de glucose sont des éléments importants de l'événement de signalisation intracellulaire. Les différences dans la possession de type de GLUT différents déterminent la réactivité des tissus à l'insuline pour l'absorption du glucose. Par exemple, GLUT 1 est un type prédominant dans le cerveau, le placenta, la glande mammaire et les érythrocytes; GLUT 2 dans le foie, le rein et le pancréas; GLUT 3 dans le cerveau et le placenta; GLUT 4 dans le tissu adipeux et squelettique et le muscle du cœur ; et GLUT 5 dans l'intestin grêle (DeFronzo et al., 1992). Parmi ceux-ci, seulement GLUT 4 se trouve dans les tissus sensibles à l'insuline (muscle et le tissu adipeux) et nécessite de l'insuline pour le transport de glucose (Zhou et al., 1999). L'ARNm de GLUT 1,3 et 4 ont été détectés aussi dans l'ovaire, dans les follicules et corps jaunes bovins. Dans ces organites GLUT 1 et 3 agissent comme des grands transporteurs de glucose tandis que GLUT4 peut avoir un rôle de soutien (Nishimoto et al., 2006).



**Figure 29. La transduction de signal dans l'action de l'insuline (Hayirli, 2006).**

**La libération d'insuline** est étroitement liée à sa synthèse. Il y a de nombreux facteurs qui stimulent la sécrétion d'insuline (Berne et Levy, 1993). Il s'agit notamment de nutriments (par exemple le glucose, le galactose, le mannose, les glycéraldéhydes, l'arginine, la lysine, la leucine, l'alanine, des acides gras à longue chaîne, le potassium et le calcium), des hormones gastro-intestinales (par exemple, le glucagon, le polypeptide pancréatique, le peptide inhibiteur gastrique, la sécrétine et la cholécystokinine) stimuli parasympathique (par exemple l'activité vagale, l'activité  $\beta$ -adrénergiques et l'acétylcholine) et les médicaments (par exemple sulfamides) (Hayirli, 2006). Les facteurs qui suppriment la sécrétion d'insuline comprennent les conditions physiologiques (par exemple à jeun et en exercice), des hormones gastro-intestinales (galanine, somatostatine, pancréatostatine), des stimuli sympathiques (activité  $\alpha$ -adrénergique), et d'autres composés spécifiques (par exemple l'IL-1 et PGF2- $\alpha$ ) (Hayirli, 2006).

En raison de différences distinctes dans le métabolisme entre les non-ruminants et ruminants, l'ampleur de la sécrétion d'insuline en réponse à des éléments nutritifs varie considérablement (Brockman, 1984 ; Brockman et Laarveld, 1986). Chez les ruminants, les éléments nutritifs sont soumis à une dégradation microbienne et à la fermentation. Les glucides et les protéines alimentaires sont convertis en acides gras volatils (AGV) et d'autres biomolécules (par exemple, l'ammoniac et les protéines microbiennes) dans le réticulo rumen. Seule une petite

quantité de glucose traverse le réticulo-rumen et est absorbé par l'intestin, tandis que la majorité de glucose est fourni par l'intermédiaire de la gluconéogenèse dans le foie (Young, 1976). Ainsi, la concentration de glucose plasmatique est plus faible chez les ruminants que chez les monogastriques. Dans les conditions physiologiques normales, les concentrations postprandiales de glucose plasmatique varient de 4,4 à 6,7 mmol/L chez les monogastriques et les jeunes ruminants, alors qu'ils vont de 2,2 à 3.3 mmol/L chez les ruminants adultes (Hsu et Crump, 1989). En conséquence, les ruminants sont généralement considérés comme moins sensibles à l'insuline que les non-ruminants et il a été démontré que l'insuline, servant d'intermédiaire pour l'élimination de glucose, est significativement plus faible chez les ovins alimentés de foin que chez les animaux monogastriques (Janes et al., 1985).

Les concentrations circulantes d'insuline sont exposées à une variation diurne, mais aussi à des modifications pendant le cycle œstral. Les concentrations augmentent significativement au cours de la période pré-ovulatoire (Armstrong et al., 2001). Cette action de l'insuline est modulée par les récepteurs de l'insuline, que apparaissent d'abord dans les cellules de la granulosa des follicules préantraux (Samoto et al, 1993 ; Willis et Franks, 1995). Les récepteurs de l'insuline (IRs) sont largement présents dans toutes les parties de l'ovaire, y compris la granulosa, la thèque et le stroma (Poretzky et al., 1984, 1985 ; Portesky et Kalin, 1987 ; El-Roeiy et al., 1993, 1994).

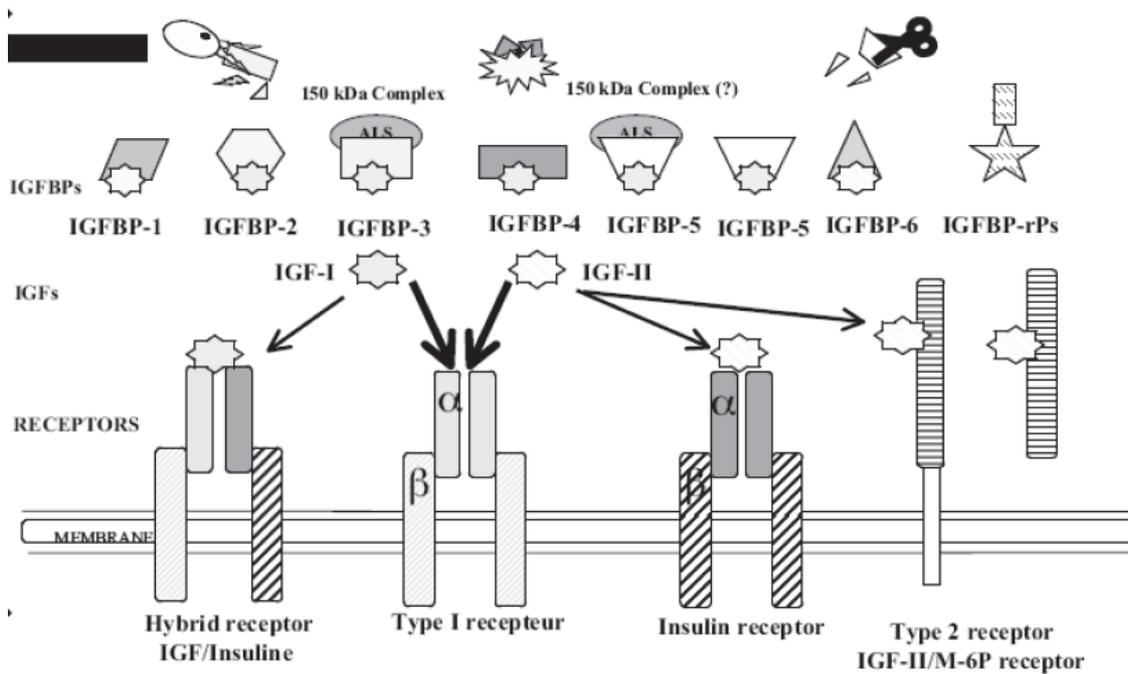
De plus, des travaux ont suggéré que la génétique peut expliquer des différences dans la sécrétion d'insuline et à la réponse périphérique de l'insuline due probablement à des différences dans la priorisation de l'énergie (Bossart et al., 2009). Conformément à ces observations, l'insuline plasmatique est plus élevée chez les bovins allaitants que chez des vaches de races laitières (Hart et al, 1975, 1978 ; Sano et al. 1991 ; Shingu et al, 2002) et également plus élevée chez les vaches laitières à bas potentiel génétique par rapport à des vaches à haut potentiel de production laitière (Bonczek et al., 1988 ; Giesecke et al., 1987). Cette différence métabolique peut expliquer en partie pourquoi les vaches laitières à haut potentiel génétique sont plus prédisposées à perdre du poids pendant la lactation. Metcalf et Weekes (1990) ont constaté que les brebis en lactation alimentées avec un régime restreint ont montré une perte de poids et une diminution de sensibilité des tissus à l'insuline. La réduction de sensibilité des tissus à l'insuline peut être considérée comme un mécanisme de maintien de la lactation pendant une période de déficit énergétique (Sternbauer et al., 2002).

De plus, il existe des preuves significatives selon lesquelles la restriction alimentaire, l'état corporel et le bilan énergétique négatif diminuent les concentrations d'insuline circulante (Vizcarra et al., 1998 ; Mackey et al., 2000 ; Sinclair et al., 2002).

### **3.1.2 Insuline Growth Factor-1 (IGF1).**

Le système IGF comprend l'IGF1 et son récepteur IGF-IR, l'IGF2 et son récepteur IGFIIR, des protéines de liaison d'IGF (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 et 6) et les protéases de l'IGF (Hwa et al., 1999 ; Monget, 2004 ; Figure 30). Les IGF sont des polypeptides monocaténaux ayant une homologie de structure de la pro-insuline. IGF1 et IGF2 agissent sur plusieurs types de cellules chez les mammifères, d'une manière endocrine, paracrine et autocrine (Grimberg et Cohen, 2000 ; Hallberg et al., 2000) régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la transformation cellulaire (Leng et al., 2001 ; Makarevich et al., 2002).

L'IGF1 est produit dans les organes reproducteurs d'importance telle que l'hypothalamus, ovaires, oviductes et utérus (Daftary et al., 2005). Cependant, la plupart de l'IGF1 mesurée dans le sang est produite par le foie en réponse à l'hormone de croissance (GH ; Lucy 2000 ; Velazquez et al., 2008) et sa production est liée au niveau de l'alimentation (Wang et al., 2003 ; Fenwick et al., 2008). IGF1 est lié à six protéines de liaison de l'IGF (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 et 6 ; Silva et al., 2009) qui régulent sa biodisponibilité.



**Figure 30. Système IGF.** Les composants de ce système sont les peptides IGF1 et 2, l'IGFBP-1 à -6, IGFBP-RPS, protéases IGFBP, récepteurs de type II de l'IGF1, IGFBP et potentiel (s) et IGFBP-RP (s) récepteurs.M6P, Mannose-6-phosphate.(IGFBP = IGF binding proteins) (Monget, 2004).

La concentration endocrine de l'IGF1 dans le sang est un critère héritable chez les bovins, avec des estimations de l'héritabilité variant de 0,23 à 0,52 (Davis et Simmen, 1997 ; Swali et Wathes, 2006). D'une façon similaire à l'insuline, les variations des concentrations d'IGF1 dans le sang sont influencées par l'état corporel, (Richards et al., 1991), l'apport alimentaire (Houseknecht et al., 1988 ; Bossis et al., 1999) et le bilan énergétique (Spicer et al., 1990). Les concentrations d'IGF1 peuvent varier selon l'état physiologique de l'animal : pré-pubère, pubère, gestation, lactation et par la race ou génotype.

Chez la femelle prépubère, la concentration IGF1 est étroitement liée au poids corporel au cours de la croissance (Lammers et al., 1999), avec des coefficients de corrélations estimés ( $r^2$ ) variant de 0,88 à 0,92 (Lacau-Mengido et al., 2000). Des études ont observé une augmentation des concentrations d'IGF1 circulant chez les génisses quand la puberté approche (Jones et al., 1991 ; Maciel et al., 2004). Chez les génisses pubères, l'état métabolique influe aussi sur les niveaux d'IGF1. Les génisses pubères avec un BEN ont des niveaux plasmatiques inférieurs d'IGF1 aux génisses présentant un bilan énergétique positif (BEP) (Vandehaar et al., 1995).

Au cours du cycle œstral, les concentrations de l'IGF1 ont été étudiées chez les bovins sans stress nutritionnel. Des données contradictoires ont été rapportées. D'une part, Kawashima et al. (2007b) ont observé que la concentration circulante d'IGF1 chez les bovins à viande et laitiers augmente pendant la période pré-ovulatoire. Ils ont également rapporté que la concentration plasmatique d'IGF1 mesurée deux fois par semaine a augmenté de façon transitoire pendant la phase folliculaire et a diminué au cours de la phase lutéale du cycle œstral. D'autre part, un échantillonnage plus large a révélé que la concentration plasmatique d'IGF1, prélevé tous les deux jours, reste relativement constante au cours du cycle œstral chez les espèces *Bos taurus* et *Bos indicus* (Alvarez et al., 2000). En outre, des analyses réalisées toutes les 4 h pendant les 36 h après l'injection de prostaglandines ne révèlent aucune variation significative des niveaux d'IGF1 circulant chez des génisses croisées (Spicer et al., 1991).

Chez les vaches laitières, les niveaux d'IGF1 périphériques après vêlage sont affectés par la race/génotype et la production de lait (Spicer et al., 1993 ; Taylor et al., 2001 ; Robert et al., 2005). Chez les bovins à viande, l'augmentation linéaire de l'IGF1 dans le plasma au cours de la période post-partum n'est pas toujours observée dans certains génotypes (les vaches Brahman présentent les niveaux d'IGF1 les plus élevés, alors que les vaches Angus et Charolaises présentent des niveaux plus faibles ; Spicer et al., 2002). D'autre part, des vaches Holstein produisant 5000 à 6000 kg de lait par lactation en 305 jours n'ont pas montré de diminution des concentrations d'IGF1 au cours du post-partum et les concentrations les plus faibles d'IGF1, observées lors de la première semaine post-partum, ont diminué progressivement au fur et à mesure que les rendements laitiers ont augmenté de 7000 à 9000 kg (Taylor et al., 2001).

L'âge est aussi un facteur influençant les niveaux de concentration d'IGF1, en particulier chez les bovins laitiers (Velazquez et al., 2008). Une concentration périphérique supérieure d'IGF1 a été trouvée chez les primipares par rapport aux vaches multipares pendant les périodes prépartum et post-partum (Wathes et al., 2007a ; Taylor et al., 2004). Cette différence est probablement due au fait que les vaches primipares sont encore en croissance et l'IGF1 endocrinien est lié positivement à la croissance osseuse et au développement musculaire au cours de la croissance chez les bovins (Connor et al., 2000 ; Kurosaki et al., 2007).

De plus, l'altération de l'état nutritionnel et la fonction immunitaire deux mois avant le vêlage, entraînant d'un désordre reproductif post partum, peuvent influencer aussi sur les concentrations d'IGF1. La concentration post-partum d'IGF1 chez les vaches ayant présenté une rétention placentaire et une endométrite, tend à être inférieure à celle des vaches sans maladie

post-partum (Nakada et al., 2006). En fait, il est bien documenté que l'IGF1 peut influencer de manière significative le système immunitaire chez plusieurs espèces, y compris les bovins (Zhao et al., 1993 ; Dorshkind et Horseman, 2000).

Comme pour l'insuline, un BEN après le vêlage diminue la concentration d'IGF1 et la mesure des niveaux endocriniens d'IGF1 peut être indicative de la compétence métabolique pour le rétablissement de la fertilité au cours de la période post-partum chez les bovins laitiers et à viande (Velazquez et al., 2008).

### **3.2 Modifications de l'insuline et de l'IGF1 induites par des suppléments alimentaires chez les bovins et conséquences sur la fonction de reproduction.**

#### **3.2.1 Apports alimentaires et effets dans la croissance folliculaire et la production des embryons.**

L'augmentation des niveaux d'apport alimentaire avec des matières premières glyco-géniques augmente le taux d'insuline plasmatique (Gutierrez et al., 1997 ; Armstrong et al., 2001 ; Armstrong et al., 2002a ; Gong et al., 2002 ; Van Knegsel et al., 2005 ; Freret et al., 2006 ; Mollo et al., 2007) et celui d'IGF1 (Armstrong et al., 2002b ; Freret et al., 2006) et/ou les concentrations de ces hormones métaboliques dans le liquide folliculaire (Landau et al., 2000). Ce type de régime favorise l'augmentation de la production d'acides gras volatiles dans le rumen, en particulier le propionate, et augmente la disponibilité du glucose par la néoglucogénèse hépatique (Santos et al., 2008).

Les changements dans les concentrations d'IGF1 avant la puberté sont fortement influencés par le régime alimentaire (Granger et al., 1989). Des génisses prépubères restreintes puis réalimentées présentent une croissance supérieure associée à l'augmentation rapide des niveaux d'IGF1 observés au cours de la réalimentation (Yambayamba et al., 1996). Des génisses prépubères bien alimentées atteignent la puberté à un âge plus précoce par rapport à des animaux soumis à des restrictions alimentaires (Schillo et al., 1992 ; Bergfeld et al., 1994 ; Chelikani et al., 2000 ; Macdonald et al., 2005), en lien avec la diminution concomitante de l'IGF1 dans le sang (Yeli et al., 1996 ; Luna-Pinto et al., 2000).

D'autre part, une augmentation des apports énergétiques sont généralement favorables à la croissance folliculaire chez les génisses et augmentent en 1 ou 2 jours le nombre de petits follicules recrutés sans effet sur les concentrations de FSH (Gutierrez et al. 1997; Armstrong et al, 2001; Gong et al., 2002; Martins et al, 2006; Fréret et al., 2006; Garnsworthy et al. 2008). Cet

effet combiné à un traitement FSH pourrait augmenter la réponse ovulatoire après superovulation (Gong et al., 2002). Chez la vache, les études de Gong et al. (2002) ont démontré les effets positifs d'une augmentation de concentrations d'insuline par une suralimentation au cours du post-partum ; ils ont rapporté une réduction de l'intervalle de vêlage - première ovulation et une augmentation de la proportion de vaches cyclées dans les 50 premiers jours après le vêlage.

De plus, Kendrick et al. (1999) ont travaillé avec 20 vaches laitières assignées à des niveaux contrastés de consommation de matière sèche fixés à 3,6% (haute énergie) ou 3,2% (faible énergie) de leur poids corporel. Les follicules ont été aspirés par OPU deux fois par semaine, du jour 30 au jour 100 après le vêlage, et les complexes cumulus-ovocytes ont été classés en fonction de la densité et homogénéité de l'ooplasm. Les vaches avec un meilleur équilibre de l'énergie (haute énergie) avaient des niveaux supérieurs d'IGF1 dans le follicule et de concentrations de progestérone plasmatique plus élevées ainsi que des nombres plus élevés d'ovocytes de bonne qualité.

Cependant, d'autres études n'ont montré aucun effet du niveau d'apport alimentaire (Mackey et al., 2000 ; Armstrong et al. 2001; Bastos et al, 2007 ; Prata et al., 2011 ; Surjus et al.,2012) voire des effets négatifs avec une suralimentation sur la qualité et quantité des ovocytes et embryons (Nolan et al., 1998 ; Fouladi-Nashta et al 2005 ; Martins et al.,2006 ; Freret et al., 2006 ; Mollo et al, 2007 ; Garnsworthy et al, 2009) (Tableau 9). L'absence d'effet pourrait être expliquée par des niveaux de suralimentation peu élevés (Armstrong et al., 2001), associés à des gains moyens quotidiens (GMQ) faibles chez les génisses, ou à une durée de suralimentation trop courte, inférieure à 2 semaines (Mackey et al., 2000). De plus, il est important de rappeler que des régimes riches en amidon favorisent les augmentations des taux d'insuline plasmatique (Gutierrez et al., 1997 ; Armstrong et al., 2001 ; Gong et al., 2002 ; Mollo et al., 2007), mais que des quantités excessives d'amidon facilement fermentescible ont la faculté de diminuer l'ingestion de matière sèche et d'inhiber les avantages potentiels de tels régimes riches en amidon sur les fonctions de l'ovaire (Bisinotto et al., 2012) car les vaches peuvent souffrir d'un problème d'acidose ruminale.

Il a été montré que les concentrations élevées d'insuline circulante ont des effets négatifs sur la qualité de l'ovocyte (Fouladi-Nashta et al., 2005 ; Garnsworthy et al., 2008), la production in vivo (Mollo et al., 2007) et in vitro (Freret et al., 2006) d'embryons de génisses superstimulées et suralimentées. Dans l'étude de Mollo et al. (2007), après un régime de 9 semaines, les génisses suralimentées (170 % de BE) ont présenté une réponse à la stimulation ( $24,0 \pm 1,1$  vs  $48,4 \pm 1,6$

follicules  $\geq 6$  mm,  $P < 0,001$ ) et de superovulation ( $15,7 \pm 0,9$  vs.  $33,6 \pm 1,4$  corps jaunes,  $P < 0,0001$ ) inférieure aux génisses ayant reçu un régime restreint (70% de BE). De plus, le nombre d'ovules / embryons récupérés ( $6,7 \pm 0,9$  vs  $10,5 \pm 0,6$  ;  $P < 0,0003$ ) et d'embryons transférables ( $3,8 \pm 0,4$  vs  $5,7 \pm 0,6$  ;  $P < 0,01$ ) ont également été réduits chez les génisses suralimentées.

L'impact d'une suralimentation sur la qualité ovocytaire et embryonnaire peut dépendre aussi de l'état métabolique de la vache ou génisse donneuse. Adamiak et al. (2005) ont montré que les rendements en blastocystes ont été augmentés lorsque des génisses maigres (NEC :  $2,0 \pm 0,12$ ) ont été alimentées deux fois plus que leurs besoins énergétiques, mais l'effet inverse a été observé pour des génisses à NEC modérée ( $3,7 \pm 0,12$ ).

D'autres études ont montré également des effets délétères chez les animaux présentant une NEC haute (Adamiak et al, 2006 ; Freret et al., 2006). L'interaction entre l'apport en énergie et la masse grasseuse peut entraîner une augmentation des réponses à l'insuline; les tissus de vaches obèses sont moins sensibles à l'insuline et développent une résistance à l'insuline, réduisant ainsi le captage du glucose par les cellules. Dans les travaux de Freret et al. (2006) chez les génisses superovulées avec un GMQ de  $0,95$  kg/j, puis soumises à un gain modéré de poids de  $0,73$  kg/j (qui réduit aussi l'état corporel et les concentrations plasmatiques d'insuline) ont mis en évidence une amélioration de la production et de la qualité in vitro de blastocystes avec ce régime alimentaire modéré. Ces résultats suggèrent qu'une restriction des apports pendant 6 semaines pourrait améliorer la production d'embryons in vitro chez des génisses suralimentées au préalable.

Au vu de ces résultats, des études ont été réalisées afin de trouver une stratégie alimentaire que module les concentrations d'insuline et n'affecte pas la qualité des ovocytes et des embryons. Garnsworthy et al. (2009) ont proposé une stratégie de l'alimentation glycogénique, depuis le vêlage et jusqu'à ce que les vaches reprennent leurs cycles ovariens et postérieurement une alimentation lipogénique avec une réduction des niveaux d'insuline jusqu'à 120 jours post-partum. Cette stratégie alimentaire a permis d'augmenter les taux de gestation. Théoriquement, l'administration d'un régime hyperinsulinémique après le vêlage favoriserait le développement folliculaire et l'administration d'un régime hypoinsulinémique et riche en acides gras pendant la période d'accouplement favoriserait la compétence ovocytaire et probablement les niveaux de progestérone (Garnsworthy et al., 2009).

**Tableau 9. Effets d'une suralimentation sur la croissance folliculaire, production d'ovocytes et d'embryons in vivo et in vitro chez les bovins.**

| Type Animaux                 | Régime énergie haute (suralimentation)  | Durée du régime  | Effets observés  | Références                   |
|------------------------------|---|--|--|------------------------------|
| Génisses (Hereford x Frison) | 200% des BE                             | Pendant 2 semaines avant des chaleurs synchronisées (j0) et jusqu'à 3 jours après          | Le nombre de petits follicules (< 4mm) a augmenté de j1 à j2 du cycle œstral   | Gutierrez et al., (1997)     |
| Génisses à viande            | 28,6 Mcal EM/kg/j (environ 80 % des BE) | Pendant 20 jours avant stimulation de la croissance folliculaire                           | In vitro : pas d'effet sur la qualité des ovocytes collectés puis maturés et fécondés. In vivo : Pas de différence entre les nombres d'embryons récoltés à j7 et les taux de clivage. Les morulas mises en culture 24 h ont donné un taux de blastocystes plus élevé dans le groupe en restriction drastique (9,6 Mcal EM/kg/j (environ 30% des BE). | Nolan et al. (1998b)         |
| Génisses à viande            | 120% de BE et 200% de BE                | J0 à J14 du cycle œstral   | Pas de différence sur le nombre de follicules en comparaison avec les génisses alimentées avec 40% de BE.  | Mackey et al. (2000)         |
| Génisses (Hereford x Frison) | 160% de BE                              | jour 0 (synchronisation à jour 32 (abattage)   | Pas de différence sur le nombre de follicules 1-4 mm et 4 à 8 mm, augmentation de P4, Pas d'effet sur la production d'embryons in vivo.  | Armstrong et al. (2001)      |
| Génisses Hereford x Frison   | 200% de BE                              | Depuis la pose de l'implant pour synchroniser les cycles et pendant 3 semaines             | Plus des follicules 2-4 mm avant superovulation, plus de follicules > 9 mm après superovulation, plus de corps jaunes, augmentation des concentrations de P4.  | Gong et al. (2002)           |
| Génisses (Viande x laitière) | 200% BE                                 | Pendant 83 jours (20 jours avant un œstrus de référence = j0, puis pendant 3 cycles) 3 OPU | Effet positif pour les OPU-PIV chez les vaches de faibles NEC (2,0±0,12) en comparaison à celles ayant des NEC (3,7±0,12) modérées   | Adamiak et al. (2005)        |
| Génisses (Holstein)          | GMQ: 0,95 Kk/j à 1,3 kg/j               | 8 semaines (4 OPU)   | Plus de follicules < 8mm deux jours avant traitement de stimulation de la croissance folliculaire, effets négatifs sur les OPU-PIV chez les génisses ayant reçu une suralimentation en comparaison avec les génisses après une restriction alimentaire (GMQ de 0,95 à 0,73 kg/j).  | Freret et al. (2006)         |
| Vaches en lactation          | Régime avec une haute teneur en amidon  | 7 OPU à 3-4 jours d'intervalle.  | Effets négatifs sur la qualité des ovocytes, des embryons et taux d'embryons produits in vitro.  | Fouladi-Nashta et al. (2005) |
| Vaches taries (Bos indicus)  | 180% de BE                              | 56 jours, 7 OPU à 3-4 jours d'intervalle.  | Plus grand nombre de follicules >3 mm avant OPU, plus grand nombre de follicules aspirés et de gros follicules,. Pas de différence pour le nombre d'ovocytes collectés, taux de segmentation et taux d'embryons produits in vitro en comparaison de vaches avec restriction (70% de BE).   | Martins et al. (2006)        |

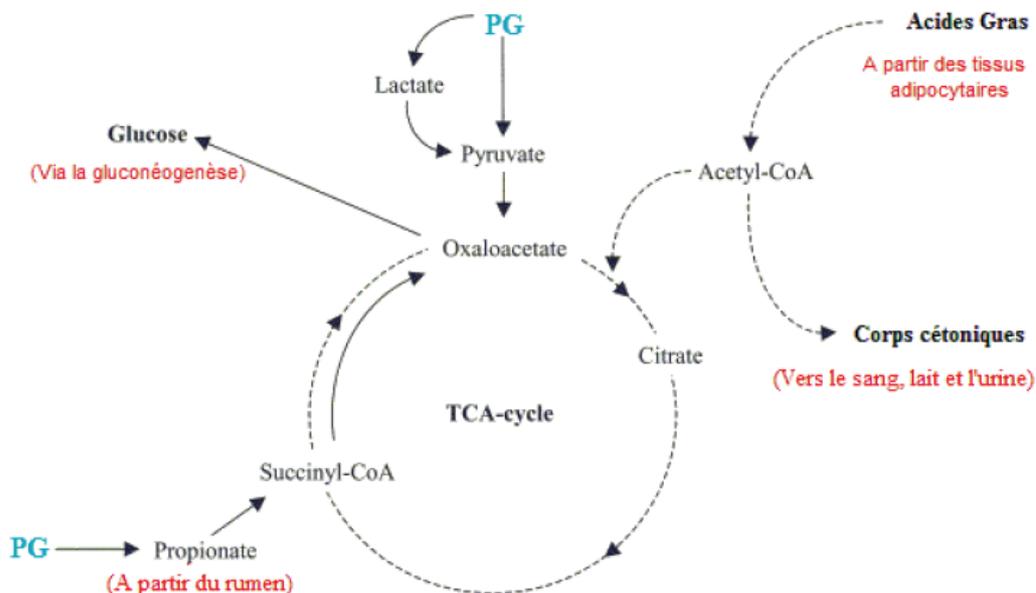
| Type Animaux                   | Régime énergie haute (suralimentation)          | Durée du régime   | Effets observés  | Références                |
|--------------------------------|---|---|--|---------------------------|
| Génisses (Nelore)              | 180% de BE                                      | 14 jours avant traitement de superovulation   | Pas d'effets sur le nombre de follicules $\geq 3$ mm au moment de la première injection de FSH, pas d'effet sur la réponse à la superovulation la production et la qualité des embryons chez les génisses avec basse ( $2,7 \pm 0,1$ ) ou haute ( $3,7 \pm 0,1$ ) condition corporelle.                        | Bastos et al. (2007)      |
| Génisses (Bos indicus)         | 170% de BE                                      | Pendant 9 semaines (superovulation commence à la semaine 7)   | Moindre réponse à la superstimulation de follicules et moindre quantité de corps jaunes après superovulation, quantité inférieure d'embryons collectés et d'embryons transférables en comparaison avec une restriction (70% de EB).  | Mollo et al. (2007)       |
| Vaches en lactation (Holstein) | H et L  | Premier régime: depuis le vêlage et jusqu'à 30 jours. Deuxième régime de 30 jours jusqu'à 120 jours post-partum | Different schémas testés: H-L ; H-H ; L-H, LL. Pas d'effet sur l'intervalle vêlage - 1 <sup>er</sup> chaleur, vêlage - 1 <sup>er</sup> IA et vêlage - gestation dans les différents schémas. taux de gestation supérieur chez de vaches ayant reçu un schéma H-L en comparaison avec les autres.               | Garnsworthy et al. (2009) |
| Vaches tarées (Nelore)         | 150% de BE (1,8% de matière sèche / kg poids)   | Quatre sessions d'OPU réalisées pendant 42 jours  | Pas de différence sur le nombre d'ovocytes récupérés et des ovocytes viables, ovocytes segmentés et la production d'embryons.  | Prata et al. (2011)       |
| Vaches tarées(Nelore)          | 150% de BE (1,8% de matière sèche /kg de Poids) | 42 jours  | Pas de différence sur la réponse à la superovulation, taux de fécondation, nombre d'embryons totaux, nombre d'embryons viables ou transférables produits in vitro et taux de blastocystes en comparaison avec des vaches en restriction alimentaire (70% de EB) ou avec une alimentation normale (100% de BE). | Surjus. (2012)            |

H: Régime pour induire hautes concentrations plasmatiques d'insuline, L: Régime pour induire basses concentrations plasmatiques d'insuline.

### 3.2.2 Propylène Glycol.

Le propylène glycol (PG) a été utilisé dans le traitement de la cétose depuis les années 1950 (Johnson, 1954 ; Maplesden, 1954) et est encore utilisé de nos jours. Plus récemment, le PG a été utilisé comme additif alimentaire par les éleveurs, les vétérinaires et les producteurs laitiers. Cela est attribuable à une augmentation de l'offre de produits des sociétés pour l'alimentation animale, qui utilisent dans les formulations d'aliments des quantités de PG conseillées pour augmenter la production de lait, prévenir la cétose et améliorer la reproduction.

Il a été montré que l'emploi du PG pouvait augmenter la concentration de propionate et diminuer le ratio acétate/propionate dans le rumen (Nielsen et Ingvarsten, 2004). Le PG doit augmenter les concentrations circulantes de glucose car le propionate produit dans le rumen, et le PG absorbé directement, peuvent être convertis en glucose via la gluconéogenèse dans le foie (Figure 31). De plus, l'augmentation de la production de glucose stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas qui diminue la mobilisation des acides gras des tissus adipeux (substrats pour la cétogenèse hépatique ; Brockman et Laarveld 1986 ; Holtenius et Holtenius, 1996).



**Figure 31. Métabolisme du propylène glycol (PG) et son interaction avec la cétogenèse dans le foie des bovins.** Les voies gluconéogéniques sont indiquées par les lignes continues (adaptée d'après Nielsen et Ingvarsten, 2004).

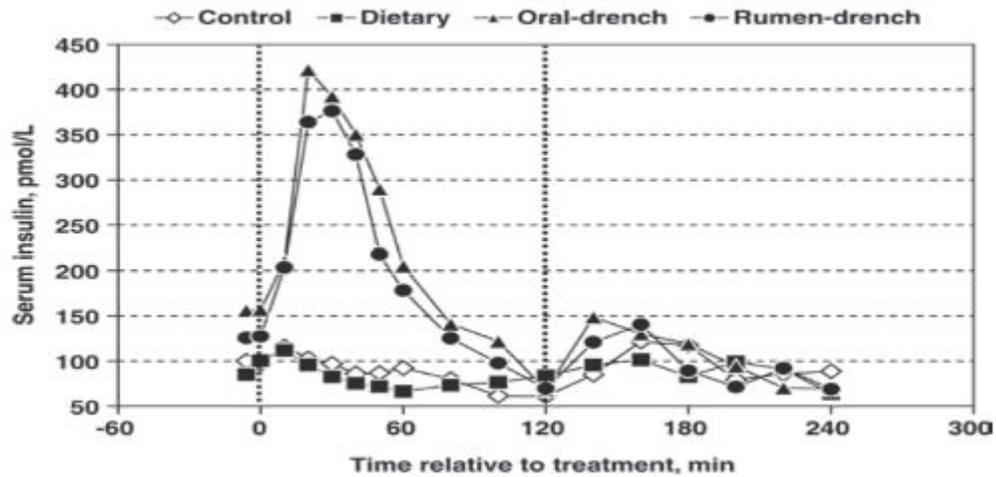
Généralement le PG augmente donc les niveaux plasmatiques du glucose, de l'insuline et diminue les taux d'acides gras non estérifiés (AGNE) et de  $\beta$ -hydroxy butyrate (BHB) (Tableau

10). Cependant, l'amplitude des réponses physiologiques peut varier entre essais. Certains essais n'ont pas observé d'effet ou seulement quelques tendances, alors que d'autres auteurs ont rapporté des effets significatifs du PG (Nielsen et Ingvarsten, 2004). Il existe différents facteurs qui peuvent faire varier la réponse d'un animal suite à l'administration de PG en particulier, la dose de PG, le stade physiologique de l'animal, le mode d'administration et les intervalles de temps entre l'administration de PG et la collecte des échantillons de sang pour doser les métabolites sont des facteurs de variation décrits dans la littérature.

En relation avec la dose de PG, Grummer et al. (1994) ont observé qu'une augmentation de PG (de 0 à 887 g par génisse et par jour) entraîne une augmentation linéaire des concentrations plasmatiques du glucose et de l'insuline et une diminution linéaire des concentrations en AGNE et en BHB. De plus, les mêmes auteurs ont rapporté un effet quadratique sur les niveaux de glucose, d'AGNE et de BHB, qui représente une diminution de réponse au PG quand les doses ont été augmentées. Christensen et al. (1997) ont observé une augmentation des niveaux d'insuline avec 307 mL de PG par jour et par génisse, avec une alimentation à base de foin, distribué de façon limitée ou à volonté.

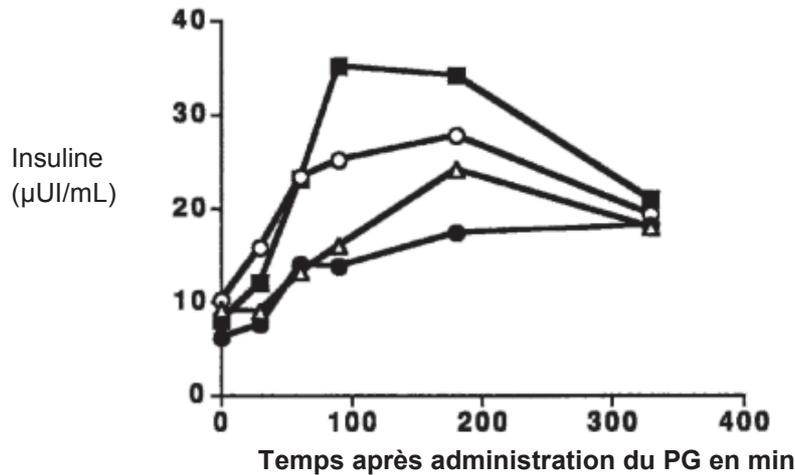
Le statut énergétique de l'animal peut également modifier la réponse périphérique pour les métabolites AGNE et BHB suite à l'administration de PG ; plusieurs auteurs n'ont pas trouvé d'effet sur les niveaux d'AGNE et de BHB lorsque l'animal est en balance énergétique positive avec des niveaux bas d'AGNE (Grummer et al., 1994 ; Christensen et al., 1997). Cependant, ce n'est pas le cas pour l'insuline, dont le niveau peut augmenter significativement après administration de PG chez des animaux avec de bas niveaux d'AGNE (Christensen et al., 1997).

Le type d'administration du PG (liquide, dans le rumen, ration totale ou poudre) a déjà été associé à des réponses différentes en ce qui concerne les modifications des concentrations l'insuline. Deux équipes ont montré qu'une supplémentation orale liquide de PG entraîne une augmentation supérieure des concentrations plasmatiques d'insuline en comparaison à un mélange de PG dans la ration complète chez la génisse et chez la vache (Chung et al., 2009 ; Christensen et al., 1997 ; Figure 32).



**Figure 32.** Concentrations sériques d'insuline de vaches nourries 12 fois par j (alimentation de base) mesurées entre 0–240 min après avoir reçu le propylène glycol en fonction du mode d'administration : mélangé au TMR (Total mixed ration, traitement = dietary), voie orale (traitement = Oral-drench), ou avec une canule dans le rumen (traitement = Rumens-drench). Les analyses statistiques ont montré : un effet du traitement (méthode d'administration):  $P < 0,01$  ; un effet du temps :  $P < 0,01$  ; une interaction traitement x temps :  $P < 0,01$ . Les lignes pointillées verticales indiquent la distribution de la ration. D'après Chung et al. (2009).

Enfin, Christensen et al. (1997) ont rapporté une augmentation supérieure de l'insuline dans le cas d'une distribution orale de PG liquide et dans le concentré par rapport à une distribution mélangée à la ration totale (Figure 33).



**Figure 33. Effet de la méthode d'administration du propylène glycol (PG) sur la concentration plasmatique d'insuline pendant une période d'alimentation restrictive (d 14).** Control (●), PGO = PG administré par voie orale en liquide (○), PGC = PG avec le concentré (■) et PGTMR = PG administré comme partie de la ration totale TMR (Δ). Différence significative entre le contrôle et tous les traitements de PG ( $P < 0,01$ ), PGO et PGC versus PGTMR ( $P < 0,01$ ). Pas d'interaction significative entre traitement et temps ( $P > 0,15$ ). L'erreur standard a été 2,7. D'après Christensen et al. (1997)

Les intervalles de temps entre l'administration du PG et les prélèvements sanguins sont des points importants pour détecter les pics plasmatiques d'insuline et de glucose. Certains auteurs ont estimé que les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose sont maximales de 15 à 30 min et de 30 à 75 min respectivement après l'administration liquide orale de PG (Studer et al., 1993 ; Grummer et al., 1994 ;). Christensen et al. (1997) ont montré que les taux plasmatiques d'insuline et de glucose varient au cours des 90 premières minutes après l'administration orale du PG, ce qui signifie que le PG est facilement disponible pour la vache et que la majorité du PG est rapidement absorbé dans le rumen et utilisé dans le foie pour la gluconéogenèse (Nielsen et Ingvarsen, 2004).

Bien que le propylène glycol puisse prévenir et traiter la cétose chez les vaches laitières, de fortes doses (> 500 g / jour) peuvent être toxiques chez les bovins (Nielsen et Ingvarsen, 2004) et d'autres herbivores. Les symptômes de ces fortes doses sont la dépression, l'ataxie, une respiration anormale (hyperventilation), une salivation excessive, une haleine fétide et anormale (Dorman and Haschek, 1991 ; Ivany et Aderson, 2001). Il paraît évident que la mauvaise haleine

est liée au soufre et l'odeur ressemble à celles de l'ail et de l'oignon (Trabue et al., 2007). De plus, compte tenu que le PG puisse avoir des effets secondaires, en particulier à des doses supérieures de 500 g par jour, certaines vaches peuvent montrer des symptômes, même à des doses inférieures à 150 g par jour (Nielsen et Ingvarsen, 2004). Ainsi, il semble que les vaches peuvent avoir une sensibilité individuelle aux effets secondaires du PG. Lors de l'utilisation de PG, s'il est mélangé aux concentrés, dans la ration TMR ou oral, il est important de prêter attention aux symptômes décrits ci-dessus, en particulier pendant les premiers jours de l'administration de PG. (Nielsen et Ingvarsen, 2004).

**Tableau 10. Effets de l'administration du propylène glycol sur les concentrations des métabolites.**

| Animaux, Type, Stade*  | Alimentation   | Méthode d'administration du PG, insuline ou IGF-1                 | Moment de distribution du PG | Durée d'application du PG | Effet de traitement |         |     |      |       |      |    | Effets observés  | Référence                 |
|--|----------------|---|------------------------------|---------------------------|---------------------|---------|-----|------|-------|------|----|--|---------------------------|
|  |                |   |                              |                           | Insuline            | Glucose | BHB | AGNE | IGF 1 | Urée | p4 |  |                           |
| Génisses (n=4), 79 jours avant vêlage, vaches (n=4), 84 jours avant vêlage | Foin limité    | PG0: 341 mL/jour/vache et 307 mL/jour/génisse (2,5 mL/kg de PV)   | 9 h avec concentré           | 4 jours                   | ↑ +                 | ↑ -     | ?   | ↓ +  | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 90 min, effet du PG plus efficace quand l'alimentation est restreinte, le taux d'insuline reste plus élevé plus longtemps comparé à PGTMR | Christensen et al. (1997) |
| Génisses (n=4), 79 jours avant vêlage, vaches (n=4), 84 jours avant vêlage | Foin limité    | PGC: 341 mL/jour/vache et 307 mL/jour/génisse (2,5 mL/kg de PV)   | 9 h avec concentré           | 4 jours                   | ↑ +                 | ↑ -     | ?   | ↓ +  | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 90 min, le taux d'insuline reste plus élevé plus longtemps comparé à PGTMR  | Christensen et al. (1997) |
| Génisses (n=4), 79 jours avant vêlage, vaches (n=4) 84 jours avant vêlage  | Foin limité    | PGTMR: 341 mL/jour/vache et 307 mL/jour/génisse (2,5 mL/kg de PV) | 9 h avec concentré           | 4 jours                   | ↑ -                 | ↑ -     | ?   | ↓    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 90 min, moins d'effet en comparaison avec PGO ou PGC  | Christensen et al. (1997) |
| Génisses (n=4), 79 jours avant vêlage, vaches (n=4) 84 jours avant vêlage  | Foin à volonté | PG0: 341 mL/jour/vache et 307 mL/jour/génisse (2,5 mL/kg de PV)   | 9 h avec concentré           | 3 jours                   | ↑ +                 | →       | →   | →    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 90 min  | Christensen et al. (1997) |
| Génisses (n=4), 79 jours avant vêlage, vaches (n=4) 84 jours avant vêlage  | Foin à volonté | PGC: 341 mL/jour/vache et 307 mL/jour/génisse (2,5 mL/kg de PV)   | 9 h avec concentré           | 3 jours                   | ↑ +                 | →       | →   | →    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 90 min  | Christensen et al. (1997) |
| Génisses (n=4), 79 jours avant vêlage, vaches (n=4) 84 jours avant vêlage  | Foin à volonté | PGTMR: 341 mL/jour/vache et 307 mL/jour/génisse (2,5 mL/kg de PV) | 9 h avec concentré           | 3 jours                   | ↑                   | →       | →   | →    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 90 min  | Christensen et al. (1997) |

## Modification de l'insuline et de l'IGF1 et impacts sur la fonction de reproduction chez les bovins

| Animaux, Type, Stade*                  | Alimentation                    | Méthode d'administration du PG, insuline ou IGF-1                       | Moment de distribution du PG       | Durée d'application du PG                           | Effet de traitement |         |     |      |       |      |    | Effets observés   | Référence              |
|--|---------------------------------|---|------------------------------------|---|---------------------|---------|-----|------|-------|------|----|---|------------------------|
|  |                                 |   |                                    |   | Insuline            | Glucose | BHB | AGNE | IGF 1 | Urée | p4 |   |                        |
| Vaches (n=17)                          | Alimentation standard selon NRC | 500 mL PGO  | 1,5 h après concentré              | 7-42 jours  | ↑                   | ↑       | -   | ↓    | -     | ↑-   | ↑  | ↑ Insuline 30 et 90 minutes après.                                      | Miyoshi, et al. (2001) |
| Génisses (n=142)<br>15-18 mois, 350 kg | ?                               | 250 mL PGO (90% pureté)   | Matin                              | 20 jours avant TE,                                  | ↑                   | →       | -   | -    | ↑     | →    | ↑  | ↑ Insuline 90 minutes après administration                              | Hidalgo et al. (2004)  |
| Vaches (n=28)                          | Alimentation standard selon NRC | 500 mL PGO  | Concentré à 9h et PGO à 15 h       | 10j avant mise bas jusqu'à 25j post-partum          | ↑↑                  | ↑       | ↓   | ↓    | -     | -    | -  | Plus effets avec BEN (après vêlage) en comparaison à un BEP (gestation) | Butler et al. (2006)   |
| Vaches (n=17)                          | Alimentation standard           | 500 mL PGO  | 2,5 h après matin traitement (7am) | 7 jours post-partum jusqu'à ovulation ou jour 35-40 | ↑                   | ↑       | ↓   | ↓    | -     | -    | -  | ↑ Insuline 30, 60 et 90 minutes après.                                  | Rizos, et al. (2008)   |
| vaches (n=8)<br>3 lactations           | 12 fois x J                     | 200 mL Oral PG/jour   | ?                                  | 4 jours (j11-j14)                                   | ↑                   | ↑       | -   | -    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 36 min   | Chung et al. (2009)    |
| vaches (n=8)<br>3 lactations           | 12 fois x J                     | 200 g sec PG mélangé avec la ration complète (TMR)                      | ?                                  | 4 jours (j11-j14)                                   | →                   | ↑       | -   | -    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 130 min  | Chung et al. (2009)    |
| Vaches (n=8)<br>3 lactations           | 12 fois x J                     | 200 g sec PG dissout dans l'eau et administré directement dans le rumen | ?                                  | 4 jours (j11-j14)                                   | ↑                   | ↑       | -   | -    | -     | -    | -  | ↑ Insuline après 26 min   | Chung et al. (2009)    |

PGO : PG oral ; PGC : PG donné avec le concentré ; PGTMR : PG donné avec la ration complète (TMR) ; → : pas de différence ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; ? : Pas précisé ; - : Pas analysé, PV : poids vif, NRC : National Research Council

### **3.2.2.1 Propylène Glycol et Reproduction.**

La supplémentation en énergie grâce à l'administration de propylène glycol augmente les niveaux plasmatiques d'insuline et IGF1. Ces hormones métaboliques peuvent agir sur l'hypothalamus et l'hypophyse pour stimuler la sécrétion des gonadotrophines (Adam et al., 2000) ou peuvent agir sur le tissu ovarien en ayant un effet synergique avec les gonadotrophines et restaurent l'activité ovarienne (Kwintkiewicz et Giudice, 2009). De plus, les niveaux d'insuline et l'IGF1 post-partum pourraient intervenir sur la santé de l'utérus à travers leur effets sur les mêmes cellules de l'utérus ou sur des cellules immunitaires essentielles à l'involution utérine (Sunahara et al., 2012 ; Himpe et al., 2013). L'administration de PG diminue les concentrations de BHB et d'AGNE, ces deux métabolites ont aussi des effets potentiels sur la reproduction (Leroy et al., 2008b ; Van Hoeck et al., 2011) et la fonction immunitaire (Grinberg et al., 2008 ; Ster et al., 2012).

Des études réalisées principalement chez des vaches après le vêlage avec un BEN ont démontré des effets positifs (Formigoni et al., 1996 ; Miyoshi et al., 2001 ; Chagas et al., 2007 ; Matras et al., 2012 ; Mc Art et al., 2012 ; Slobodanka et al., 2012 ; Borş et al., 2014) ou pas d'effet (Miyoshi et al., 2001 ; Hoedemaker et al., 2004 ; Laranja da Fonseca et al., 2004 ; Butler et al., 2006 ; Moallem et al., 2007 ; Chagas et al., 2008 ; Rizos et al., 2008 ; Lien et al., 2010 ; Umeki et al., 2012) avec la supplémentation en PG et cela en relation avec la reprise de la reproduction (Tableau 11). Bien que l'administration de PG ait la capacité de modifier positivement les concentrations systémiques d'un certain nombre de métabolites qui sont en lien avec la fertilité (augmentation de niveaux de glucose et d'insuline et diminution des niveaux de BHB et d'AGNE), des études ont révélé des effets non significatifs sur l'amélioration des paramètres reproductifs après le vêlage. Les raisons de ces variations de résultats peuvent s'expliquer par le type et la durée de l'administration du PG, l'état métabolique et le nombre et l'âge des animaux dans les expérimentations. Par exemple, dans les travaux de Miyoshi et al. (2001), il est décrit des effets positifs d'une supplémentation de PG pour allonger la phase lutéal et réduire l'intervalle vêlage-première ovulation, indiquant des effets directs rapides sur le développement folliculaire et / ou la sécrétion de LH en post-partum. Par contre, dans cette étude, il n'y a pas de différence significative entre le nombre d'inséminations fécondantes ( $1,7 \pm 0,35$  pour le groupe PG contre  $2,3 \pm 0,34$  pour le groupe témoin) et les taux de conception à la première insémination (57,1% pour le PG contre 33,0% pour le groupe témoin). L'absence de différence dans les taux de conception de cette étude était probablement due au petit nombre

d'animaux concernés. De la même façon dans les travaux de Rizos et al., (2008), le nombre d'ovocytes récupérés n'a pas été affecté par le traitement de PG et ce, malgré un taux de segmentation supérieur (68.3% vs. 58.9%) et des taux de blastocyste produits plus élevés chez les vaches ayant reçu le PG que chez les animaux témoins (25.3% vs. 14.4% respectivement), la différence n'était pas significative.

Chez les génisses, seulement deux travaux ont été réalisés à notre connaissance pour mesurer l'effet du PG sur la fonction de reproduction. L'étude d'Umiki et al. (2012) n'ont pas trouvé d'effets sur la croissance folliculaire, la formation de corps jaune et les concentrations d'œstradiol dans le sang pendant la phase folliculaire (Tableau 11). Par contre, l'étude réalisée par Hidalgo et al. (2004) rapporte un effet positif du PG sur les performances de reproduction, avec une augmentation de la qualité du CJ et un meilleur taux de gestation (57% vs. 35%) chez des génisses receveuses d'embryons.

L'effet positif du PG trouvé dans les différentes études soit chez la vache post partum ou chez les génisses peut être lié à sa propriété comme précurseur du glucose dans le rumen et stimulateur de la sécrétion d'insuline par le pancréas qui aurait un effet positif sur la fonction ovarienne. Plusieurs études ont suggéré que la disponibilité de l'insuline glucose-dépendante est impliquée dans la modulation de la sécrétion de LH pulsatile chez les ovins (Ohkura et al., 2000 ; Tanaka et al., 2000). Chagas et al. (2007) ont montré qu'une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par l'administration de propylène glycol pour une période relativement longue (150 jours) a été associée à une augmentation de la fréquence des pulses de LH chez les vaches laitières. De plus, l'insuline (Poretsky et Kalin, 1987 ; Stewart et al., 1995) et l'IGF1 (Zulu et al., 2002) stimulent la production ovarienne d'hormones stéroïdes par le follicule par l'intermédiaire de la stimulation de l'expression de récepteurs à la LH dans les cellules de la granulosa. Effectivement, Formigoni et al. (1996) ont observé une amélioration de l'activité ovarienne et une augmentation des niveaux d'IGF1 avec l'administration de PG. De la même manière, les études d'Hidalgo et al. (2004) ont mesuré une augmentation des taux de gestation associés à une augmentation des niveaux d'IGF1.

**Tableau 11. Effets de Propylène Glycol sur la fonction de reproduction chez les bovins.**

| Animaux                                  | Doses du PG                           | Durée d'administration du PG   | Effets observés  | Référence                        |
|--|---------------------------------------|--|--|----------------------------------|
| Vaches (n=20)                            | 300 g<br>300 ml                       | 10 j avant mise bas à j post -partum (300 g)<br>Jour 3, 6, 9 et 12 après vêlage (300 ml)                             | Retour plus précoce de la cyclicité, réduction de la période post-partum anovulation   | Formigoni et al. (1996)          |
| Vaches (n=17)                            | 500 ml                                | 7 à 42 jours après le vêlage   | Première phase lutéale plus longue, première ovulation a eu lieu beaucoup plus tôt, pas d'effet sur l'intervalle vêlage première IA, intervalle vêlage-vêlage, nombre d'inséminations par gestation                                    | Miyoshi et al. (2001)            |
| Vaches (n=117)                           | 150 mL PG;<br>300 mL PG;<br>100 mL PG | 13 jours avant vêlage (150 mL) ; 12 jours avant vêlage jusqu'au vêlage (300 mL) ; 1 à 12 jours après vêlage (100 mL) | Pas de différence entre le taux de conception à la première insémination, le taux de conception (pourcentage d'IA fécondante par rapport nombre d'IA totales), le taux global de gestation, et le nombre d'inséminations par gestation | Hoedemaker et al. (2004)         |
| Génisses (n=142)                         | 250 mL PGO (90% pureté)               | Pendant les 20 jours avant transfert de l'embryon  | Augmente la qualité du CJ, meilleur taux de gestation 57 (PG) vs. 35% (control).   | Hidalgo et al. (2004)            |
| Vaches (n=11)                            | 300 mL PG                             | jours -10, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 par rapport à la date de vêlage                       | Pas d'effet intervalle vêlage première chaleur   | Laranja da Fonseca et al. (2004) |
| Vaches (n=28)                            | 500 mL                                | 10j avant mise bas à 25j post-partum   | Pas d'effet sur la première vague folliculaire après le vêlage (ovulation, atrésie ou kystes)  | Butler et al. (2006)             |
| Vaches (n=80)                            | 500 gr/d                              | Avant vêlage jusqu'a 21 jours de lactation   | Pas d'effet dans le développement de follicules ovariens au cours de la période post- partum.  | Moallem et al. (2007)            |
| Génisses (n=17)                          | 500 mL                                | du vêlage à 16 semaines  | réduit l'intervalle entre le vêlage et la première ovulation chez les génisses ayant mauvaise condition corporelle au moment du vêlage   | Chagas et al. (2007)             |
| Génisses (alimentation restreinte, n=13) | 500 mL                                | du vêlage à 150 jours  | Pas d'effet sur l'intervalle vêlage - première ovulation   | Chagas et al. (2008)             |

| <b>Animaux</b> | <b>Doses du PG</b>                         | <b>Durée d'administration du PG</b>  | <b>Effets observés</b>  | <b>Référence</b>                |
|----------------|--|--|---|---------------------------------|
| Vaches (n=17)  | 500 mL                                     | 7 jours post-partum jusqu'à ovulation ou jour 35-40                                  | Pas d'effet sur la reprise de l'activité folliculaire après le vêlage et sur la qualité des ovocytes. Pas d'effet sur le nombre d'ovocytes collectés.   | Rizos et al. (2008)             |
| Vaches (n=12)  | 500 mL                                     | 7 jours avant vêlage jusqu'à 30 jours post partum                                    | Positif effet sur la condition corporelle, pas de différence entre période vêlage premier œstrus et taux de gestation   | Lien et al. (2010)              |
| vaches (n=30)  | Calcium propionate:PG (1:1)                | 2 semaines avant vêlage jusqu'à 6 semaines après vêlage                              | Diminution de l'intervalle vêlage-première insémination, diminution de l'intervalle vêlage conception et nombre d'insémination par gestation  | Matras et al. (2012)            |
| Vaches (n=372) | 300 mL                                     | Vaches diagnostiquées avec cétozes (BHB: 1,2 à 2,9 mmol/L) jusqu'à avoir <1,2mmol/L) | Augmente les probabilités de conception au premier service  | McArt et al. (2012)             |
| Vaches (n=20)  | 200 mL (Energy-plus)                       | 15 jours avant vêlage jusqu'à 30 jours post-partum                                   | Pourcentage plus élevé de taux de gestation après la première et la seconde insémination en comparaison au control.   | Slobodanka et al. (2012)        |
| Vaches (n=20)  | 160 mL (Ketal)                             | 15 jours avant vêlage jusqu'à 30 jours post-partum                                   | Pourcentage plus élevé de taux de gestation après la première et la seconde insémination en comparaison au control, Réduction du nombre d'inséminations par gestation, Réduction la durée vêlage premier service. | Slobodanka et al. (2012)        |
| Vaches (n=100) | 600 mL                                     | Jours 0-7 après vêlage   | Réduction intervalle - première chaleur (reprise de l'activité ovarienne) et intervalle vêlage-première conception  | Silviu Ionuț Borș et al. (2014) |
| Génisses (n=5) | 250 ml (90% pureté)<br>500 mL (90% pureté) | Jours 6, 7 et 8 du cycle œstral<br>Jours 10, 11 et 12 du cycle œstral                | Pas d'effet sur la croissance folliculaire, la formation de corps jaune et des concentrations d'estradiol dans le sang pendant la phase folliculaire.   | Umeki et al. (2012)             |

### **3.2.3 Autres méthodes permettant de moduler les niveaux d'insuline et d'IGF1.**

D'autres protocoles permettant d'induire une augmentation de niveaux d'insuline et d'IGF1 ont été testés chez les animaux comme la vache, chèvre et brebis et les effets sur l'état métabolique et/ou performance ovarienne ont été décrit. En particulier, l'injection directe (par voie sous cutanée ou perfusion intraveineuse), d'insuline, de glucose ou l'application intra-ovarienne d'IGF-1 ont été utilisés avec des effets positif ou négatifs (Tableau 12).

Suguna et al. (2009) ont trouvé des effets positifs avec l'administration d'insuline exogène sur la fonction ovarienne avec une augmentation du taux d'ovulation, amélioration de la stéroïdogénèse et des naissances gémellaires chez la chèvre ayant reçu une dose sous cutanée d'insuline de 0,2 IU/kg poids. De la même manière, Souza et al. (2008) ont démontré une amélioration de la qualité des embryons produits in vivo sur chèvres avec la même dose d'insuline.

D'autre part, la perfusion intraveineuse de glucose de 500 g à 1500 g par jour, administré chez les vaches entre 10 à 25 jours après vêlage, a augmenté les concentrations de glucose, d'insuline et d'IGF1 et diminué les concentration d'AGNE et de BHB dans le plasma (Lucy et al., 2013). De mêmes effets ont été observés chez la vache en milieu de lactation (Al-Trad et al., 2009). Chez les brebis, des travaux ont rapporté une amélioration de la folliculogénèse par l'augmentation du nombre de follicules de 2 à 4 mm (Muñoz-Gutierrez et al., 2002) et une augmentation du taux d'ovulation (Letelier et al., 2008) avec la perfusion intraveineuse de glucose ou d'un mélange glycogénique par voie orale pendant 5 jours.

Des effets positifs ont été plus difficilement mis en évidence avec l'application intra-ovarienne d'IGF1. Par exemple, Velazquez et al. (2011) ont observé des effets négatifs sur la compétence au développement des ovocytes chez les vaches laitières maigres après administration d'1 µg d'IGF1 par rapport aux animaux témoins. Les explications peuvent être liées au fait que les vaches maigres n'étaient pas en BEN et présentaient des niveaux élevés d'IGF1 avant l'expérimentation. Avec le traitement, l'augmentation a pu créer une microambiance similaire à ce qui se passe chez les femmes avec des ovaires poly kystiques. Les vaches grasses ont des niveaux bas de blastocystes mais ce taux n'a pas été affecté par l'injection d'IGF1. Selon les auteurs cette différence pourrait s'expliquer par les niveaux de leptine qui pourraient diminuer les concentrations d'IGF1. Effectivement des expériences in vitro ont montré que les concentrations élevées de leptine peuvent supprimer les effets stimulants de

l'IGF1 sur la stéroïdogénèse dans les cellules folliculaires ovariennes chez les bovins (Spicer et al., 2000a).

De plus, les travaux réalisés par cette même équipe avec l'administration intra-ovarienne de 6 µg d'IGF1 ont montré une diminution du taux de blastocystes chez de jeunes génisses prélevées par OPU suivi de FIV en comparaison des génisses non traitées (Zaraza et al., 2010). De la même façon, les concentrations endogènes en IGF1 de ces génisses en croissance ont été probablement trop élevées provoquant des effets négatifs avec une augmentation intraovarienne d'IGF1. Contrairement à ces études Oropeza et al.( 2004) ont démontré une amélioration de la capacité de développement des ovocytes chez les bovins prépubères. De plus, des études réalisées par Spicer et al. (2000b) avec l'administration de 2 ug d'IGF1/heure pendant 7 jours ont rapporté une augmentation des concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire des petits follicules. La taille des grands follicules a été augmentée et les concentrations d'œstradiol dans les petits follicules chez les vaches traitées avec IGF1 ont été supérieures à celles des femelles non traitées.

Tableau 12. Effets de l'administration d'insuline, glucose ou d'IGF1 sur les métabolites et la fonction de reproduction.

| Animaux, Type Stade   | Méthode d'administration de l'insuline, glucose ou IGF-1                                | Moment de distribution de l'insuline, glucose ou IGF-1               | Durée d'application d'insuline ou IGF-1   | Effets observés  | Référence                     |
|---|---|--|---|--|-------------------------------|
| vaches (n=7)<br>4-5 années                                  | OvIGF-1, 2ug IGF-1 humain/h   | le jour après ovulation (tous les follicules > 4 mm ont été aspirés) | 7 jours jusqu'à ovariectomie  | ↑ concentration folliculaire de IGF1 dans les petits follicules mais pas dans les grands au jour 7, ↑ taille grands follicules, → nombres de petits, moyens ou grands follicules (jour 2-6), ↑ estradiol dans le liquide folliculaire des petits follicules, → poids d'ovaires, ↑ P4 | Spicer et al. (2000b)         |
| Brebis (n=5)  | Perfusion intraveineuse de glucose : 50 mmol/h,   | Chaque heure   | 5 jours (jusqu'au retrait de l'éponge)  | ↑ insuline 8 heures après la perfusion et se maintient haute jusqu'à la fin du traitement. ↑ glucose immédiatement après la perfusion de glucose.  | Muñoz-Gutiérrez et al. (2002) |
| 10 animaux femelles bovins (à partir 6 mois à 15 mois)      | OvIGF-1, 6ug rhIGF1 humain/h  | 48 h avant chaque OPU  | 14 jours (4 OPU/période)  | Proportion d'ovocytes avec compétence au développement basse en comparaison au contrôle, ↑ taux des blastocystes en comparaison au traitement rbST (500 mg) et contrôle. ↑ mRNA expression of Glut1, et IF1A.  | Oropeza et al. (2004)         |
| Chèvres (n=7)   | ISC 0,2IU/kg PV/jour d'action longue d'insuline   | au même moment que injection de FSH (à 12 heures d'intervalle)       | les jours de FSH (3 jours)  | ↑ insuline, ↑ du nombre d'embryons excellents et nombre d'embryons viables en comparaison au traitement avec PG, corrélation positive avec nombre d'embryons transférables et le nombre d'ovulations.  | Souza et al. (2008)           |
| Chèvres (n=6)<br>2-3 années                                 | ISC, 0,2 IU/kg PV   | ?  | 3 jours (jour 7-9 du cycle œstral) et une application hebdomadaire jusqu'à 135 jours de gestation | → nombre des petits ou moyens follicules totaux et le diamètre de follicules moyens, ↑ diamètre des grands follicules, ↑ taux d'ovulation et nombre de CJ, ↑ œstradiol 17-B, ↑ P4, → diamètre de la vésicule embryonnaire, ↑ jumeaux, ↑ diamètre placenta                            | Suguna et al. (2009)          |
| 33 vaches laitières (maigres) et 44 vaches taries (grasses) | OvIGF-1, 1ug IGF-1 in PBS/BSA   | Avant superovulation   | 1 fois après l'aspiration des follicules >4 mm  | ↓ des embryons in vivo viables chez les vaches maigres traitées qui sont au même niveau que les vaches grasses. Blastocystes avec plus de cellules. → IGF1, → vaches grasses. ↑ transcriptome SLC2A8 et IGFBP3, ↓ P53.   | Velazquez et al. (2011)       |
| Vaches (n=8)  | Perfusion intraveineuse, doses croissantes de 500 g ; 1000 g et 1500 g de glucose /jour | Chaque heure   | 3 jours   | ↑ Insuline et glucose avec 500, 1000 et 1500 gr de glucose. ↑ IGF1 à partir de 1000gr de glucose. → glucose, insuline et IGF1, entre doses de 1000 et 1500 g/jour, ↓ BHB, AGNE   | Lucy et al. (2013)            |

ISC ; insuline, administration sous-cutanée ; OvIGF-1: IGF, administré avec contrôle osmotique mini-pompes insérés dans chaque ovaire (stroma); →, pas d'effet ; ↓, diminution ; ↑, augmentation ; ? Pas précisé.

### Chapitre 3. Hypothèse et Objectifs

#### **Hypothèse.**

Notre principale hypothèse de départ se basait sur le fait qu'une supplémentation de PG chez la génisse laitière augmenterait les niveaux de glucose, d'insuline et IGF1 dans le sang et le liquide folliculaire des donneuses d'ovocytes; ainsi modifié, l'environnement ovarien pourrait entraîner une stimulation et croissance folliculaire, une meilleure qualité ovocytaire au moment de l'OPU et par conséquent une meilleure production en quantité et en qualité des embryons. Les effets observés chez les génisses pourraient différer selon leur potentiel de réponse ovarienne, estimée par les niveaux d'AMH.

Le stade génisse a été choisi puisqu'il correspond aux besoins des schémas de sélection en race laitière; l'utilisation d'animaux jeunes est un facteur d'augmentation du progrès génétique.

#### **Objectifs.**

L'objectif global de ce travail était de mesurer les effets d'une supplémentation de PG de courte durée et des variations métaboliques associées sur la croissance folliculaire, la réponse ovarienne à la stimulation hormonale de la croissance folliculaire, la qualité des ovocytes et la production d'embryons in vitro chez des donneuses génisses de race Prim'Holstein avec différents profils d'AMH.

À cette fin, plusieurs objectifs plus spécifiques ont été proposés:

1. Préciser les relations dose – effets du propylène glycol chez les génisses laitières afin d'optimiser les concentrations et les modalités de distribution du propylène glycol, en suivant en particulier les concentrations plasmatiques des principaux métabolites et hormones impliqués dans le métabolisme énergétique et la croissance folliculaire dans l'espèce bovine.

(Etude expérimentale N°1)

2. Déterminer les effets d'une supplémentation de PG sur la croissance folliculaire, la réponse à la stimulation hormonale de la croissance folliculaire, la quantité et la qualité des ovocytes et des embryons produits in vitro, chez des génisses présentant différents profils d'AMH et soumises à une alimentation restreinte.

(Etude expérimentale N°2)

3. Evaluer les modifications induites par la supplémentation de PG sur les profils d'expression de gènes du système IGF dans les ovocytes et les cellules du cumulus, ainsi que de gènes candidats associés à la survie embryonnaire chez des blastocystes produits à partir de génisses présentant différents profils d'AMH, soumises à une alimentation restreinte.

(Etude expérimentale N°3)

**Chapitre 4**

**Etude expérimentale n°1**

**La supplémentation à court terme de propylène glycol influe sur la circulation des hormones métaboliques, les concentrations de progestérone et la croissance folliculaire chez les génisses laitières.**

**G. Gamarra** , C.Ponsart , S.Lacaze , B.LeGuienne , M.-C.Deloche , D. Monniaux ,  
A.A.Ponter

Livestock Science 162, 240–251 (2014)

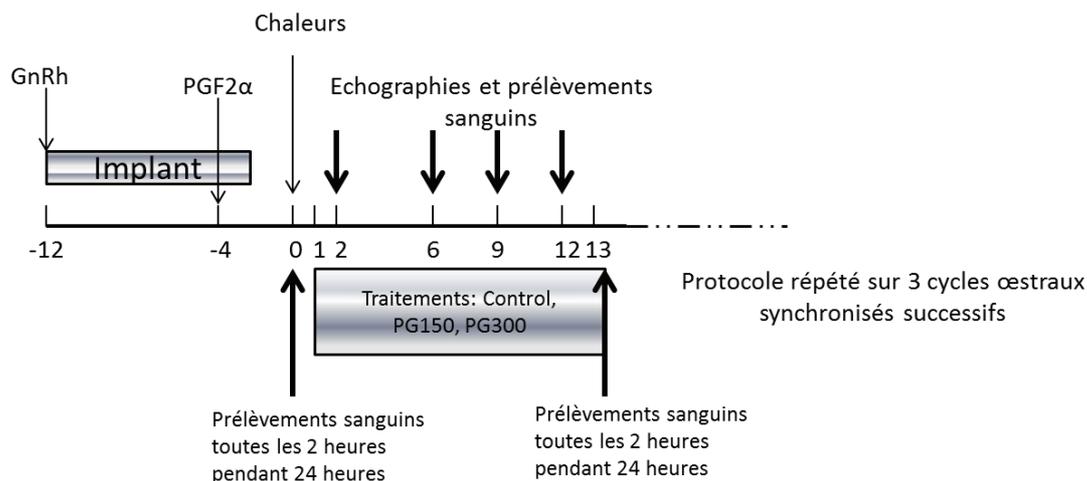
### **Résumé de l'article**

Cette étude visait à déterminer les effets du propylène glycol alimentaire (PG; Propypact, DIFAGRI, France) sur les métabolites sanguins, les hormones métaboliques, les hormones de la reproduction et sur la croissance folliculaire chez 10 génisses laitières. Les traitements consistaient à donner soit (1) 1,1 kg de pulpe de betterave (Contrôle), (2) 150 g PG (PG150) et (3) 300 g PG (PG300). Chaque génisse a reçu les trois traitements dans des ordres différents randomisés. Un régime foin / concentré standard, formulé pour permettre un gain de poids vif quotidien de 900 g / jour, a été distribué à 8h du matin, les traitements (1), (2) et (3) ont été donnés à 16h du jour 1 au jour 13 du cycle oestral suivant une chaleur induite (Jour 0). Le traitement de synchronisation de l'œstrus était composé d'un implant de 3 mg de norgestomet inséré pendant 9 jours par voie sous-cutanée combiné à un traitement GnRH (IM) lors de l'insertion de l'implant. Deux jours avant le retrait de l'implant, une injection de 500 mg de cloprosténol a été administrée (IM). Des échantillons de sang ont été prélevés par ponction veineuse jugulaire toutes les 2 h pendant 24 h aux jours 0 et 13 du cycle œstral afin de mesurer les concentrations d'insuline plasmatique, de glucose, de  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) et d'urée. Des échantillons de sang ont également été prélevés pour mesurer les concentrations d'insuline-like factor-1 (IGF1), d'œstradiol, ainsi que de progestérone aux jours 2, 6, 9 et 12 et d'AMH (hormone Anti-müllérienne) aux jours 0, 2, 6, 9 et 12 du cycle oestral. Aux jours 2, 6, 9 et 12 la croissance folliculaire ovarienne a été évaluée : le nombre total de follicules ainsi que leur diamètre ont été enregistrés et classés (2-3 mm, 4-7 mm et >8 mm). Le protocole expérimental est détaillé dans la Figure 34. Les résultats ont été analysés par analyse de variance à mesures répétées.

Il n'y avait pas de différence selon le traitement, le jour et l'interaction entre les deux sur les concentrations moyennes d'urée. Des différences ont été observées entre les jours 0 et 13 pour l'insuline, le glucose et le BHB. Les concentrations d'insuline et de glucose étaient plus élevées au jour 13 par rapport au jour 0 et diminuées pour BHB. Des effets du traitement, du temps et l'interaction entre les deux sur le glucose et les concentrations de BHB mesurées sur 24 h ont été observées au 13<sup>ème</sup> jour du cycle ; les concentrations de glucose étaient plus élevées ( $P < 0.05$ ) à 4h, 8h, 12h, 16h et 20h, alors que les concentrations en BHB étaient plus faibles ( $P < 0.05$ ) à 20h et à 22h dans le groupe PG300 par rapport aux groupes contrôle et PG150. Des effets du traitement, du jour du cycle et une interaction entre les traitements et le

jour ont été observés sur les concentrations d'IGF1, la concentration en progestérone, et sur le nombre de petits follicules. La supplémentation PG150 a entraîné des concentrations plus élevées en progestérone les Jours 9 et 12, et plus de petits follicules le Jour 2 par rapport au contrôle. Les concentrations d'AMH n'ont pas été affectées par le jour du cycle œstral et le traitement alimentaire. Cependant, une corrélation négative a été observée entre les concentrations d'insuline avant distribution de PG et l'AMH ( $r = 0,47$ ,  $P < 0.05$ ). Ces résultats indiquent qu'une supplémentation de courte durée de PG affecte les concentrations circulantes de métabolites et des hormones métaboliques ; augmente les concentrations en progestérone ainsi que le nombre de petits follicules.

Une supplémentation en propylène glycol stimule la croissance folliculaire et pourrait être efficace pour améliorer la production d'ovocytes lorsqu'elle est combinée avec des traitements hormonaux.



**Figure 34. Protocole expérimental chez des génisses laitières soumises à une alimentation normale (900 g/j).** Le jour des chaleurs induites a été défini comme jour de référence (J0) et indique le début des traitements (contrôle, PG150, PG300) jusqu'au jour 13, sur 3 cycles œstraux synchronisés successifs. Des prélèvements sanguins ont été réalisés le jour 0 et jour 13 toutes les 2 heures pendant 24 heures et les jours des échographies des ovaires (J2, J9, J6 et J12).

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

## Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers



G. Gamarra<sup>a</sup>, C. Ponsart<sup>a</sup>, S. Lacaze<sup>b</sup>, B. Le Guienne<sup>a</sup>, M.-C. Deloche<sup>a</sup>,  
D. Monniaux<sup>c,d,e,f</sup>, A.A. Ponter<sup>g,h,\*</sup>

<sup>a</sup> UNCEIA Département Recherche et Développement, 13 rue Jouet, 94704 Maisons-Alfort cedex, France

<sup>b</sup> MIDATEST, Domaine de Sensacq cedex 55A, 64230 Denguin, France

<sup>c</sup> INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR7247, 37380 Nouzilly, France

<sup>e</sup> Université François Rabelais de Tours, 37041 Tours, France

<sup>f</sup> IFCE, 37380 Nouzilly, France

<sup>g</sup> Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, 94704 Maisons-Alfort cedex, France

<sup>h</sup> INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 November 2013

Received in revised form

15 January 2014

Accepted 18 January 2014

## Keywords:

Propylene glycol

Insulin

Anti-Müllerian hormone

Follicle growth

Dairy heifers

Oocyte

## ABSTRACT

This study was designed to determine the effects of dietary propylene glycol (PG; Propypact<sup>®</sup>, DIFAGRI, France) on blood metabolites, metabolic and reproductive hormones and follicular growth in 10 dairy heifers. Treatments consisted of (1) 1.1 kg of sugar beet pulp (Control), (2) 150 g PG (PG150) and (3) 300 g PG (PG300). Each heifer received the three treatments in different randomized orders. A standard hay/concentrate diet, formulated to allow a daily liveweight gain of 900 g/day, was given at 8:00 and the dietary treatments were given at 16:00 from Days 1 to 13 of the oestrous cycle following induced oestrus (Day 0). Oestrus induction treatment consisted of a subcutaneous 3 mg norgestomet implant inserted for 9 days combined with GnRH treatment (i.m.) at implant insertion. Two days before implant removal, 500 µg cloprostenol was administered i.m. Blood samples were collected by jugular venipuncture every 2 h for 24 h on Days 0 and 13 to measure plasma insulin, glucose, β-hydroxybutyrate (BHB) and urea concentrations. Blood samples were also collected to measure insulin-like growth factor-1 (IGF-1), oestradiol, progesterone concentrations on Days 2, 6, 9 and 12 and AMH (Anti-Müllerian hormone) on Days 0, 2, 6, 9 and 12. On Days 2, 6, 9 and 12 ovarian follicular growth was evaluated; the total number of follicles and their diameters were recorded and classed (2–3 mm, 4–7 mm, and > 8 mm). Results were analysed by repeated-measures ANOVA. There were no treatment, day and interaction effects on average urea concentrations while there were some differences between Days 0 and 13 for insulin, glucose and BHB. Insulin and glucose concentrations were higher on Day 13 compared to Day 0 and the opposite was observed for BHB. There were treatment, time and interaction effects on glucose and BHB concentrations measured over 24 h on Day 13; glucose concentrations were higher ( $P < 0.05$ ) at 4:00, 8:00, 12:00, 16:00 and 20:00 h, whereas BHB concentrations were lower ( $P < 0.05$ ) at 20:00 and 22:00 h in the PG300 group compared to the control and PG150 groups. There were treatment, day and interaction effects on IGF-1 and progesterone concentrations, and the number of small follicles. PG150 resulted in higher

\* Corresponding author at: Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, 94704 Maisons-Alfort cedex, France. Tel.: +33 0 143967079.

E-mail address: [aponter@vet-alfort.fr](mailto:aponter@vet-alfort.fr) (A.A. Ponter).

progesterone concentrations on Days 9 and 12, and more small follicles on Day 2 compared to Control. AMH concentrations were unaffected by day of oestrous cycle and dietary treatment. However a negative correlation was observed between pre-PG distribution insulin and AMH ( $r = -0.47$ ,  $P < 0.05$ ). These results indicate that short-term dietary PG supplementation affects circulating concentrations of metabolites and metabolic hormones, increases progesterone concentrations and the number of small follicles. Propylene glycol supplementation may be effective in improving oocyte production when combined with hormonal treatments to stimulate follicular growth for super-ovulation or ovum-pick up.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

It has long been recognised that the nutritional and metabolic statuses of domestic ruminant females are associated with reproductive success, but the underlying mechanisms remain poorly understood (Gutierrez et al., 1997; Gong, 2002; Adamiak et al., 2005). Several authors have proposed that metabolic signals, such as circulating concentrations of insulin, growth hormone (GH), leptin and the insulin-like growth factor system (IGF) interact at the central level to modulate the release of gonadotrophins (Schneider, 2004; Garnsworthy et al., 2008). In vitro studies have highlighted the fact that insulin and IGF-1 are important mediators of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and embryonic development (Gong et al., 1993; Totey et al., 1996). Exogenous insulin administration increases the recruitment of follicles in response to gonadotropin (Cox et al., 1987) and also rescues follicles from atresia and therefore increases the number of ovulatory follicles (Matamoros et al., 1991). Therefore, an increase in the levels of insulin during the oestrous cycle may enhance follicle numbers. However, Freret et al. (2006) observed that diets that increased insulin concentrations decreased oocyte quality. Nevertheless, an increase in insulin concentrations over a short lapse of time has been shown to have a positive effect on the growth of small follicles prior to superovulatory treatment and exerts a beneficial influence on subsequent embryonic development (Adamiak, 2005; Freret et al., 2006).

Plasma concentrations of glucose and insulin are known to increase in response to dietary propylene glycol (PG) (Studer et al., 1993; Formigoni et al., 1996; Miyoshi et al., 2001). PG is a gluconeogenic precursor widely used in the prevention and treatment of ketosis. It increases the molar percentage of ruminal propionate in postpartum dairy cattle and reduces plasma non-esterified fatty acids (NEFA, Christensen et al., 1997; Grummer et al., 1994). After oral administration, a portion of PG is fermented in the rumen to propionate, but the majority of PG escapes the rumen untransformed and is converted to glucose by the liver (Rizos et al., 2008). High levels of glucose stimulate pancreatic insulin secretion which in turn reduces plasma NEFA if animals are mobilising adipose tissue reserves. However, there is another mechanism of action described for PG, involving the production successively of propionate together with propanol and with the latter being converted to propanol in the rumen which in turn is converted to propionate in the liver and thereafter glucose (Kristensen and Raun, 2007). In addition they proposed that propanol may create a relative 'insulin-resistance' thereby

blocking the uptake of glucose by insulin-sensitive tissues and therefore causing glucose concentrations to rise. PG is commonly administered as an oral drench however supplying PG with concentrate is more practical because this method requires less labour than drenching (Christensen et al., 1997). Studies on ewes have shown that oral glucogenic supplements can stimulate follicle growth and ovulation rate (Letelier et al., 2008a, 2008b) and improve oocyte quality, as estimated by in vitro development and blastocyst output (Berlinguer et al., 2012). The authors concluded that the effects were mediated by a transient improvement in energy balance.

The aim of this study was to determine the effects of short-term dietary propylene glycol on metabolic hormones (insulin, IGF-1), on subsequent follicular growth together with blood metabolites (glucose,  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), and urea) and reproductive hormones (progesterone, oestradiol, AMH) in dairy heifers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

All experimental work was performed in the experimental Station of the Regional Union of Breeding Coops for Genetic Improvement and Animal Service (MIDAT-EST), in the south-west of France. Ten Holstein dairy heifers were used for the study. At the start of the experiment the heifers were:  $14 \pm 1$  months old, weighed  $332 \pm 26$  kg and had a body condition of score of  $2.8 \pm 0.7$  (BCS; on scale from 0 = thin to 5 = fat, Bazin, 1984). Heifers were confirmed to be cyclic by rectal palpation before being introduced into the experimental station. Prior to the experimental period they were housed together indoors and fed a maintenance diet composed of natural prairie hay and a commercial concentrate. During the experiment, the heifers were housed individually and given the experimental treatments. Water was available ad libitum. The present study was carried out according to French legislation on animal experimentation (code rural: articles R 214-87–R214-94) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

### 2.2. Experimental protocol

After a dietary transition and adaptation period of 3 weeks, each group of heifers received individually a commercial

concentrate and natural prairie hay (Table 1), designed to allow a liveweight (LW) gain of about 900 g/day. Heifers were fed at 8:00 h. Three experimental treatments were given: (1) control: 1.1 kg of sugar beet pulp; (2) PG150: 150 g of propylene glycol (PG, Propypact<sup>®</sup>, DIFAGRI, France) and (3) PG300: 300 g of PG. The 1.1 kg of sugar beet pulp was chosen as a positive control since it was iso-energetic with the PG300 treatment. Although it provided the same amount of energy as PG300, the source of energy was not the same (fibre vs. PG) and therefore it should not increase circulating glucose and insulin concentrations. Sugar beet pulp produces mainly but not exclusively acetate when fermented in the rumen, and acetate is not a precursor for glucose production and therefore will not increase insulin. The treatments were given at 16:00 h. This time was chosen in an effort to extend the postprandial (meal given at 8:00 h) increase in circulating insulin and glucose in the case of the PG treatments. The method of PG administration was chosen to achieve both rapid arrival in the rumen associated with ease of administration. Oral drenching can be used to provide PG rapidly but it obviously requires more labour. PG adsorbed onto a carrier was a compromise. The experiment was conducted over three oestrous cycles for periods of 13 days. There was a pause of 6 days between the last blood sample, taken on Day 13, and the start of the next oestrous synchronization treatment. To avoid a period effect, each heifer received all the treatments in a random order. Between each experimental period the animals were fed with the concentrate and natural prairie hay. Heat synchronization was performed before each

**Table 1**  
Ingredient and nutrition composition of the concentrate

| Ingredient (% of DM)              |      |
|-----------------------------------|------|
| Wheat bran                        | 19.4 |
| Corn distiller's grain            | 17.9 |
| Sunflower meal                    | 15.9 |
| Corn meal                         | 14.6 |
| Wheat bran                        | 8.6  |
| Rapeseed meal                     | 6.2  |
| Corn                              | 5.4  |
| Cereal by-product                 | 18.9 |
| Molasses                          | 1.9  |
| SANDI 25 <sup>a</sup>             | 0.5  |
| Salt                              | 0.4  |
| Min. + vit. <sup>b</sup>          | 3.0  |
| Nutrient composition (/kg as fed) |      |
| NE <sub>L</sub> (Mcal)            | 1.53 |
| PDIN (g)                          | 125  |
| PDIE (g)                          | 120  |
| P (g)                             | 6    |
| Ca (g)                            | 12   |
| Starch (g)                        | 200  |
| Crude fibre (g)                   | 96   |

NE<sub>L</sub> = net energy for maintenance and lactation.

PDIN = intestinal digestible proteins, when degraded N is the limiting factor.

PDIE = intestinal digestible proteins, when energy is the limiting factor.

<sup>a</sup> Mineral and vitamin mix (per kilogram of mix): 11 mg Fe, 0.93 mg I, 0.40 Co, 13 mg Cu, 63 mg Mg, 60 mg Zn, 0.10 mg Se, 20 mg Vitamin E, 10 mg Vitamin B<sub>1</sub>, 1000 UI Vitamin A, 1000 UI Vitamin D<sub>3</sub>.

<sup>b</sup> Mineral and vitamin mix (per kilogram of mix): 6% P, 21% Ca, 3.2% Na, 230 mg Cu chelates, 86 mg I, 37 mg Co, 13 mg 160 mg Cu, 400 mg Mn, 730 mg Zn, 14 mg Se, 6 mg Se org, 1250 UI Vitamin E, 513000 UI Vitamin A, 114000 UI Vitamin D<sub>3</sub>, 1250 UI Vitamin C, 2000 mg β-carotene.

experimental period with subcutaneous 3 mg Norgestomet implants (Crestar; Intervet, Angers, France) inserted under the convex surface of the ear for 9 days. On the day of implant insertion, heifers received an i.m. injection of 2 mL de GnRH (Receptal; Intervet, Angers, France). Two days before implant removal, they received 500 µg cloprostenol i.m. (Estrumate; Schering-Plough Vétérinaire, Levallois-Perret, France). Oestrus occurred two days after implant removal.

### 2.3. Blood sampling

Blood samples were collected by jugular venipuncture, every 2 h over 24 h on Day 0 (oestrus = day before treatment started) and on Day 13 (last day of dietary treatment) to be assayed for insulin, glucose, BHB and urea. Blood samples were also collected on Days 0, 2, 6, 9 and 12 to be assayed for IGF-1 and AMH and on Days 2, 6, 9 and 12 to be assayed for oestradiol and progesterone. Blood samples were collected into heparinized tubes and centrifuged immediately at 1350 g for 10 min at 4 °C to collect plasma for all the analyses except for AMH for which we used EDTA blood sampling tubes. Plasma aliquots were stored at –80 °C until required for analysis.

### 2.4. Ultrasonography

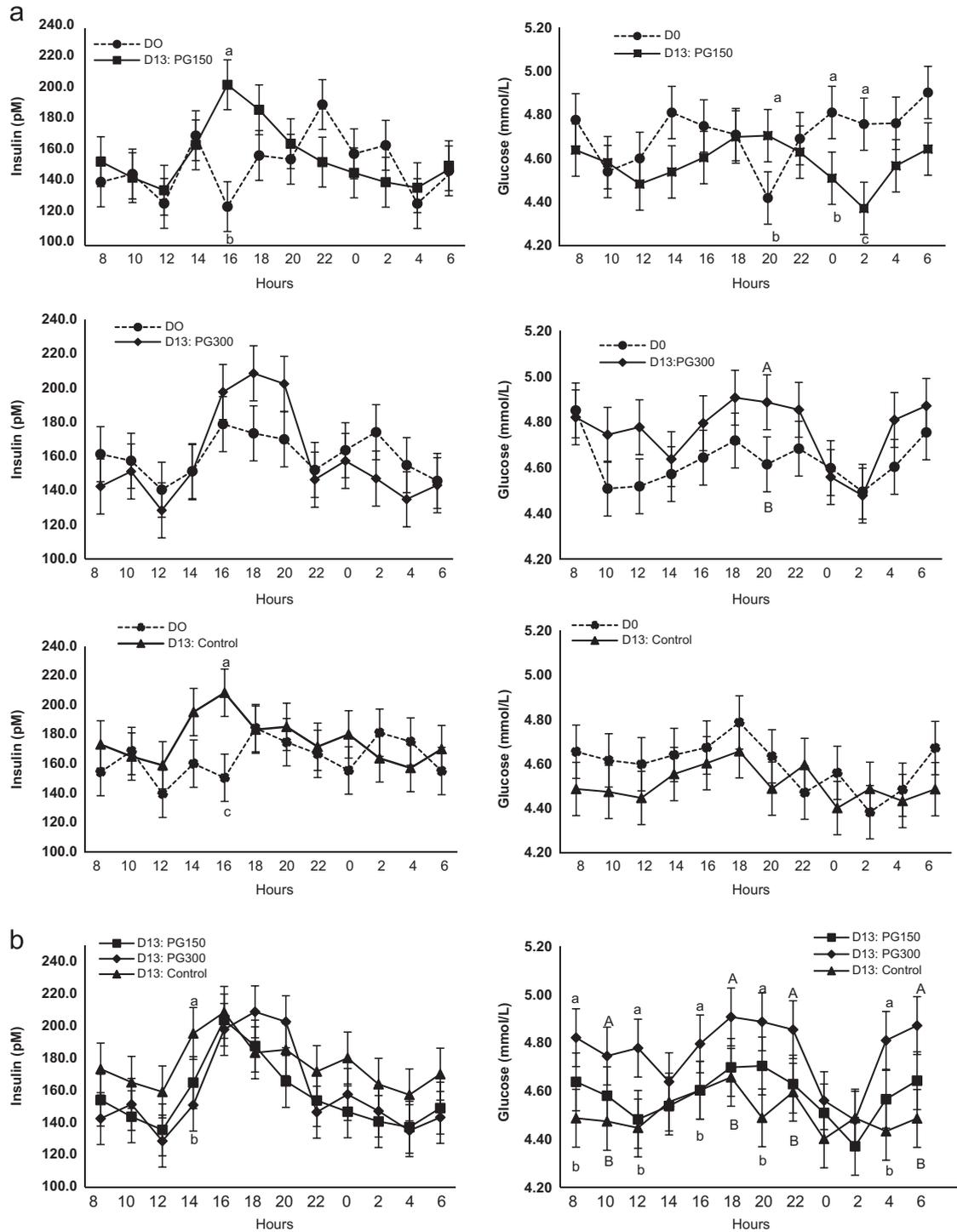
Ovarian follicular growth was monitored on Days 2, 6, 9 and 12. Total number of visible (> 2 mm diameter) follicles and their diameters were recorded and classed in to one of three groups (2–3 mm, 4–7 mm and ≥ 8 mm). Ovarian follicles were visualised by transrectal real-time ultrasonography using a 5/7.5 MHz transducer Tringa 50S VET (Esote Pie Medical, Hospimedi, Valdampierre, France) performed by the same operator.

### 2.5. Assays

Blood samples were analysed by photometric methods for glucose (Glucose – RTU; BioMérieux, Lyon, France), urea (Urea-kit S; BioMérieux, Lyon, France) and BHB (method adapted from Barnouin et al., (1986)). Insulin and IGF-1 were analysed by radioimmunoassays based respectively on porcine insulin (Insulin-CT; MP Biomedicals – Orangeburg, NY 10962, USA) and human recombinant IGF-I (IGF1-RIACT; CIS Bioassays, France).

Inter-assay coefficients of variation were 4.3% at 3.47 mM, 8.3% at 2.99 mM, 6.5% at 0.82 mM, 12.2% at 76.7 pM and 3.8% at 39.1 ng/mL for glucose, urea, BHB, insulin and IGF-1 respectively. Corresponding intra-assay coefficients of variation were 1.3% at 3.47 mM, 3.4% at 2.99 mM, 1.8% at 0.82 mM, 7.1% at 77.5 pM and 3.8% at 49.3 ng/mL.

Blood samples collected at the same time as ultrasonography were analysed by enzyme immunoassay for progesterone (Ovucheck plasma; Biovet) and by radioimmunoassay for oestradiol as previously described by Grimard et al. (1995). Intra-assay coefficients of variation were 6.91% at 6.6 ng/mL and 6.7% at 60 pg/mL for



**Fig. 1.** Plasma concentrations of insulin and glucose in heifers (a) measured every 2 h on Day 0 (basal period) and Day 13 (treatment period, after either: ▲, Control,  $n=10$  or ■, PG150,  $n=10$  or ♦, PG300,  $n=10$ ) and (b) measured every 2 h on Day 13 to compare the effect of treatment (▲, Control,  $n=10$  or ■, PG150,  $n=10$  or ♦, PG300,  $n=10$ ). Control and PG were administered at 16:00 h (PG=propylene glycol). a,b ( $P < 0.05$ ); a,c ( $P < 0.01$ ), A,B trend ( $P < 0.1$ ) between treatments for a given time point.

progesterone and oestradiol respectively. Corresponding inter-assay coefficients of variation were 11.96% at 6.9 ng/mL and 8.8% at 60 pg/mL.

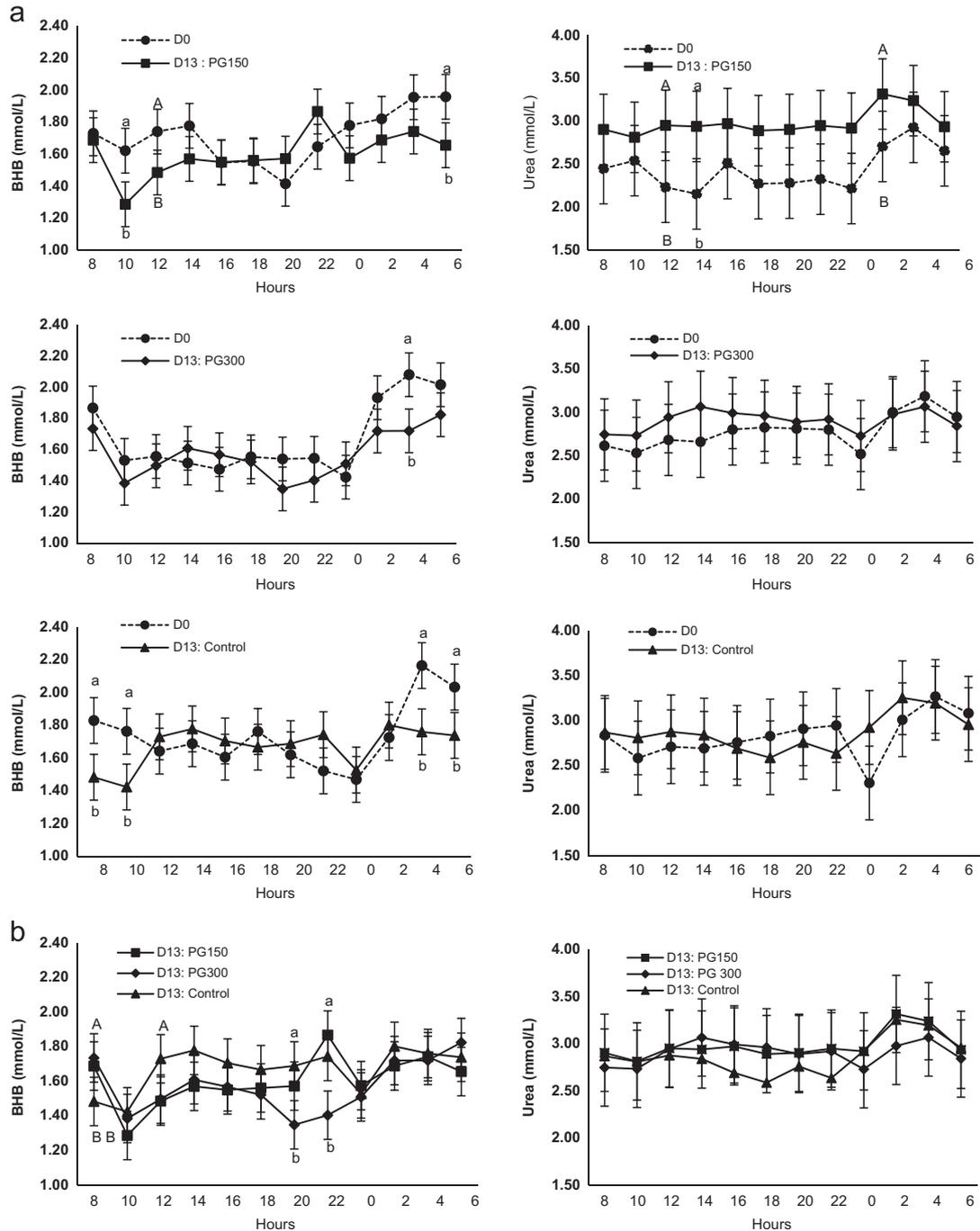
Plasma concentrations of AMH were determined using the Active MIS/AMH ELISA kit (Beckman Coulter France,

Roissy CDG, France), as described previously (Monniaux et al., 2008). AMH concentrations were determined in 50  $\mu$ L undiluted plasma. The intra-assay CV was 11.8% and 3.6% for quality control plasma samples containing 33 and 125 pg/mL AMH, respectively.

2.6. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using a linear mixed model, with the MIXED procedure of the SAS software (SAS Institute, 2000) for repeated measures, including a random female effect in all the models. Effect of experimental group, sequence and their interaction were tested

on follicular characteristic, metabolic and reproductive hormone plasma concentrations (least square means (LS means) of the interaction were subsequently compared with the contrast statement of the mixed procedure and using Scheffe's test for multiple comparisons). The mean integrated area under the concentration (AUC) vs. time curve for insulin was calculated on Day 0 using the



**Fig. 2.** Plasma concentrations of  $\beta$ -hydroxy butyrate (BHB) and urea in heifers (a) measured every 2 h on Day 0 (basal period) and Day 13 (treatment period, after either:  $\blacktriangle$ , Control,  $n=10$  or  $\blacksquare$ , PG150,  $n=10$  or  $\blacklozenge$ , PG300,  $n=10$ ) and (b) measured every 2 h on Day 13 to compare the effect of treatment ( $\blacktriangle$ , Control,  $n=10$  or  $\blacksquare$ , PG150,  $n=10$  or  $\blacklozenge$ , PG300,  $n=10$ ). Control and PG were administered at 16:00 h (PG=propylene glycol). a,b ( $P < 0.05$ ); A,B trend ( $P < 0.1$ ) between treatments for a given time point .

trapezoidal rule (Morgan et al., 1988). Results are presented as LS means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). A  $P \leq 0.05$  was significant while  $0.05 < P < 0.10$  was considered to be a trend.

### 3. Results

#### 3.1. Growth rate, body weight and, BCS

At the start of experiment, the mean LW observed for group 1 was  $328 \pm 16$  kg and BCS was  $2.9 \pm 0.1$ , for group 2, LW was  $335 \pm 35$  kg and BCS was  $2.6 \pm 0.2$  and for group 3, LW was  $333 \pm 29$  kg and BCS was  $2.7 \pm 0.4$ . At the end of the experiment for group 1, LW was  $462 \pm 21$  kg, BCS was  $3.0 \pm 0.1$  and LW gain observed was  $1008 \pm 182$  g/day, for group 2, LW was  $460 \pm 45$  kg, BCS was  $2.9 \pm 0.1$  and LW gain observed was  $944 \pm 129$  g/day and for group 3, LW was  $453 \pm 35$  kg, BCS was  $2.9 \pm 0.1$  and LW gain observed was  $902 \pm 42$  g/day. There were no significant differences between treatment groups for these parameters.

#### 3.2. Plasma concentrations of metabolites and metabolic hormones

The evolution in plasma concentrations of metabolites on Day 0 and Day 13 are presented in Figs. 1 and 2.

There were some treatment, day, and interaction effects on mean insulin and glucose concentrations measured on Days 0 and 13 (Fig. 1a). Insulin concentrations were higher ( $P < 0.05$ ) at 16:00 h in PG150 and Control heifers on day 13 compared to Day 0 while, glucose concentrations were higher ( $P < 0.05$ ) in PG150 and tended to be higher ( $P < 0.1$ ) in PG300 at 20:00 h on Day 13 compared to Day 0.

There were no systematic treatment, time, and interaction effects on insulin concentrations during a 24 h period on Day 13. However there were treatment, time, and interaction effects on glucose concentrations obtained over the 24 h period on Day 13; glucose concentrations were higher ( $P < 0.05$ ) at 4:00, 8:00, 12:00, 16:00 and 20:00 h, and tended to be higher ( $P < 0.1$ ) at 6:00, 18:00 and 22:00 h in the PG300 group when compared to the Control group (Fig. 1b).

There were some treatment, day, and interaction effects on mean BHB concentrations measured on Days 0 and 13. BHB concentrations were lower ( $P < 0.05$ ) at 10:00, and 6:00 h in PG150, at 4:00 h in PG300 and at 8:00, 10:00, 4:00 and 6:00 h in Control heifers on Day 13 compared to Day 0. There were no treatment, day and, interaction effects on average urea concentrations measured on the same days (Fig. 2a).

There were treatment, time, and interaction effects on BHB concentrations obtained over a 24 h period on Day 13. BHB concentrations were lower ( $P < 0.05$ ) at 20:00 and 22:00 h in PG300 when compared to Control (Fig. 2b).

In addition, a treatment  $\times$  time interaction was observed over the 6 h period following PG administration, indicating that plasma glucose concentrations increased ( $P < 0.05$ ) and tended to increase ( $P < 0.1$ ) for groups supplemented with respectively, PG300 and PG150 compared to Control (Fig. 3).

The evolution in IGF-1 plasma concentrations on Days 0, 2, 6, 9 and 12 of the oestrous cycle is illustrated in Fig. 4. Significant differences were observed on Day 6 with an increase in IGF-1 in PG150 compared to Control ( $P < 0.05$ ). No difference between treatments was observed for the other days.

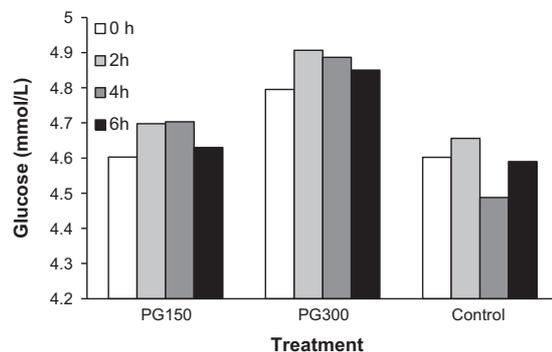
A positive correlation was observed between the AUC of plasma insulin concentrations on day 13 and average plasma IGF-1 concentrations measured throughout the experiment ( $r = 0.43$ ;  $P < 0.05$ ).

#### 3.3. Plasma concentrations of reproductive hormones

No differences were observed for plasma oestradiol concentrations between treatments on Days 2, 6, 9 and 12 of the oestrous cycle. Progesterone was higher on Day 9 and 12 in PG150 compared to Control heifers ( $P < 0.05$ ). As expected progesterone increased as the oestrous cycle progressed in the three treatment groups (Table 2). The average PG150+PG300 progesterone concentrations were higher than the Control on Day 9 and 12 ( $8.0 \pm 0.8$  ng/mL vs.  $6.3 \pm 0.8$  ng/mL and  $10.1 \pm 0.8$  ng/mL vs.  $8.2 \pm 0.8$  ng/mL;  $P < 0.05$  respectively).

#### 3.4. Ovarian follicular growth and its relationship with plasma concentrations of AMH

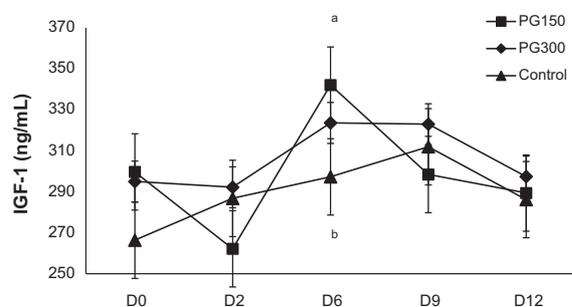
Follicle characteristics are presented in Table 3. Differences in the number of follicles between treatments were observed on Day 2 of the oestrous cycle: number of small follicles (2–3 mm) tended to be higher in PG150 compared with Control ( $P < 0.1$ ), the number of medium follicles (4–7 mm) was lower in PG150 compared with PG300 and tended to be lower in Control and, the number of large follicles ( $\geq 8$  mm) tended to be lower in PG150 compared with Control. No significant difference was found between treatments on Days 6, 9 and 12 for all sizes of follicles. The number of large follicles increased with advancing days of the oestrous cycle in all treatment groups.



**Fig. 3.** Effect of dietary treatment on plasma glucose concentrations measured in heifers at 0, 2, 4 and 6 h post-feeding on D13 of a synchronized oestrus cycle. D0 refers to the start of the oestrus cycle. Treatments were given at 16:00 h. Each heifer received randomly each treatment in turn. (PG=propylene glycol). There was a treatment  $\times$  time interaction ( $P < 0.05$ ). Standard error across all time points was 0.12 for each treatment.

The average numbers of small follicles for PG300+PG150 on Day 2 tended to be higher than Controls ( $8.5 \pm 1.6$  vs.  $5.6 \pm 1.6$ ;  $P < 0.1$ ).

No significant effects of PG were observed on AMH concentrations on Days 0, 2, 6, 9 and 12 of the oestrous cycle (Table 2). A positive correlation was observed between plasma AMH concentrations and the total numbers of 2–7 mm follicles ( $r=0.36$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 5). When heifers were allocated to one of three groups depending on plasma AMH concentrations on day 0 of the oestrous cycle (low ( $< 100$ ), medium (100–200) and high ( $> 200$  pg/mL)) there were higher numbers of 2–7 mm follicles in the medium and high plasma AMH group compared to the low AMH group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6).



**Fig. 4.** Effect of dietary treatment (▲, Control,  $n=10$  or ■, PG150,  $n=10$  or ◆, PG300,  $n=10$ ) on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations measured at 07:00 h in heifers on 0, 2, 6, 9 and 12 days of a synchronized oestrus cycle. D0 refers to the start of the oestrus cycle. Treatments were started on D1 and given at 16:00 h. Each heifer received randomly each treatment in turn (PG=propylene glycol). a,b ( $P < 0.05$ ).

### 3.5. Relationship between plasma AMH concentrations and insulin

A negative correlation was observed between the AUC of plasma insulin and plasma AMH concentrations on Day 0 ( $r = -0.47$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 7). When heifers were allocated to

**Table 3**

Effect of dietary treatment (Control,  $n=10$  or PG150,  $n=10$  or PG300,  $n=10$ ) on the number of follicles 2–3 mm, 4–7 mm and  $\geq 8$  mm during synchronized oestrous cycles (mean  $\pm$  standard deviation).

| Follicular size       | Day of Cycle | Control            |        | PG150              |        | PG300              |        |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|
|                       |              | LS mean            | S.E.M. | LS mean            | S.E.M. | LS mean            | S.E.M. |
| Follicles 2–3 mm      |              |                    |        |                    |        |                    |        |
|                       | 2            | 5.6 <sup>P</sup>   | 1.6    | 9.0 <sup>O</sup>   | 1.6    | 7.9                | 1.6    |
|                       | 6            | 5.3                | 1.6    | 7.5                | 1.6    | 6.2                | 1.6    |
|                       | 9            | 5.6                | 1.6    | 6.7                | 1.6    | 5.7                | 1.6    |
|                       | 12           | 4.5                | 1.6    | 7.2                | 1.6    | 4.3                | 1.6    |
| Follicles 4–7 mm      |              |                    |        |                    |        |                    |        |
|                       | 2            | 3.8 <sup>a,P</sup> | 0.7    | 2.0 <sup>x,O</sup> | 0.7    | 3.9 <sup>a,y</sup> | 0.7    |
|                       | 6            | 1.2 <sup>b</sup>   | 0.7    | 1.5                | 0.7    | 1.5 <sup>b</sup>   | 0.7    |
|                       | 9            | 1.3                | 0.7    | 0.5                | 0.7    | 1.5                | 0.7    |
|                       | 12           | 1.9                | 0.7    | 1.3                | 0.7    | 1.7                | 0.7    |
| Follicles $\geq 8$ mm |              |                    |        |                    |        |                    |        |
|                       | 2            | 1.2 <sup>P</sup>   | 0.3    | 0.4 <sup>O</sup>   | 0.3    | 0.6                | 0.3    |
|                       | 6            | 1.1                | 0.3    | 0.8                | 0.3    | 0.9                | 0.3    |
|                       | 9            | 0.9 <sup>a</sup>   | 0.3    | 0.8 <sup>a</sup>   | 0.3    | 1.1                | 0.3    |
|                       | 12           | 1.8 <sup>b</sup>   | 0.3    | 2.1 <sup>b</sup>   | 0.3    | 1.7                | 0.3    |

Columns with different superscript letters (a,b) are significantly different ( $P < 0.05$ ); rows with different superscript letters (x,y) are significantly different ( $P < 0.01$ ); rows with different superscript letters (O,P) tend to be different ( $P < 0.1$ ).

**Table 2**

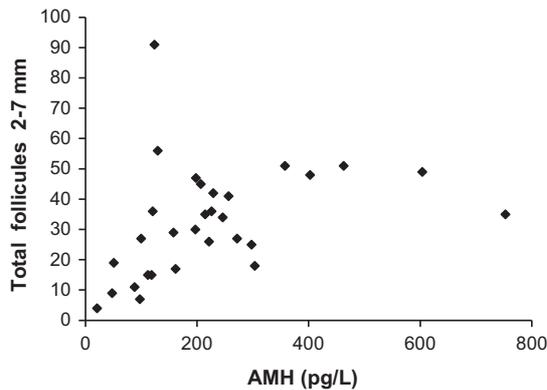
Effect of dietary treatment (Control,  $n=10$  or PG150,  $n=10$  or PG300,  $n=10$ ) on plasma concentrations of reproductive hormones (oestradiol, progesterone and anti-Müllerian hormone (AMH))

| Plasma concentrations | Day of oestrous cycle | Control            |        | PG150               |        | PG300            |        |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------|---------------------|--------|------------------|--------|
|                       |                       | LS mean            | S.E.M. | LS mean             | S.E.M. | LS mean          | S.E.M. |
| Oestradiol (pg/mL)    |                       |                    |        |                     |        |                  |        |
|                       | 2                     | 13.9               | 2.3    | 12.9                | 2.3    | 14.4             | 2.3    |
|                       | 6                     | 14.0               | 2.3    | 13.7                | 2.3    | 17.4             | 2.3    |
|                       | 9                     | 17.5               | 2.3    | 12.3                | 2.3    | 13.9             | 2.3    |
|                       | 12                    | 14.3               | 2.3    | 15.7                | 2.3    | 15.0             | 2.3    |
| Progesterone (ng/mL)  |                       |                    |        |                     |        |                  |        |
|                       | 2                     | 1.4 <sup>a</sup>   | 0.8    | 0.9 <sup>a</sup>    | 0.8    | 1.7 <sup>a</sup> | 0.8    |
|                       | 6                     | 5.2 <sup>b</sup>   | 0.8    | 5.5 <sup>b</sup>    | 0.8    | 6.0 <sup>b</sup> | 0.8    |
|                       | 9                     | 6.3 <sup>b,y</sup> | 0.8    | 8.3 <sup>c,x</sup>  | 0.8    | 7.6 <sup>b</sup> | 0.8    |
|                       | 12                    | 8.2 <sup>c,y</sup> | 0.8    | 10.3 <sup>d,x</sup> | 0.8    | 9.9 <sup>c</sup> | 0.8    |
| AMH (pg/mL)           |                       |                    |        |                     |        |                  |        |
|                       | 0                     | 232                | 58     | 265                 | 58     | 268              | 58     |
|                       | 2                     | 236                | 58     | 252                 | 58     | 241              | 58     |
|                       | 6                     | 215                | 58     | 244                 | 58     | 210              | 58     |
|                       | 9                     | 209                | 58     | 216                 | 58     | 204              | 58     |
|                       | 12                    | 248                | 58     | 236                 | 58     | 196              | 58     |
|                       | 13                    | 260                | 58     | 230                 | 58     | 198              | 58     |

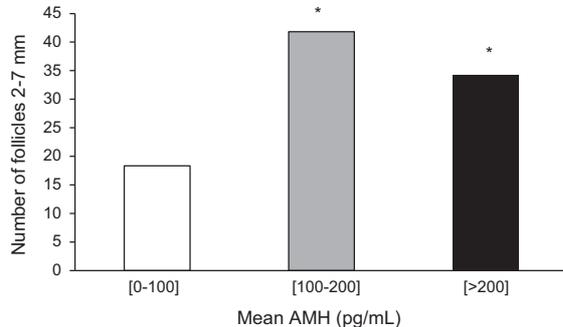
PG=propylene glycol.

Columns with different superscript letters (a,b,c,d) are significantly different ( $P < 0.05$ ); rows with different superscript letters (x,y) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

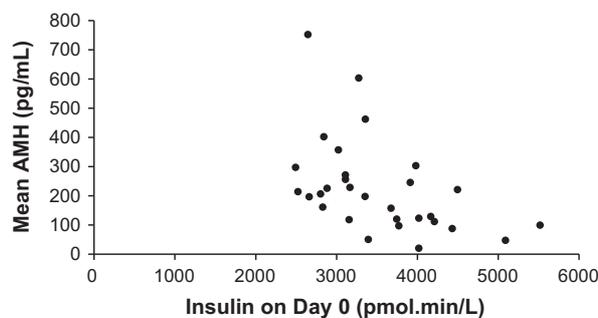
one of three groups depending on the AUC of plasma insulin on Day 0, the heifers with plasma insulin concentrations > 3500 pmol h/L or between 3000 and 3500 pmol h/L had lower levels of plasma AMH on Day 0 ( $P < 0.05$ ) than heifers with insulin concentrations < 3000 pmol h/L (Fig. 8). There was no correlation between the AUC of plasma insulin on Day 0 and the number of small follicles (data not shown).



**Fig. 5.** The relationship between the total number of follicles measured on days 2, 6, 9 and 12 of a synchronized oestrous cycle and plasma concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) in ten heifers. The sequence of measurements was repeated over three oestrous cycles. ( $r = 0.36$ ,  $P < 0.05$ ).



**Fig. 6.** The total number of follicles measured in heifers classed according to their plasma concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) as follows: 0–100 pg/mL ( $n = 9$ ), 100–200 pg/mL ( $n = 12$ ) and > 200 pg/mL ( $n = 9$ ). \* $P < 0.05$ .



**Fig. 7.** Relationship between plasma concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) and the area under the curve for insulin (pmol.min/L) measured on Day 0 of three synchronized oestrous cycles ( $r = -0.47$ ,  $P < 0.05$ ).

## 4. Discussion

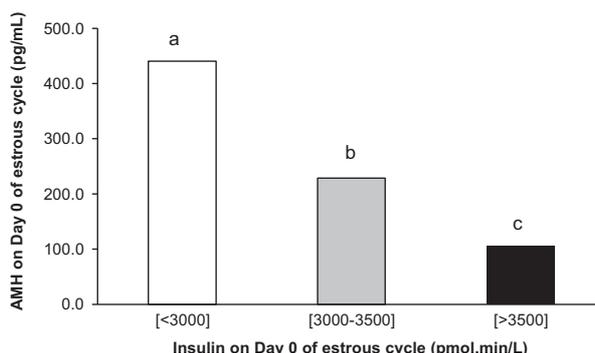
### 4.1. Growth rate, body weight and, BCS

The growth rate (around 950 g/d) and the constant body condition score indicate that as expected the heifers were in positive energy balance. The fact that the heifers were growing means that they were metabolically very different from early-lactating dairy cows which are often in negative energy balance since they mobilise adipose tissue reserves. This may be important in the interpretation of the metabolic response to PG since dairy cows in negative energy balance are known to be insulin resistant (Sinclair, 2010) while growing heifers are not. Insulin resistance is an adaptation to the very high glucose requirements for lactation, thereby conserving glucose for lactation by limiting its use by insulin-sensitive tissues (muscle, adipose tissue etc.).

### 4.2. Plasma concentrations of metabolites and metabolic hormones

There was no effect of treatment on plasma insulin concentrations when insulin was measured every 2 h over a 24 h period on Day 0 (basal day) and Day 13 (treatment day). There was no difference in insulin concentrations between treatments (Control, PG150 and PG300) when measured over a 24 h period on Day 13 (treatment day). These results differ from those obtained by other authors who reported an increase in the concentrations of insulin following administration of PG (Studer et al., 1993; Grummer et al., 1994; Christensen et al., 1997). In these studies, insulin was increased between 30 and 90 min after the administration of PG, and the effect was more pronounced when the animals received the PG in liquid- or in powder-form mixed with the concentrate. In the present study, blood sampling was performed every 2 h after PG distribution and it is possible that the effects of PG on insulin occurred too early to be detected. Indeed, long intervals between the administration of PG and blood sampling have resulted in the detection of only minor effects on insulin concentrations in previous studies (Cozzi et al., 1996; Shingfield et al., 2002).

In addition, although there are studies that find no differences between oral drenching administration and



**Fig. 8.** Relationship between plasma concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) on Day 0 of three synchronized oestrous cycles in heifers with different plasma insulin area under the curve (AUC) concentrations measured on Day 0 as follows: < 3000 pmol.min/L ( $n=9$ ), 3000–3500 pmol.min/L ( $n=12$ ) and > 3500 pmol.min/L ( $n=9$ ). a,b,c  $P < 0.05$ .

feeding with concentrate administration of PG (Christensen et al., 1997) there are others studies where oral drenching of PG has a more pronounced effect on insulin compared with feeding PG in a total mixed ration (Cozzi et al., 1996) or after pouring PG on top of concentrates (Shingfield et al., 2002). The reason for this according to these authors is that rapid intake (drenching/intake) results in rapid rumen absorption, which by-passes fermentation in the rumen, and rapid conversion by the liver to glucose and a concomitant increase in insulin (Nielsen and Ingvarsten, 2004). However, as stated previously the fermentation undergone by PG in the rumen may be a more complex process than this with the production of propanal, propanol and propionate. In the case of a slower rate of ingestion PG will be partially fermented in the rumen and therefore its effect on insulin via glucose production will be lower. In our experiment, the method chosen to give PG may explain poor detection of a significant effect of PG on insulin and this due to rapid intake but a relatively long interval between PG administration and blood sampling (2 h). However PG clearly had an effect since the concentrations of other metabolites were modified.

Although no effect of PG was observed on plasma concentrations of insulin, plasma glucose was elevated at 20:00 h (4 h after PG administration) for the groups supplemented with PG150 and PG300 on Day 13 compared with Day 0. In addition, glucose was higher for several hours in the PG300 group compared with the Control on Day 13. The difference in metabolic status between the animals used in the present study, growing heifers, and in previous studies, lactating dairy cows, may explain why insulin did not appear to be modified while glucose was, having said that the interval intake – sampling may also have played a role.

In addition, the supplementation  $\times$  time interaction observed over the 8 h after PG administration, indicates that glucose increased and the response lasted longer for heifers receiving PG300 compared with Control. The PG also increased glucose concentrations in other studies (Studer et al., 1993; Butler et al., 2006; Rizos et al., 2008; Chung et al., 2009). The high levels of glucose observed 2 h after administration of PG appear to confirm that the peak in glucose was maintained after that of insulin and for longer. Another aspect which is different between the present experiment and previous experiments is that we

used a positive control i.e., sugar beet pulp (iso-energetic with the PG300 treatment) rather than water as the control. This may have limited the differences in glucose and insulin observed between treatments and control since sugar beet pulp would have produced some volatile fatty acids other than acetic acid in the rumen following fermentation.

PG has been shown to reduce BHB plasma concentrations in different studies (Grummer et al., 1994; Rizos et al., 2008), in our experiment the small effect of PG150 and PG300 on plasma BHB concentrations is probably due to low concentrations of NEFA. Indeed, the effect of PG on NEFA and BHB depends on the metabolic status of the animal (Nielsen and Ingvarsten, 2004). PG has an anti-ketogenic effect and induces the largest decrease in plasma BHB in animals with the highest NEFA concentrations (cows within 1 week of parturition (Studer et al., 1993) and restrictively fed heifers (Grummer et al., 1994)). In our study heifers were fed for positive weight gain and therefore NEFA levels were low. Plasma urea increased or tended to increase at some time points for PG150 compared with the other treatments but values were in the normal range.

IGF-1 is an important mediator of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and embryonic development (Yaseen et al., 2001). High dietary energy intake is associated with increased insulin and IGF-1 (Burgwald-Balstad et al., 1995; Yelich et al., 1996; Lalman et al., 2000; Armstrong et al., 2001). Plasma insulin concentrations are positively correlated to those of IGF-1 (Gong, 2002) which was confirmed by the present experiment. There were differences between the day of the oestrous cycle and plasma IGF-1 concentrations. IGF-1 was significantly higher on Day 6 of the oestrous cycle with PG150 compared with the other days. Although IGF-1 concentrations were numerically higher in PG300 vs. control the difference was not significant.

#### 4.3. Plasma concentrations of reproductive hormones

The main source of P4 in blood from non-pregnant cows is thought to be the *Corpus Luteum* (CL), but P4 can be derived from metabolism in the liver and other organs and it is possible that there is adrenal release of P4

(Henricks and Mayer, 1977). Insulin is necessary to sustain progesterone synthesis and facilitate lipoprotein utilisation in bovine luteal cells (Poff et al., 1988; Haq, 1992). Significant differences were observed between the PG and the Control groups for progesterone levels measured on Day 9 and Day 12 of the oestrous cycle.

Hidalgo et al. (2004) showed that the administration of PG by drenching increased IGF-1, improved the quality of the CL and increased levels of P4, and could be an interesting alternative when trying to optimise pregnancy rates in an embryo transfer (ET) programme. A positive effect of a glucogenic supplement on P4 concentrations was confirmed recently by Berlinguer et al. (2012) in sheep. As expected, there were significant differences in P4 during the oestrous cycle in all treatments.

No effect of PG was observed on plasma oestradiol concentrations.

#### 4.4. Ovarian follicular growth and its relationship with plasma concentrations of AMH

PG administration stimulated the growth of small follicles on Day 2 of the oestrous cycle: the number of 2–3 mm follicles (2 days after the start of PG administration) tended to be increased in the PG treatment groups. Gutierrez et al. (1997), Armstrong et al. (2001) and Freret et al. (2006) observed that when increased dietary feed intake was associated with increased insulin, small follicle recruitment during the first wave of the oestrous cycle in heifers was increased. Although in the present study we did not observe an increase in insulin, glucose was increased by the PG treatments compared to Control. The increase in glucose may have increased insulin concentrations in the present experiment although we did not detect it perhaps because of the blood sampling regimen used.

The numbers of medium and large follicles increased as oestrus progressed without any differences between treatments being observed. These results support a role for insulin in the recruitment of small follicles, but not in follicle selection and dominance.

Anti-Müllerian hormone expression is high in the granulosa cells of small follicles and decreases during terminal follicular growth and atresia, thus it is an endocrine marker of the population of small follicles (Monniaux et al., 2008; Rico et al., 2009). In this study AMH concentrations were measured during the oestrous cycle. We wished to see if PG administration affected AMH concentrations. No effect of PG administration on plasma AMH concentrations during the oestrous cycle was found. These results confirm those obtained in the cow (Rico et al., 2009) and in women (Streuli et al., 2008). The authors concluded that AMH levels are stable and that they allow a long-term characterisation of each animal and do not depend on the stage of the oestrous cycle and are relatively constant from cycle to cycle.

A positive correlation was observed between plasma AMH concentrations and the total number of 2–7 mm diameter follicles detected by ultrasound ( $r=0.36$ ;  $P<0.05$ ). This population of follicles, which is the main target of superovulatory treatments, contributes considerably to plasma AMH concentrations. The positive correlation confirms that

the measurement of this hormone before treatment may help to predict the superovulatory response in donors in a programme of embryo transfer (Monniaux et al., 2010; Rozner and Versteegen, 2012). However, in this study the correlation observed in heifers was lower than that reported in cows by Monniaux et al. (2010).

When animals were separated into different AMH categories, medium and high AMH animals had significantly higher numbers of 2–7 mm follicles than animals with low AMH.

#### 4.5. Relationship between plasma AMH concentrations and insulin

AMH measurements may represent both a quantitative and qualitative marker of granulosa cell activity and the ovarian follicle pool (Feyereisen et al., 2006; La Marca and Volpe, 2006) and factors that disturb granulosa cell function may also affect the production of AMH. Obesity and insulin resistance have been reported to have a negative effect on ovarian granulosa cell function in woman (Cortet-Rudelli et al., 2002; Freeman et al., 2007). In the present study, a negative correlation was observed between the AUC of insulin and AMH concentrations on Day 0 of the oestrous cycle (before PG administration). This result is original because the relationship between these two hormones has never been observed in cattle, although a negative correlation between AMH and insulin has been reported in insulin-resistant women (Mei-Jou et al., 2008). Insulin resistance also exists in cattle. Sinclair (2010) stated that continued selection for increased milk yield has resulted in modern Holstein dairy cows that are increasingly insulin resistant (due to a disproportionately high amount of intra-abdominal fat). Indeed, 'leaner' Holstein heifers (BCS=2, presumably more intra-abdominal fat) are more insulin resistant than their 'fatter' Simmental  $\times$  Holstein contemporaries (BCS=4, presumably less intra-abdominal fat; Sinclair, 2010). In the present study, animals with high average plasma insulin concentrations on pre-PG treatment Day 0 ( $>265$  pM, typical of hyperinsulinemia, Sinclair, 2010), had lower values of AMH ( $<105$  pg/mL) (data not shown). Interestingly, there was no correlation between insulin concentrations and the number of small follicles on Day 0. This suggests that there may be a negative effect of high insulin or insulin-resistance on granulosa cell production of AMH which in turn reduces AMH concentrations. Further studies are necessary in this area.

In conclusion, the results from this study show that administration of PG150 or PG300 failed to increase insulin levels when measured every 2 h after PG ingestion. However, supplementation with PG300 increased glucose and decreased BHB concentrations and was more effective than PG150 when compared to the Control. PG tended to increase the number of small follicles on Day 2 of the oestrous cycle (2 days after the start of PG supplementation) and increased the amount of P4 during the luteal phase, measured on Days 9 and 12 of the oestrous cycle. The administration of PG had no influence on the concentrations of AMH, but there was a negative correlation between pre-PG distribution insulin and AMH. This correlation has also been reported in women and further studies

are necessary to elucidate the role of insulin resistance in the production of AMH in heifers.

As short-term propylene glycol supplementation stimulated the growth of small follicles on Day 2 of the oestrous cycle, this practice may be useful to improve performance of embryo biotechnologies when combined with treatments to stimulate follicular growth. Indeed, short-term propylene glycol supplementation could result in increased oocyte collection following superovulation or ovum-pick up. However, further studies need to determine the potential benefits on oocyte quality and subsequent embryo development.

#### Conflict of interest statement

None of the authors have potential conflicts of interest which should be disclosed.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank Philippe Gauthier, DIFAGRI for the gift of the Propypact<sup>®</sup> and the farm workers at the experimental Station farm of the Regional Union of Breeding Coops for Genetic Improvement and Animal Service (MIDATEST). The technical assistance of Christine Ficheux is also acknowledged.

#### References

- Adamiak, S.J., Mackie, K., Watt, R.G., Webb, R., Sinclair, K.D., 2005. Impacts of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulemia in cattle. *Biol. Reprod.* 73, 918–926.
- Armstrong, D.G., Mc Evoy, T.G., Baxter, G., Robinson, J.J., Hogg, C.O., Woad, K.J., Sinclair, K.D., 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.* 64, 1624–1632.
- Barnouin, J., Chillard, Y., Chacornac, J.P., Lefavre, R., 1986. Microdosage automatisé sans déprotéinisation du 3-hydroxy-butyrate plasmatique chez les bovins. *Ann. Rech. Vet.* 17, 129–139.
- Bazin, S., 1984. In Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie noires. *Technipel*, Paris.
- Berlinguer, F., Gonzalez-Bulnes, A., Contreras-Solis, I., Spezzigu, A., Torres-Rovira, L., Succu, S., Naitana, S., Leoni, G.G., 2012. Glucogenic supply increases oocyte developmental competence in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 1055–1062.
- Burgwald-Balstad, L.A., Caton, J.S., Burke, V.I., Olson, K.C., 1995. Influence of forage level and naloxone injection on feed intake, digestion, and plasma hormone and metabolite concentrations in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 73, 2677–2686.
- Butler, S.T., Pelton, S.H., Butler, W.R., 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J. Dairy Sci.* 89, 2938–2951.
- Christensen, J.O., Grummer, R.R., Rasmussen, F.E., Bertics, S.J., 1997. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 563–568.
- Chung, Y.H., Martinez, C.M., Brown, N.E., Cassidy, T.W., Varga, G.A., 2009. Ruminal and blood responses to propylene glycol during frequent feeding. *J. Dairy Sci.* 92, 4555–4564.
- Cortet-Rudelli, C., Pigny, P., Decanter, C., Leroy, M., Maunoury-Lefebvre, C., Thomas-Desrousseaux, P., Dewailly, D., 2002. Obesity and serum luteinizing hormone level have an independent and opposite effect on the serum inhibin B level in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 77, 281–287.
- Cox, N.M., Stuart, M.J., Allten, T.G., Bennett, W.A., Niller, H.W., 1987. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *J. Anim. Sci.* 64, 507–516.
- Cozzi, G., Berzaghi, P., Gottardo, F., Gabai, G., Andrighetto, I., 1996. Effects of feeding propylene glycol to mid-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 43–51.
- Feyereisen, E., Mendez Lozano, D.H., Taieb, J., Hesters, L., Frydman, R., Fanchin, R., 2006. Anti-Müllerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reprod. Biomed. Online* 12, 695–703.
- Formigoni, A., Cornil, M., Prandi, A., Mordenti, A., Rossi, A., Portetelle, D., Renaville, R., 1996. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J. Dairy Res.* 63, 11–24.
- Freeman, E.W., Gracia, C.R., Sammel, M.D., Lin, H., Lim, L.C., Strauss, J.F., 2007. Association of anti-müllerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil. Steril.* 87, 101–106.
- Freret, S., Grimard, B., Ponter, A.A., Joly, C., Ponsart, C., Humblot, P., 2006. Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers 131, 783–794. *Reproduction* 131, 783–794.
- Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., Armstrong, D.G., Newbold, J.R., Marsden, M., Richards, S.E., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R., 2008. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 3. amino acids and ovarian function. *J. Dairy Sci.* 91, 4190–4197.
- Gong, J.G., McBride, D., Bramley, T.A., Webb, R., 1993. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.* 139, 67–75.
- Gong, J.G., 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 229–241.
- Grimard, B., Humblot, P., Ponter, A.A., Mialot, J.P., Sauvart, D., Thibier, M., 1995. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J. Reprod. Fertil.* 104, 173–179.
- Grummer, R.R., Winkler, J.C., Bertics, S.J., Studer, V.A., 1994. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 77, 3618–3623.
- Gutierrez, C.G., Campbell, B.K., Webb, R., 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 56, 608–616.
- Haq, I., 1992. The role of insulin and insulin related factors on lipoprotein utilisation by bovine luteal cells (Thesis). The Ohio State University.
- Henricks, D.M., Mayer, D.T., 1977. Gonadal hormones and uterine factors. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in domestic animals* (3rd ed.), New York, pp. 72–83.
- Hidalgo, C.O., Gomez, E., Prieto, L., Duque, P., Goyache, F., Fernandez, L., Fernandez, I., Facal, N., Diez, C., 2004. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology* 62, 664–676.
- Kristensen, N.B., Raun, B.M., 2007. Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4707–4717.
- La Marca, A., Volpe, A., 2006. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin. Endocrinol.* 64, 603–610.
- Lalman, D.L., Williams, J.E., Hess, B.W., Thomas, M.G., Keisler, D.H., 2000. Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. *J. Anim. Sci.* 78, 530–538.
- Letelier, C., Gonzalez-Bulnes, A., Hervé, M., Correa, J., Pulido, R., 2008a. Enhancement of ovulatory follicle development in maiden sheep by short-term supplementation with steam-flaked corn. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 222–227.
- Letelier, C., Mallo, F., Encinas, T., Ros, J.M., Gonzalez-Bulnes, A., 2008b. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction* 136, 65–72.
- Matamoros, I.A., Cox, N.M., Moore, A.B., 1991. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepubertal gilts. *J. Anim. Sci.* 69, 2081–2091.
- Mei-Jou, C., Wei-Shiung, Y., Chi-Ling, C., Ming-Yih, W., Yu-Shih, Y., Hong-Nerng, H., 2008. The relationship between anti-Müllerian hormone, androgen and insulin resistance on the number of antral follicles in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 23, 952–957.
- Miyoshi, S., Pate, J.L., Palmquist, D.L., 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 29–43.
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., Larroque, H., 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1083–1091.

- Monniaux, D., di Clemente, N., Touzé, J.L., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., Picard, J.Y., Fabre, S., 2008. Intrafollicular steroids and anti-Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 79, 387–396.
- Morgan, L.M., Hampton, S.M., Tredger, J.A., Cramb, R., Marks, V., 1988. Modifications of gastric inhibitory polypeptide (GIP) secretion in man by a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 59, 373–380.
- Nielsen, N.I., Ingvarsen, K.L., 2004. Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 191–213.
- Poff, J.P., Fairchild, D.J., Condon, W.A., 1988. Effects of antibiotics and medium supplements on steroidogenesis in cultured cow luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* 82, 135–143.
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Touze, J., Dupont, M., Briant, E., Remy, E., Beckers, J.F., Monniaux, D., 2009. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59.
- Rizos, D., Kenny, D.A., Griffin, W., Quinn, K., Duffy, P., Mulligan, F.J., Roche, J.F., Boland, M.P., Lonergan, P., 2008. The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. *Theriogenology* 69, 688–699.
- Rozner, A., Verstegen, J., 2012. Relationship between serum anti-Müllerian hormone (AMH), ovarian reserve, and embryo production in superovulated Holstein cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 304. (304).
- SAS Institute Inc., 2000. SAS/STAT Software: User's Guide, Release 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schneider, J.E., 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.* 81, 289–317.
- Shingfield, K.J., Jaakkola, S., Huhtanen, P., 2002. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on diet digestibility, rumen fermentation, blood metabolite concentrations and nutrient utilisation of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97, 1–21.
- Sinclair, K.D., 2010. Declining fertility, insulin resistance and fatty acid metabolism in dairy cows: Developmental consequences for the oocyte and pre-implantation embryo. *Acta Sci. Vet.* 38, s545–s557.
- Streuli, I., Fraise, T., Pillet, C., Ibecheole, V., Bischof, P., de Ziegler, D., 2008. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil. Steril.* 90, 395–400.
- Studer, V.A., Grummer, R.R., Bertics, S., Reynolds, C.K., 1993. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 2931–2939.
- Totey, S.M., Pawshe, C.H., Appa Rao, K.B.C., 1996. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and interaction with gonadotrophins. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 50, 113–119.
- Yaseen, M.A., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W., Niemann, H., 2001. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGFIIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction* 122, 601–610.
- Yelich, J.V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13, 325–338.

**Chapitre 5**

**Etude expérimentale n°2**

**Effets de propylène glycol sur la production d'embryons in vitro après ponctions d'ovocytes (OPU) chez des génisses laitières ayant des profils contrastés d'hormone Anti-Müllérienne**

**G. Gamarra**, C. Ponsart, S. Lacaze, B. Le Guienne, P. Humblot, M.-C. Deloche, D. Monniaux and A.A. Ponter

Reproduction, Fertility and Development (2014)

### **Résumé de l'article**

Le but de cette étude était d'investiguer si l'administration quotidienne de propylène glycol sous forme liquide par voie orale (PG: 400 ml de propylène glycol (Difagri ®) pouvait améliorer la production in vitro d'embryons chez des génisses laitières présentant des profils d'AMH différents et soumises à une restriction alimentaire. Seize génisses Holstein (âgées de  $15,8 \pm 1,2$  mois; d'un poids moyen de  $370 \pm 41,2$  kg) ont été regroupées en fonction de la concentration d'AMH circulante pré-expérimentale : faible (B = 1-80 pg/ml, n = 7) ou haute (H : > 150 pg/ml; n = 9). Les complexes cumulus-ovocytes (COC) utilisés pour la production in vitro d'embryons ont été recueillis par Ovum Pick-Up (OPU) toutes les 3 semaines. Les oestrus ont été synchronisés, suivis par une superovulation débutant le 2<sup>ème</sup> jour du cycle. Une OPU a été effectuée le jour 5 du cycle oestral. Après maturation, les COCs ont été fécondés in vitro. Les embryons ont été cultivés dans un milieu synthétique SOF pendant 7 jours. Les génisses ont reçu, dans un plan croisé répété, une seule administration orale quotidienne de 400 ml d'eau (contrôle) du jour 1 au jour 9 du premier cycle oestral synchronisé suivie par 400 ml de PG du jour 1 au jour 9 lors de la deuxième synchronisation du cycle œstral. Des séries d'échantillons de sang (-10, 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min par rapport au moment de l'administration orale) ont été collectées à partir de la veine jugulaire le jour 7 de chaque cycle afin de surveiller la cinétique de l'insuline dans le plasma, le glucose, le  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) et les concentrations d'urée. Des échantillons de sang ont également été prélevés pour mesurer l'insuline-like growth factor-1 (IGF1) aux jours 0, 2, 5, 7 et 9 et la progestérone (P4) les jours 2, 5 et 9 du cycle oestral. Des échographies ont été effectuées les jours 2 et 5 afin de comptabiliser les follicules et les classer selon leur taille. Le gain moyen de poids vif observé au cours de l'expérience était de 600 g/j chez les génisses avec AMH B et 550 g/j chez les génisses avec AMH H ( $P > 0,05$ ).

L'administration de PG a accru les niveaux d'insuline et de glucose Elle a réduit les concentrations de BHB et urée dans les deux groupes de génisses par rapport au groupe contrôle. La supplémentation en PG a également augmenté les concentrations d'IGF1 mesurées les jours 5 et 7 dans le groupe AMH L et les jours 2, 5 et 7 dans le groupe AMH H. Les concentrations de P4 ont été réduites par la supplémentation les jours 5 et 9 du cycle oestral pour toutes les génisses traitées par rapport au groupe contrôle. L'administration de PG a augmenté considérablement le nombre de petits follicules (2-3 mm) et les follicules totaux (2-8 mm) le jour 2 du cycle chez toutes les génisses, ainsi que les follicules de taille moyenne (4-8 mm) et les follicules totaux (2-8 mm) le jour 5 chez les génisses AMH H.

L'administration de PG a également élevé le nombre d'ovocytes de qualité 1 chez les génisses présentant un profil AMH H et a amélioré le taux de développement des embryons in vitro (nombre total d'embryons / nombre d'ovocytes fécondés) chez toutes les génisses supplémentées par PG par rapport au groupe contrôle (AMH B : contrôle, 37,9% vs. PG, 50,0%,  $P < 0,05$ ; AMH H : contrôle, 36,4% vs. PG, 48,3%,  $P < 0,05$ ). Dans le groupe AMH H, le nombre de blastocystes de qualité 1 le jour 7 de culture a été augmenté avec la supplémentation PG par rapport au groupe contrôle (contrôle,  $5,2 \pm 1,0$  vs. PG,  $8,9 \pm 1,0$ ,  $P < 0,01$ ) alors qu'il n'y avait pas de différence entre les traitements chez les génisses AMH L (contrôle,  $1,9 \pm 1,1$  vs. PG,  $3,2 \pm 1,1$   $P > 0,05$ ).

Ces résultats indiquent qu'une supplémentation orale de PG de courte durée modifie les concentrations circulantes de métabolites et d'hormones métaboliques et a permis l'amélioration de la production d'embryons in vitro après un traitement de superovulation et la collecte des ovocytes par OPU. Les effets positifs du PG ont été plus marqués chez les génisses présentant un niveau d'AMH haut par rapport aux génisses présentant un niveau d'AMH faible.

## Dietary propylene glycol and *in vitro* embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles

G. Gamarra<sup>A,B</sup>, C. Ponsart<sup>A</sup>, S. Lacaze<sup>B</sup>, B. Le Guenne<sup>A</sup>, P. Humblot<sup>C</sup>,  
M.-C. Deloche<sup>A</sup>, D. Monniaux<sup>D,E,F,G</sup> and A. A. Ponter<sup>H,I,J</sup>

<sup>A</sup>UNCEIA Département Recherche et Développement, 13 rue Jouet, F-94704 Maisons-Alfort, France.

<sup>B</sup>MIDATEST, Domine de Sensacq cedex 55A, F-64230 Denguin, France.

<sup>C</sup>Division of Reproduction, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, PO Box 7054, SE 75007 Uppsala, Sweden.

<sup>D</sup>INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>E</sup>CNRS, UMR7247, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>F</sup>Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France.

<sup>G</sup>IFCE, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>H</sup>Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-94704 Maisons-Alfort, France.

<sup>I</sup>INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

<sup>J</sup>Corresponding author. Email: [aponter@vet-alfort.fr](mailto:aponter@vet-alfort.fr)

**Abstract.** Rapid genetic improvement in cattle requires the production of high numbers of embryos of excellent quality. Increasing circulating insulin and/or glucose concentrations improves ovarian follicular growth, which may improve the response to superovulation. The measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) can help predict an animal's response to superovulation treatment. The aim of the present study was to investigate whether increasing circulating insulin concentrations, through propylene glycol (PG) drenches, could improve *in vitro* embryo production in oestrus-synchronised superovulated heifers with different AMH profiles. Holstein heifers were grouped according to pre-experimental AMH concentrations as low (L) or high (H). The PG drench increased circulating insulin and glucose concentrations and reduced  $\beta$ -hydroxybutyrate and urea concentrations compared with the control group. AMH was a good predictor of follicle and oocyte numbers at ovum pick-up (OPU), and of oocyte and embryo quality (AMH H > AMH L). PG in the AMH H group increased the number of follicles and blastocyst quality above that in the control group, but did not improve these parameters in the AMH L group. These results indicate that short-term oral PG supplementation modifies an animal's metabolic milieu and is effective in improving *in vitro* embryo production, after superovulation-OPU, more markedly in heifers with high rather than low AMH concentrations.

**Additional keywords:** cattle fertility, follicle growth, insulin, insulin-like growth factor 1, oocyte quality, superovulation.

Received 11 March 2014, accepted 11 May 2014, published online 24 July 2014

### Introduction

In cattle, reproductive biotechnologies are widely used in genetic improvement programs. Methods such as AI, superovulation and embryo transfer have been used for several decades because they allow the genetic potential of male and female animals to be used more effectively. From the 1990s, *in vitro* embryo production has been developed using oocytes collected by ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) from conscious donors. The OPU *in vitro* embryo production method from

heifer donors can accelerate genetic progress through the female line. However, to be effective it requires high numbers of usable oocytes to be collected and increased transferable embryo production and embryo survival after cryopreservation to ensure the maintenance of pregnancy after transfer.

The quality or competence of harvested oocytes appears to be the most important determinant of embryo yields (Seneda *et al.* 2001) and this depends on the physiological and reproductive status of the donor animal, which are influenced by age, health

and nutrition (Majerus *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2001; Boland *et al.* 2001). When working with young healthy animals, the variability in embryo development rates *in vitro* may be influenced by the dietary intake of donor cattle before oocyte recovery (Greer *et al.* 1992; Boland *et al.* 2001).

Numerous experiments have been conducted to determine the most appropriate feeding strategies to optimise the quality of collected oocytes and the embryos subsequently produced. It has been shown that over-feeding can be harmful to the developmental quality of oocytes and embryos produced *in vivo* and *in vitro* (Mantovani *et al.* 1993; Papadopoulos *et al.* 2001; Freret *et al.* 2006; Santos *et al.* 2008). In addition, restricted feeding can have a positive effect on oocyte quality (Lozano *et al.* 2003) and the production of blastocysts *in vitro* (Armstrong *et al.* 2001; Freret *et al.* 2006). These results have been linked to the level of metabolites and hormones involved in the regulation of energy metabolism; in particular, increases in insulin and insulin-like growth factor (IGF) 1 levels have been associated with high energy intake in dairy heifers (Freret *et al.* 2006). Webb *et al.* (2004) reviewed the stimulatory effect of insulin and IGF1 on follicle growth and Freret *et al.* (2006) showed that an increase in insulin levels during a short time period has a positive effect on small follicle growth before superovulation. However, in the heifer, it has been shown that feeding regimens that increase insulin (hyperinsulinaemia) negatively influence the quality of oocytes (Freret *et al.* 2006; Adamiak *et al.* 2005). These findings support the idea that it may be possible to modulate insulin concentrations transiently to improve reproductive success (i.e. increase insulin during the phase of follicle growth (Scaramuzzi *et al.* 2006) and then return to pre-stimulated levels just before ovulation so as not to have a negative effect on oocyte quality). To further support this hypothesis, Garnsworthy *et al.* (2009) modified circulating insulin levels (high and low) in dairy cows postpartum via the diet. They showed that a diet causing high insulin concentrations between calving and the first postpartum rise in progesterone (P4) followed by a diet causing low insulin until 120 days postpartum improved pregnancy rates compared to other sequences of dietary treatment to modify insulin (high–high, low–high and low–low). These findings open up the possibility of improving fertility and embryo quality by using diets that induce a programmed sequence of circulating insulin concentrations.

Propylene glycol (PG) can modulate insulin secretion. PG, also known as 1,2-propianediol, is a three-carbon compound (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) derived from propylene and has been used since the 1950s in the treatment of ketosis in postpartum dairy cattle (Johnson 1954; Maplesden 1954). PG increases plasma glucose and insulin concentrations, and decreases levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB). Decreases in NEFA and BHB are also seen in underfed animals (Nielsen and Ingvartsen 2004). In a recent study on heifers, we showed that short-term dietary PG was associated with raised levels of circulating glucose and insulin and that it stimulated follicle growth, resulting in an increase in the number of small follicles (1–4 mm diameter) during the first days of an oestrous cycle (Gamarra *et al.* 2014). However, the potential benefits of PG on oocyte developmental competence and subsequent embryo production in heifers have not been investigated.

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a 140-kDa glycoprotein that belongs to the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  family and is specifically expressed by the granulosa cells of small growing follicles (Monniaux *et al.* 2008; Rico *et al.* 2009). AMH is an endocrine marker of the size of the pool of ovarian gonadotrophin-responsive follicles in the cow, and plasma AMH concentrations measured before superovulation treatment can help predict the response of individuals (Ireland *et al.* 2008; Rico *et al.* 2009; Monniaux *et al.* 2010). Interestingly, plasma AMH concentrations remain stable in individuals over several months and are characteristic for a cow in the long term (Rico *et al.* 2012).

The aim of the present study was to determine the effect of short-term oral PG administration on follicular growth, the superovulatory response and *in vitro* embryo production after OPU in growth-restricted heifers with different AMH profiles. Our hypothesis was that PG would increase serum insulin and glucose, thereby stimulating ovarian function, improving oocyte and embryo quality, and that the AMH profile may modulate the response to PG.

## Materials and methods

### Animals

All experimental work was performed at the experimental station of the Regional Union of Breeding Cooperatives for Genetic Improvement and Animal Service (MIDATEST), in the south-west of France. Sixteen Holstein dairy heifers were used for the study (mean ( $\pm$  s.e.m.) age  $15.8 \pm 1.2$  months; average liveweight (LW)  $370 \pm 41$  kg; body condition score (BCS)  $2.3 \pm 0.3$ , where BCS 0 = thin and BCS 5 = fat; Bazin 1984). Heifers were confirmed to be cyclic by rectal palpation before being introduced into the experimental station. Prior to the experimental period, heifers were housed together indoors and were fed the same diet, composed of natural prairie hay and a commercial concentrate. During the experiment, the heifers were housed individually and given the experimental treatments. Water was available *ad libitum*. The present study was performed according to French legislation on animal experimentation (code rural: articles R214–87 to R214–94) in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

### Experimental protocol

A subpopulation of Holstein heifers was selected before the beginning of the experiment from a larger group after the measurement of plasma AMH concentrations. Sixteen heifers were selected and grouped according to their AMH concentrations before PG treatment as either low (AMH L;  $1–80$  pg mL<sup>-1</sup> AMH;  $n = 7$ ) or high (AMH H;  $>150$  pg mL<sup>-1</sup> AMH;  $n = 9$ ). The effects of a daily oral drench of PG on blood metabolites, metabolic and reproductive hormones, follicular growth and *in vitro* embryo production were investigated. The experimental protocol was performed over two periods separated by an interval of 6 weeks. Two OPU were performed in each period on Day 5 of an induced oestrous cycle with superovulation; the first OPU was during the control treatment and the second was during

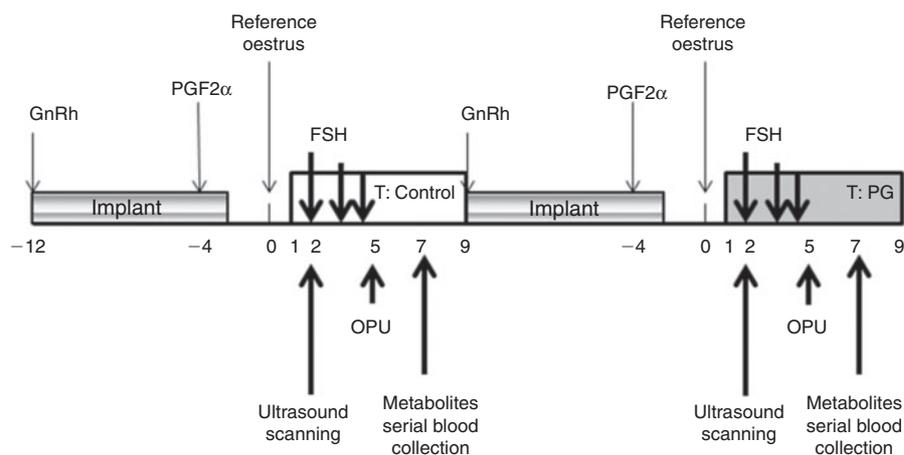


Fig. 1. Experimental scheme and sampling time schedule in Periods 1 and 2.

PG treatment. The experimental protocol was the same for both periods. OPU and embryo production were performed by the same operator throughout the experiment.

Heat synchronisation was performed with subcutaneous 3 mg Norgestomet implants (Crestar; Intervet, Angers, France) inserted under the convex surface of the ear for 9 days. On the day of implant insertion, heifers received an i.m. injection of 2 mL gonadotrophin-releasing hormone (GnRH; Receptal; Intervet). Two days before implant removal, heifers were given 500 µg, i.m., cloprostenol (Estrumate; Schering-Plough Vétérinaire, Levallois-Perret, France). On Day 2.5 of the synchronised oestrous cycle (Day 0 being the day of oestrus), heifers were superovulated with a total dose of 275 µg porcine (p) FSH and 55 µg porcine LH (Stimufol; Reprobiol, Liège, Belgium) divided into five i.m. injections 12 h apart, at decreasing doses (FSH: 100, 75, 50, 30 and 20 µg; LH: 20, 15, 10, 6 and 4 µg). Cumulus–oocyte complexes (COCs) were collected by OPU 12 h after the last FSH injection (Day 5 of the cycle). On Day 2 (without superovulation) and on Day 5 (before OPU), all follicles were counted and classified as either small (2–3 mm), medium (4–8 mm) or large ( $\geq 8$  mm; Fig. 1).

#### Experimental diets and growth measurements

After a dietary transition and adaptation period of 4 weeks, each heifer within the different groups was fed individually natural prairie hay and a commercial concentrate (Table 1) designed to produce a LW gain of 600 g day<sup>-1</sup>. Heifers were fed at 0800 hours. The two experimental treatments were given at 1600 hours, namely 400 mL water in the control group or 400 mL PG (DIFAGRI, Montaigu, France) from Day 1 to Day 9 (Fig. 1). Heifers were weighed every 15 days to measure LW gain and the BCS was determined every 4 weeks.

#### Ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (OPU)

Follicular aspiration was performed as described by Bols *et al.* (1995). We used an ultrasound scanner (Parus 240; Esaote Pie

Table 1. Ingredients and nutritional composition of the concentrate DM, dry matter; NE<sub>L</sub>, net energy for maintenance and lactation; PDIN, intestinal digestible proteins, when degraded N is the limiting factor; PDIE, intestinal digestible proteins, when energy is the limiting factor

| Ingredient (% DM)                              |      |
|--|------|
| Wheat bran                                     | 19.4 |
| Corn distiller's grain                         | 17.9 |
| Sunflower meal                                 | 15.9 |
| Cornmeal                                       | 14.6 |
| Wheat bran                                     | 8.6  |
| Rapeseed meal                                  | 6.2  |
| Corn   | 5.4  |
| Cereal by-product                              | 18.9 |
| Molasses                                       | 1.9  |
| SANDI 25 <sup>A</sup>                          | 0.5  |
| Salt   | 0.4  |
| Minerals + vitamins <sup>B</sup>               | 3.0  |
| Nutrient composition (kg <sup>-1</sup> as fed) |      |
| NE <sub>L</sub> (Mcal)                         | 1.53 |
| PDIN (g)                                       | 125  |
| PDIE (g)                                       | 120  |
| P (g)  | 6    |
| Ca (g)   | 12   |
| Starch (g)                                     | 200  |
| Crude fibre (g)                                | 96   |

<sup>A</sup>Mineral and vitamin mix (per kg of mix): 11 mg Fe, 0.93 mg I, 0.40 Co, 13 mg Cu, 63 mg Mg, 60 mg Zn, 0.10 mg Se, 20 mg vitamin E, 10 mg vitamin B<sub>1</sub>, 1000 IU vitamin A, 1000 IU vitamin D<sub>3</sub>.

<sup>B</sup>Mineral and vitamin mix (per kg of mix): 6% P, 21% Ca, 3.2% Na, 230 mg Cu chelates, 86 mg I, 37 mg Co, 13 mg Cu, 400 mg Mn, 730 mg Zn, 14 mg Se, 6 mg Se organic, 1250 IU vitamin E, 513 000 IU vitamin A, 114 000 IU vitamin D<sub>3</sub>, 1250 IU vitamin C, 2000 mg β-carotene.

Medical, Hospimedi, Valdampierre, France) with a 7.5-MHz annular array probe. Heifers were given an epidural injection of 4 mL lignocaine (Laocaine; Schering-Plough Vétérinaire). A disposable-needle guidance system was used whereby disposable 18-G 12-mm long needles were fixed on a needle holder and inserted into the puncture guide connected to an aspiration

pump (VMAR5100; Cook Veterinary, Qld, Australia). The needles were changed between animals. Tubing and needles were rinsed with EuroFlush medium (IVM, Saint Ouen Sur Iton, France), with 0.5 g L<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA), 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin sulfate (IMV Technologies, L'Aigle, France), supplemented with 100 IU mL<sup>-1</sup> heparin (Leo, Saint Quentin en Yvelines, France). Follicular fluid was collected in sterile 50-mL tubes. The contents were then filtered over a 50- $\mu$ m steel filter and rinsed with EuroFlush medium over a Petri dish. Tubes, dishes, collection medium and filters were maintained at 38°C throughout the procedure.

#### *IVM, fertilisation and culture*

COCs from each heifer were treated separately. COCs were isolated from the follicular aspirates and washed twice in collection medium. Quality was graded according to classical morphological criteria as described [Marquant-Le Guienne \(1998\)](#). IVM was performed in maturation medium consisting of 500  $\mu$ L M199 medium (M4530; Sigma, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Pan Biotech, Aidenbach, Germany), 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> FSH (Stimufol; Reprobiol) and 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> LH, 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> 17 $\beta$ -oestradiol (E2257; Sigma) and 5 ng mL<sup>-1</sup> epidermal growth factor (E6135; Sigma). Grade 1, 2, and 3 COCs were washed once in maturation medium before being incubated for 20–22 h at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The IVM oocytes were subjected to IVF as described by [Guyader-Joly \*et al.\* \(1999\)](#) using frozen-thawed semen from a single ejaculate of an INRA bull. Motile spermatozoa were separated through a BoviPure discontinuous 80/40 gradient (Nidacron, Mölndal, Sweden). The fertilisation medium (500  $\mu$ L) was a modified Tyrode's bicarbonate buffered solution (fert-TALP; pH 7.6) containing 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> heparin sodium salt (H3125; Sigma), 6 mg mL<sup>-1</sup> BSA, 20  $\mu$ M penicillamine (P4875; Sigma), 10  $\mu$ M hypotaurine (H1384; Sigma) and 1  $\mu$ M adrenaline (E4250; Sigma). Oocytes were co-incubated with  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> spermatozoa for 18 h at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The day of IVF was defined as Day 0. After removal of cumulus cells, all zygotes from one heifer were cultured together in 420  $\mu$ L synthetic oviductal fluid (SOF) medium (Minitub, Tiefenbach, Germany) covered with 400  $\mu$ L mineral oil at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>. On Day 2, embryos were examined for cleavage to 2–8 cells. On Day 7, the stage of the embryos was evaluated (early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst and hatched blastocyst) and their quality was graded according to classical morphological criteria (Grade 1, excellent; Grade 2, good; Grade 3, medium; Grade 4, poor) as described previously using the definitions developed by the International Embryo Transfer Society ([Callesen \*et al.\* 1995](#)). Briefly, Grade 1, or excellent quality, embryos had an inner cell mass (ICM) with symmetrical or few very slightly asymmetrical blastomeres that displayed a translucent appearance. Grade 2, or good quality, embryos had an ICM with very slightly asymmetrical blastomeres. Grade 3, or medium quality, embryos had an ICM that exhibited widespread marked asymmetry with a darker appearance. Finally, Grade 4, or poor quality, embryos had stopped their development at an earlier stage and contained degenerated cells.

#### *Blood sampling*

Before the experiment a blood sample was collected by jugular venipuncture into an EDTA tube to be assayed for AMH. Blood samples (–10, 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) were collected by jugular venipuncture in sodium citrate tubes on Day 7 of the cycle to monitor the kinetics of plasma insulin, glucose, BHB and urea concentrations before and after water (control group) or PG administration (= Time 0). Blood samples were also collected in heparinised tubes on Days 0, 5 and 9 for P4 analysis and on Days 0, 2, 5, 7 and 9 for IGF1 analysis.

Blood samples were collected and centrifuged immediately at 1350g for 10 min at 4°C to produce plasma for all analyses. Plasma aliquots were stored at –80°C until analysis.

#### *Assays*

Plasma samples were analysed by photometric methods for glucose (Glucose-RTU; BioMérieux, Lyon, France), urea (Urea-kit S; BioMérieux) and BHB (method adapted from [Barnouin \*et al.\* 1986](#)). Insulin and IGF1 were analysed by radioimmunoassays based, respectively, on porcine insulin (Insulin-CT; MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA) and human recombinant IGF1 (IGF1-RIACT; CIS Bioassays, Codolet, France) as described previously ([Ferlay and Chilliard 1999](#); [Balogh \*et al.\* 2012](#)). Respective inter- and intraassay CVs were 4.3% and 1.3% for 3.47 mM glucose, 8.3% and 3.4% for 2.99 mM urea, 6.5% and 1.8% for 0.82 mM BHB, 12.2% and 7.1% for 76.7 and 77.49 pM insulin, respectively, and 3.8% and 3.8% for 39.1 and 49.3 ng mL<sup>-1</sup> IGF1, respectively.

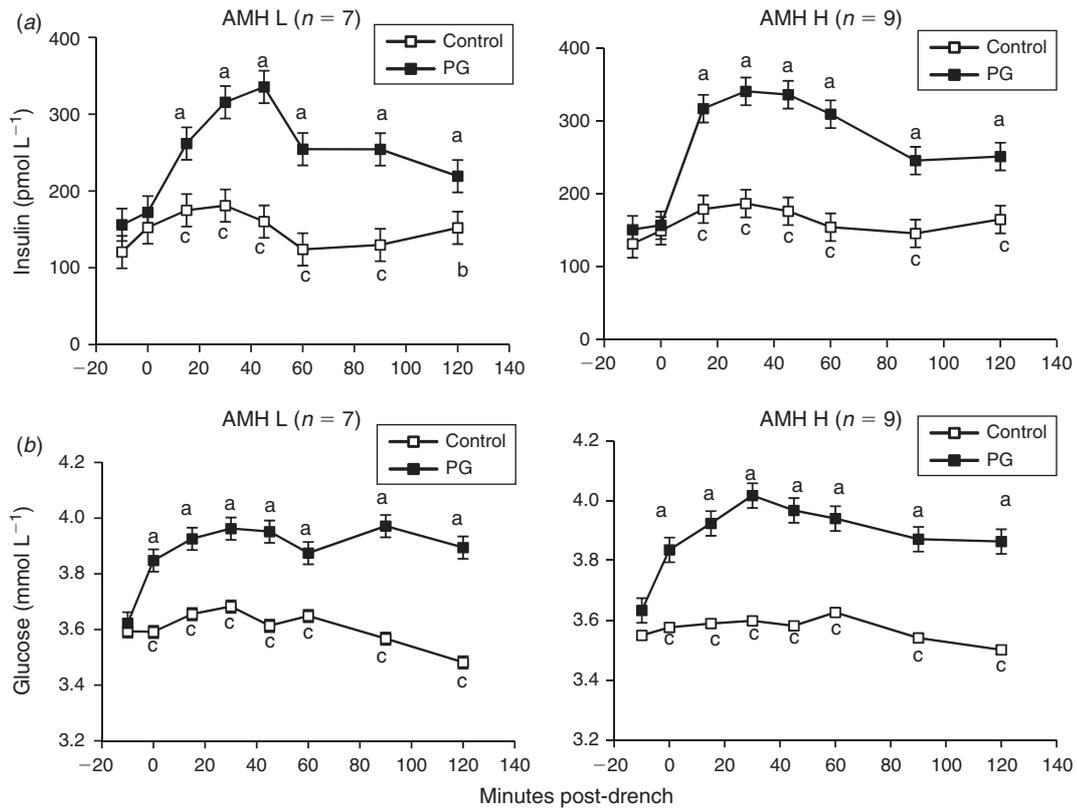
Plasma P4 was analysed by enzyme immunoassay (Ovucheck plasma; Biovet, St. Hyacinthe, Canada). The intra-assay CV for PG were 14.4% for <2.5 ng mL<sup>-1</sup>, 5% for 2.5–3.5 ng mL<sup>-1</sup> and 4.9% for >3.5 ng mL<sup>-1</sup>.

Plasma concentrations of AMH were determined using the Active MIS/AMH ELISA kit (Beckman Coulter France, Roissy CDG, France), as described previously ([Monniaux \*et al.\* 2008](#)). AMH concentrations were determined in 50  $\mu$ L undiluted plasma. The intraassay CVs were 11.8% and 3.6% for control AMH plasma at 33 and 125 pg mL<sup>-1</sup> AMH, respectively.

#### *Statistical analyses*

Statistical analysis was performed using a linear mixed model with the MIXED procedure in SAS ([SAS Institute 2000](#)) for repeated measures, including a random female effect in all models. The period effect was tested in all models and removed when not significant. The effects of experimental group, time and their interaction were tested on LW, BCS, follicular characteristics, oocyte collection and embryo production, plasma metabolic and reproductive hormone concentrations (least square (LS) means of the interaction were subsequently compared with the Contrast statement in the MIXED procedure). The mean integrated area under the time curve (AUC) for insulin was calculated on Day 7 using the trapezoidal rule ([Morgan \*et al.\* 1988](#)).

The number of follicles and oocytes collected, as well as embryo production results, were analysed using the MIXED procedure of SAS where the effects of treatment (control and PG), AMH level (low and high) and their interaction were tested. The percentages of Grade 1–3 and Grade 1 oocytes collected, the



**Fig. 2.** Plasma concentrations of (a) insulin and (b) glucose in heifers with different anti-Müllerian hormone (AMH) profiles (low=L and high=H) in relation to an oral drench with propylene glycol (PG) or water (control) given on Day 7 of a synchronised oestrous cycle. (□), control; (■), PG. <sup>a,b</sup> $P < 0.05$ , <sup>a,c</sup> $P < 0.01$  for differences between treatments for a given time point. Water or PG was administered at 1600 hours (0 min).

percentage of cleaved eggs and Day 7 Grade 1–3 and Grade 1 blastocysts were analysed using a  $\chi^2$  test. The effects of treatment (control and PG), AMH level (low and high) and their interaction were tested. Results are presented as the LS means  $\pm$  s.e.m. Two-sided  $P \leq 0.05$  was significant, whereas values  $0.05 < P < 0.10$  were considered to indicate a trend.

Different correlations were determined using the Corr model in SAS (SAS Institute 2000).

## Results

### Growth rate and BCS

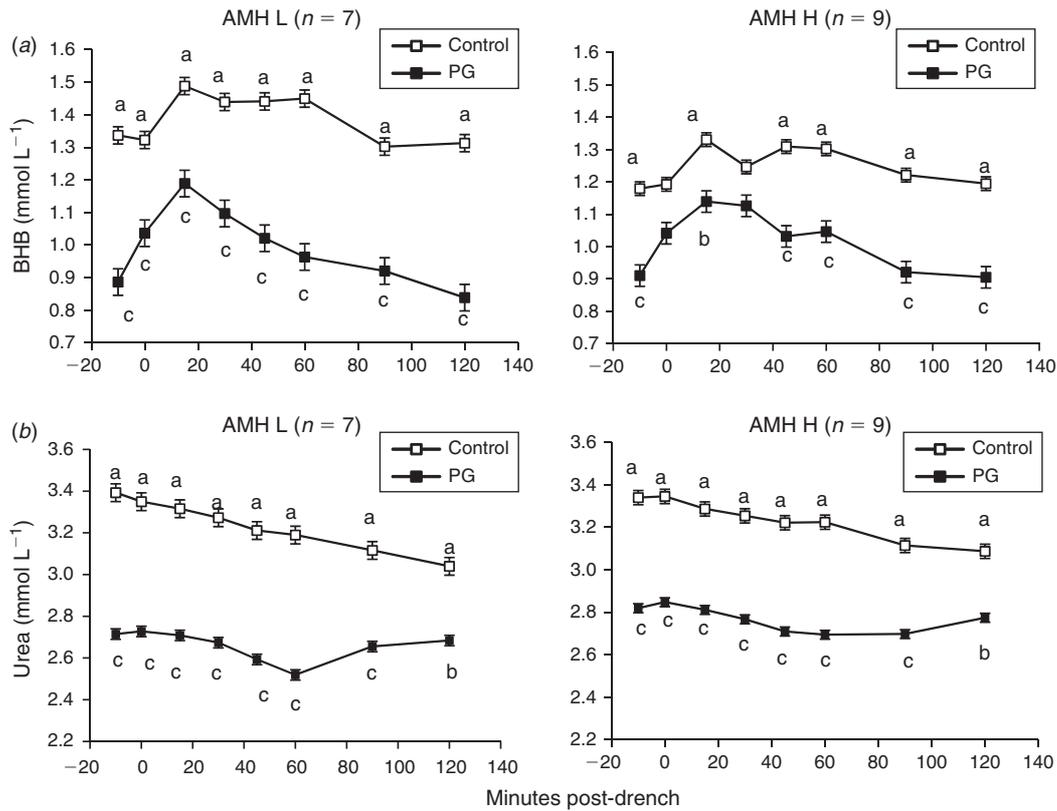
The LW gains observed in Period 1 and Period 2 (during the control and PG treatments) were  $590 \pm 190$  and  $580 \pm 170$  g  $\text{day}^{-1}$ , respectively. The LW and BCS at the end of Period 1 were  $425 \pm 37$  kg and  $2.6 \pm 0.2$ , respectively, compared with  $465 \pm 33$  kg and  $2.8 \pm 0.1$ , respectively, at the end of Period 2.

There were no significant differences in LW and BCS between the AMH groups at the start of experiment (LW  $348 \pm 43$  vs  $387 \pm 33$  kg in the AMH L and AMH H groups, respectively ( $P > 0.05$ ); BCS  $2.3 \pm 0.3$  vs  $2.4 \pm 0.4$  in the AMH L and AMH H groups, respectively ( $P > 0.05$ )), at the end of Period 1 (LW  $401 \pm 31$  vs  $444 \pm 31$  kg in the AMH L and AMH H groups, respectively ( $P > 0.05$ ); BCS  $2.6 \pm 0.1$  vs  $2.6 \pm 0.2$  in the AMH L and AMH H groups, respectively ( $P > 0.05$ )) or at

the end of Period 2 (LW  $447 \pm 29$  vs  $478 \pm 30$  kg in the AMH L and AMH H groups, respectively ( $P > 0.05$ ); BCS  $2.7 \pm 0.1$  vs  $2.8 \pm 0.1$  in the AMH L and AMH H groups, respectively ( $P > 0.05$ )).

### Plasma concentrations of metabolites and metabolic hormones

Changes in plasma insulin and metabolite concentrations in heifers according to AMH level after the administration of water (control group) or PG are shown in Figs 2 and 3. A period effect was observed for insulin, glucose, urea and IGF1 and was taken into account in all models. As expected, there were treatment, time and interaction effects on insulin, glucose, BHB and urea concentrations obtained over the 2-h sampling period. Glucose concentrations were increased immediately after PG administration (0 min) to heifers and were higher up to 120 min after administration ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. Insulin concentrations were increased from 15 until 120 min after PG administration in AMH H and AMH L heifers ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. There was no effect of AMH group on glucose and insulin concentrations. BHB concentrations were lower before and after PG administration in the AMH L group ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. In AMH H heifers, BHB concentrations were lower at  $-10$ ,



**Fig. 3.** Plasma concentrations of (a)  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and (b) urea in heifers with different anti-Müllerian hormone (AMH) profiles (low = L and high = H) in relation to an oral drench with propylene glycol (PG) or water (control) given on Day 7 of a synchronised oestrous cycle. (□), control; (■), PG. <sup>a,b</sup> $P < 0.05$ , <sup>a,c</sup> $P < 0.01$  for differences between treatments for a given time point. Water or PG was administered at 1600 hours (0 min).

**Table 2.** Effect of oral treatment (water (control) vs propylene glycol) on plasma insulin-like growth factor 1 and progesterone concentrations in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles measured over 0–9 days of an induced oestrous cycle

Data are the least squares mean  $\pm$  s.e.m. Within rows, values with different superscript letters differ significantly. AMH L, low (1–80 pg mL<sup>-1</sup>) anti-Müllerian hormone (AMH); AMH H, high ( $\geq 150$  pg mL<sup>-1</sup>) AMH; P4, progesterone; PG, propylene glycol; T, oral treatment; AMH  $\times$  T, interaction between AMH and oral treatment

|                             | Day of oestrus | AMH L (n=7)                     |                                 | AMH H (n=9)                     |                               | Statistical significance                       |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--|
|                             |                | Control                         | PG                              | Control                         | PG                            |  |
| IGF1 (ng mL <sup>-1</sup> ) | 0              | 228.9 $\pm$ 27.5                | 225.6 $\pm$ 27.5                | 259.6 $\pm$ 24.2                | 265.9 $\pm$ 24.2              | NS   |
|                             | 2              | 217.9 $\pm$ 27.5 <sup>a,b</sup> | 246.2 $\pm$ 27.5 <sup>a,b</sup> | 235.7 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup>   | 277.7 $\pm$ 24.2 <sup>a</sup> | T $P \leq 0.05$                                |
|                             | 5              | 186.8 $\pm$ 27.5 <sup>b</sup>   | 241.5 $\pm$ 27.5 <sup>a</sup>   | 246.2 $\pm$ 24.2 <sup>a,b</sup> | 285.2 $\pm$ 24.2 <sup>a</sup> | T $P \leq 0.05$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.01$ |
|                             | 7              | 242.1 $\pm$ 27.5 <sup>c</sup>   | 317.0 $\pm$ 27.5 <sup>a,b</sup> | 298.5 $\pm$ 24.2 <sup>b,c</sup> | 367.6 $\pm$ 24.2 <sup>a</sup> | T $P \leq 0.01$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.01$ |
|                             | 9              | 202.5 $\pm$ 27.5                | 218.6 $\pm$ 27.5                | 222.6 $\pm$ 24.2                | 246.2 $\pm$ 24.2              | NS   |
| P4 (ng mL <sup>-1</sup> )   | 0              | 1.3 $\pm$ 0.3                   | 1.1 $\pm$ 0.3                   | 1.4 $\pm$ 0.3                   | 1.3 $\pm$ 0.4                 | NS   |
|                             | 5              | 3.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>      | 2.6 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>      | 4.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>      | 2.9 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>    | T $P \leq 0.05$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.01$ |
|                             | 9              | 7.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>      | 6.2 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>      | 8.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>      | 6.4 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>    | T $P \leq 0.01$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.01$ |

15, 45, 60, 90 and 120 min ( $P < 0.05$ ) after PG administration compared with the control group. Urea concentrations were lower throughout the sampling period in heifers administered PG compared with the control group ( $P < 0.05$ ). There was no effect of AMH group on urea concentrations.

Changes in IGF1 plasma concentrations on Days 0, 2, 5, 7 and 9 of the oestrous cycle are given in Table 2. IGF1 was significantly increased by PG administration on Days 5 and 7 in AMH L heifers ( $P < 0.05$ ) and on Days 2 and 7 ( $P < 0.05$ ) in AMH H heifers compared with the control group. On Day 5,

**Table 3. Effect of oral treatment (water (control) vs propylene glycol) on numbers of different sized follicles in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles**

Data are the least squares mean  $\pm$  s.e.m. Within rows, values with different superscript letters differ significantly. AMH L, low ( $1-80 \text{ pg mL}^{-1}$ ) anti-Müllerian hormone (AMH); AMH H, high ( $\geq 150 \text{ pg mL}^{-1}$ ) AMH; PG, propylene glycol; T, oral treatment; AMH  $\times$  T, interaction between AMH and oral treatment; OPU, ovum pick-up

|  | AMH L ( $n=7$ )  |                      | AMH H ( $n=9$ )     |                  | Statistical significance                         |
|--|------------------|----------------------|---------------------|------------------|--|
|  | Control          | PG                   | Control             | PG               |  |
| Day 2 of oestrous cycle (2 days before superovulation) |                  |                      |                     |                  |  |
| Follicles 2–3 mm                                       | $5.1 \pm 0.7^d$  | $9.6 \pm 0.7^b$      | $7.6 \pm 0.6^c$     | $12.2 \pm 0.6^a$ | T $P \leq 0.0001$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.01$ |
| Follicles 4–8 mm                                       | $1.4 \pm 1.8$    | $2.3 \pm 1.8$        | $2.2 \pm 1.6$       | $1.8 \pm 1.6$    | NS   |
| Follicles >8 mm  | $0.5 \pm 0.6$    | $0.4 \pm 0.6$        | $1.2 \pm 0.6$       | $0.3 \pm 0.6$    | NS   |
| Follicles 2–8 mm                                       | $6.5 \pm 2.0^b$  | $11.9 \pm 2.0^{a,c}$ | $9.8 \pm 1.8^{b,c}$ | $14.0 \pm 1.8^a$ | T $P \leq 0.01$                                  |
| Day 5 of oestrous cycle (at OPU):                      |                  |                      |                     |                  |  |
| Follicles 2–3 mm                                       | $0.4 \pm 0.7$    | $0.5 \pm 0.7$        | $0.0 \pm 0.6$       | $0.0 \pm 0.6$    | NS   |
| Follicles 4–8 mm                                       | $12.7 \pm 1.8^c$ | $13.7 \pm 1.8^c$     | $29.8 \pm 1.6^b$    | $33.7 \pm 1.6^a$ | T $P \leq 0.05$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.0001$ |
| Follicles >8 mm  | $3.2 \pm 0.6$    | $1.7 \pm 0.6$        | $2.4 \pm 0.6$       | $2.9 \pm 0.6$    | NS   |
| Follicles 2–8 mm                                       | $13.1 \pm 2.0^c$ | $14.2 \pm 1.5^c$     | $29.8 \pm 1.8^b$    | $33.7 \pm 1.8^a$ | T $P \leq 0.05$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.0001$ |

**Table 4. Effect of oral treatment (water (control) vs propylene glycol) on oocyte collection in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles**  
Unless indicated otherwise, data are the least squares mean  $\pm$  s.e.m. Within rows, values with different superscript letters differ significantly. AMH L, low ( $1-80 \text{ pg mL}^{-1}$ ) anti-Müllerian hormone (AMH); AMH H, high ( $>150 \text{ pg mL}^{-1}$ ) AMH; PG, propylene glycol; T, oral treatment; AMH  $\times$  T, interaction between AMH and oral treatment

|                       | AMH L ( $n=7$ )  |                 | AMH H ( $n=9$ )  |                  | Statistical significance                         |
|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|--|
|                       | Control          | PG              | Control          | PG               |  |
| No. oocytes collected | $10.5 \pm 1.7^b$ | $9.1 \pm 1.7^b$ | $22.7 \pm 1.5^a$ | $24.1 \pm 1.5^a$ | AMH $\times$ T $P \leq 0.0001$                   |
| No. Grade 1–3 oocytes | $8.5 \pm 1.5^b$  | $7.2 \pm 1.5^b$ | $20.1 \pm 1.4^a$ | $21.6 \pm 1.4^a$ | AMH $\times$ T $P \leq 0.0001$                   |
| % Grade 1–3 oocytes   | 81.0             | 79.5            | 88.3             | 89.8             | NS   |
| No. Grade 1 oocytes   | $2.8 \pm 0.5^c$  | $3.2 \pm 0.5^c$ | $4.5 \pm 0.4^b$  | $6.9 \pm 0.4^a$  | T $P \leq 0.0001$ ; AMH $\times$ T $P \leq 0.01$ |
| % Grade 1 oocytes     | $26.5^{a,b}$     | $35.4^a$        | $19.8^b$         | $28.6^{a,b}$     | AMH $\times$ T $P \leq 0.05$                     |

IGF1 tended to be increased by PG treatment ( $P < 0.1$ ) in AMH H compared with control heifers. In addition, IGF1 plasma concentrations were influenced by the day of the oestrous cycle: IGF1 was higher on Day 7 after PG administration in AMH L and AMH H heifers ( $P < 0.05$ ) and on Day 7 after water administration (control group) in AMH H heifers ( $P < 0.05$ ) compared with the other days.

A positive correlation was found between the AUC of insulin on Day 7 and: (1) IGF1 on Day 7 ( $r = 0.45$ ,  $P = 0.01$ ); (2) the number of small (2–3 mm) follicles on Day 2 ( $r = 0.45$ ,  $P = 0.0094$ ); (3) the number of 2–8 mm diameter follicles on Day 2 ( $r = 0.40$ ,  $P = 0.0247$ ); and (4) the number of Grade 1 oocytes ( $r = 0.39$ ,  $P = 0.0253$ ). In addition, a positive correlation was found between IGF1 on Day 7 and: (1) the number of small follicles (2–3 mm) on Day 2 ( $r = 0.54$ ,  $P = 0.0013$ ); (2) the number of 2–8 mm diameter follicles on Day 2 ( $r = 0.56$ ,  $P = 0.0008$ ); and (3) the number Grade 1 oocytes on Day 5 ( $r = 0.37$ ,  $P = 0.0381$ ).

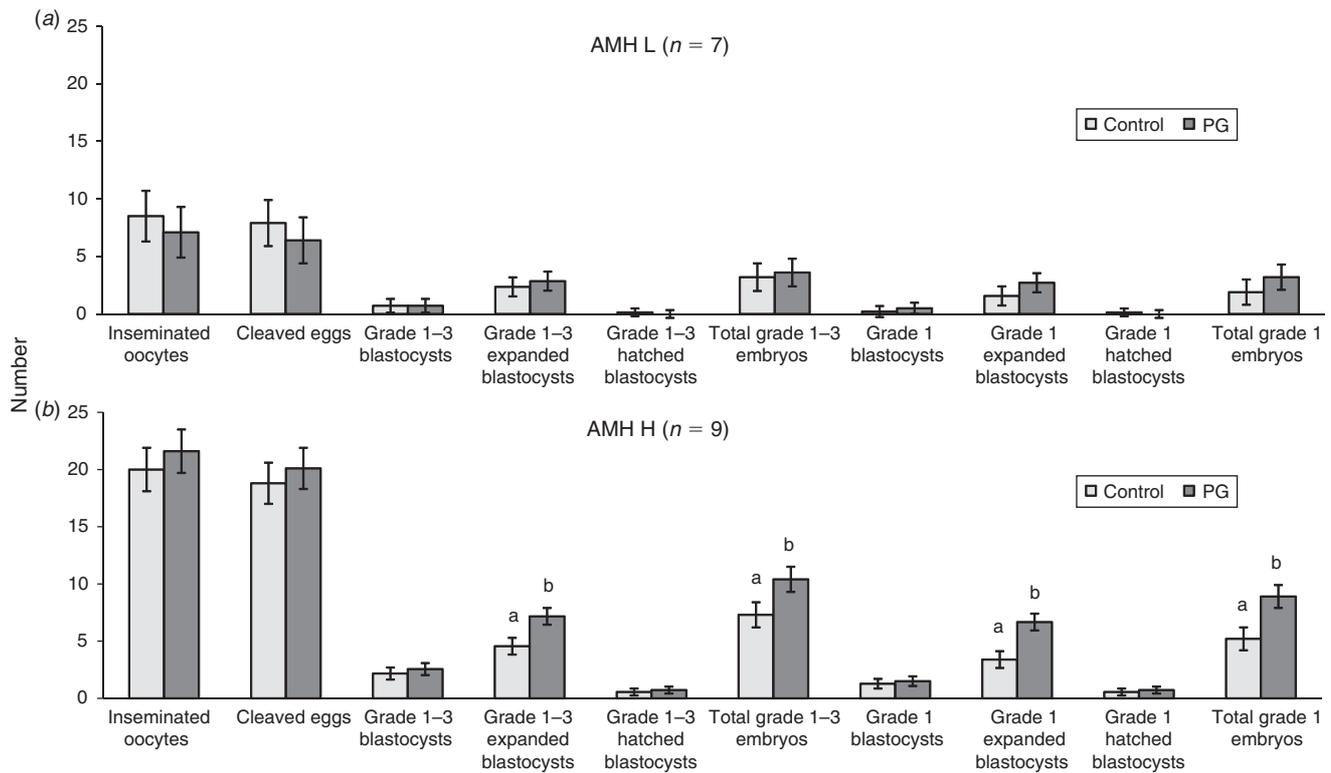
#### Plasma P4 concentrations

Plasma P4 concentrations were lower with PG treatment on Days 5 and 9 in all heifers ( $P < 0.05$ ). As expected, P4 concentrations increased as the oestrous cycle progressed in both treatment groups (Table 2).

#### Follicular characteristics, oocyte collection and embryo production

Follicular characteristics are presented in Table 3. A period effect was observed for small follicles on Day 2 (two days before superovulation) and was taken into account in all models. Differences in the number of follicles between treatments were observed on Day 2: the number of small (2–3 mm) follicles was higher with PG treatment in the AMH L and in AMH H groups ( $P < 0.0001$ ) compared with the control group. No significant differences were found between treatments in the number of medium (4–8 mm) and large (>8 mm) follicles on Day 2. On Day 5, the number of medium (4–7 mm) follicles was higher after PG administration in the AMH H ( $P < 0.05$ ) compared with control. No differences were found between treatments in AMH L heifers. There were no differences between treatments for the number of small and large follicles on Day 5.

Oocyte collection results are given in Table 4. There was an effect of AMH level on the morphological quality of oocytes in response to treatment. The average number of Grade 1 oocytes was increased in the PG compared with control group of AMH H heifers ( $P < 0.0001$ ), whereas the percentage of Grade 1 oocytes tended to be higher in the PG than control group of AMH L heifers ( $P < 0.1$ ). The recovery rate (no. collected oocytes/aspirated follicles) was unaffected by AMH level and treatment



**Fig. 4.** Effects of an oral drench with propylene glycol (PG) or water (control) on embryo production in heifers with different anti-Müllerian hormone (AMH) profiles: (a) low (L) and (b) high (H). Data are the least squares mean  $\pm$  s.e.m. Mean values with different letters differ significantly ( $P \leq 0.05$ ).

(64.2% and 57.0% in the control and PG AMH L groups, respectively; 69.9% and 65.6% in the control and PG AMH H groups, respectively).

Embryo production results are shown in Fig. 4. There were no differences in the number of inseminated oocytes and cleavage rate between PG and control groups in both the AMH L and AMH H groups. PG increased the total number of Day 7 Grade 1-3 blastocysts and Grade 1 blastocysts compared with control treatment in AMH H heifers ( $P < 0.01$ ), but not in AMH L heifers. This effect was specifically seen as an increase in expanded blastocysts (AMH H PG  $>$  AMH H Control). PG increased the percentage of Day 7 Grade 1-3 blastocysts, expressed as a percentage of inseminated oocytes, compared with control treatment in both AMH H (48.3% vs 36.4% for PG vs control, respectively;  $P < 0.05$ ) and AMH L (50.0% vs 37.8% for PG vs control, respectively;  $P < 0.05$ ) heifers. PG increased the percentage of Day 7 Grade 1 blastocysts, expressed as a percentage of inseminated oocytes, compared with control treatment in both AMH H (41.1% vs 26.1% for PG vs control, respectively;  $P < 0.01$ ) and AMH L (45.0% vs 22.7% for PG vs control, respectively;  $P < 0.01$ ) heifers. PG increased the number of Grade 1 blastocysts compared with control treatment in AMH H heifers (+3.7;  $P < 0.01$ ). However, although the same effect was observed in AMH L heifers, it was not significant (+1.3;  $P > 0.05$ ). The average number of 2-8 mm diameter follicles on Day 5, the number of oocytes collected, the number

of cleaved eggs and all grades of Day 7 blastocysts were higher in AMH H heifers compared with AMH L heifers regardless of treatment (Tables 3, 4; Fig. 4;  $P < 0.01$ ).

Correlation coefficients between AMH concentrations and follicular characteristics, oocytes collected and blastocysts produced per treatment are given in Table 5. There was a positive correlation between the number of Grade 1 blastocysts produced and AMH concentrations for both treatments (Fig. 5).

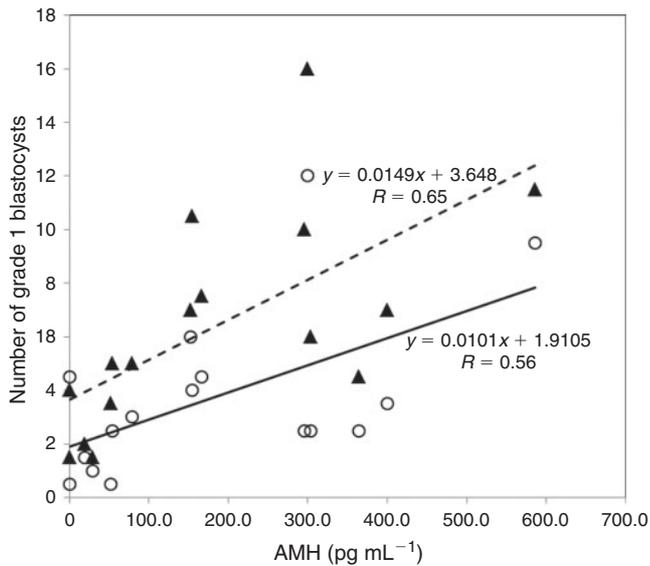
Kinetic results showed that PG significantly increased the maturity of embryos at 48 h post insemination (h.p.i.). There were more 8-cell embryos than 2- and 4-cell embryos at 48 h.p.i. after PG compared with control treatment for both groups of heifers (Fig. 6).

## Discussion

The main finding of the present study was that a short-term PG drench increased the total number of Day 7 Grade 1-3 and Grade 1 embryos in a group of heifers with high AMH but not in a group with low AMH. More specifically, PG increased the number of expanded blastocysts at Day 7 compared with control (water) treatment in AMH H heifers. In addition, the kinetics of embryo development were accelerated by PG, with significantly more 8-cell embryos at 48 h.p.i. compared with the control groups of both AMH H and AMH L heifers. Economically, PG treatment to increase the number of Grade 1 blastocysts is

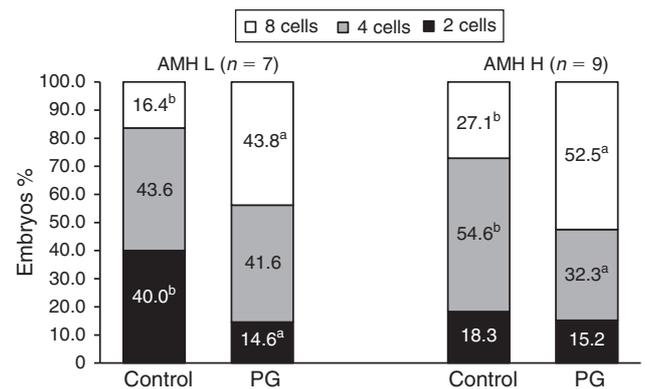
**Table 5.** Effect of an oral treatment (water (control) vs propylene glycol) on the correlation between anti-Müllerian hormone levels and follicle numbers, oocyte collection and embryo production in heifers, measured after an induced oestrous cycle (Day 0) and superovulation (Day 5)  
PG, propylene glycol; OPU, ovum pick-up

|   | No. heifers | Control |         | PG   |         |
|---|-------------|---------|---------|------|---------|
|   |             | r       | P-value | r    | P-value |
| <b>Follicle numbers</b>                                 |             |         |         |      |         |
| Day 2 of oestrous cycle (2 days before superovulation): |             |         |         |      |         |
| Follicles 2–3 mm  | 16          | 0.64    | 0.0071  | 0.34 | 0.1939  |
| Follicles 2–8 mm  | 16          | 0.71    | 0.0020  | 0.22 | 0.4064  |
| Total follicles 2->8 mm                                 | 16          | 0.72    | 0.0015  | 0.24 | 0.3765  |
| Day 5 of oestrous cycle(at OPU):                        |             |         |         |      |         |
| Follicles 2–8 mm  | 16          | 0.90    | <0.0001 | 0.74 | 0.0010  |
| Total follicles 2->8 mm                                 | 16          | 0.87    | <0.0001 | 0.75 | 0.0009  |
| <b>Oocyte collection</b>                                |             |         |         |      |         |
| Collected oocytes                                       | 16          | 0.84    | <0.0001 | 0.80 | 0.0002  |
| Grade 1–3 oocytes                                       | 16          | 0.60    | 0.0133  | 0.72 | 0.0016  |
| Grade 1 oocytes   | 16          | 0.45    | 0.0792  | 0.80 | 0.0002  |
| <b>Embryo production</b>                                |             |         |         |      |         |
| Day 7 Grade 1–3 blastocysts                             | 16          | 0.60    | 0.0133  | 0.72 | 0.0016  |
| Day 7 Grade 1 blastocysts                               | 16          | 0.56    | 0.0250  | 0.65 | 0.0068  |



**Fig. 5.** Total number of Grade 1 blastocysts produced after a synchronised oestrous cycle in heifers according to anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations ( $n = 16$ ) after oral water (control:  $\circ$ ; regression: —) or propylene glycol (PG;  $\blacktriangle$ ; regression: - - -) treatment.

promising because it could provide average gains of 1.3 and 3.7 embryos in the AMH L and AMH H groups, respectively, following superovulation treatment. The cost of the treatment that was used in the present experiment (400 mL day<sup>-1</sup> PG per heifer over 5 days) would be in the region of €7–8 euros per heifer. Similar positive effects on fertility could be expected by manipulating the diet in such a way that insulin concentrations are raised before insemination (Garnsworthy *et al.* 2009).



**Fig. 6.** Effects of an oral drench with propylene glycol (PG) or water (control) on the developmental kinetics of early bovine embryos (48 h after IVF) in heifers with different anti-Müllerian hormone (AMH) profiles (low = L and high = H). (■), percentage of 2-cell embryos; (■), percentage of 4-cell embryos; (□), percentage of 8-cell embryos. <sup>a,b</sup> $P \leq 0.05$  between control and PG groups in the percentage of 8-, 4- and 2-cell embryos.

However, the advantage with PG drenches is that they do not modify rumen fermentation and do not decrease rumen pH (increased risk of acidosis), which would be the case if extra cereals were used in the diet to increase insulin.

The administration of 400 mL PG as an oral drench increased insulin, IGF1 and glucose concentrations and decreased BHB and urea concentrations in all heifers. This is in agreement with results reported previously (Grummer *et al.* 1994; Christensen *et al.* 1997; Miyoshi *et al.* 2001). Increases in IGF1 have been reported in other studies with PG treatment (Hidalgo *et al.* 2004; Gamarra *et al.* 2014) and with high dietary energy intake (Burgwald-Balstad *et al.* 1995; Yelich *et al.* 1996; Lalman

*et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2001). The long-term effect of PG on BHB and urea was probably due to profound effects on intermediary metabolism. Indeed, the animals had been receiving PG for 7 days before the serial blood samples were taken. BHB and urea were lower in the PG group than in the control group before the daily administration of PG and remained so throughout the whole serial sampling period. This is consistent with the results of other studies showing that PG, provided daily as an oral drench, decreases BHB concentrations, which remained low throughout the time that PG was administered (Grummer *et al.* 1994). Circulating BHB concentrations depend on the balance between production (incomplete oxidation of fatty acids and rumen fermentation) and tissue catabolism. Because the dietary source of BHB would have been the same for all animals, PG probably acts by stimulating BHB oxidation through the Krebs cycle. Plasma urea concentrations were lower in the PG than control group and this may be due to the effect of PG on insulin. Insulin stimulates muscle synthesis (Jepson *et al.* 1988) and PG treatment may have therefore resulted in amino acid fixation rather than oxidation and the formation of urea. Thus, the improvement in embryo production observed after PG treatment appears to be associated with raised insulin and IGF1 concentrations. However, when the effect of PG administration on oocyte developmental competence was evaluated in negative energy balance postpartum dairy cows, despite numerical increases in insulin and glucose and a higher cleavage rate and blastocyst yield in treated cows, the differences did not reach statistical significance (Rizos *et al.* 2008).

What is interesting in the present study is that although PG increased the number of small (2–3 mm) follicles on Day 2 during the first follicle wave in both AMH groups compared with control treatment, it only continued to have a positive effect on the number of medium (4–8 mm) follicles on Day 5 in the AMH H group. The ovaries of the AMH L group no longer appeared to be responsive to PG and its effects to increase insulin and IGF1 concentrations. Indeed, at the time of oocyte collection on Day 5, the total number of oocytes collected did not differ between the PG and control treatment groups, but the percentage of Grade 1 oocytes collected was affected by treatment (PG > control). A short-term increase in feed intake has been associated with increased small follicle recruitment in other studies; however, this effect was not associated with a higher number of follicles aspirated at OPU (Gutierrez *et al.* 1997; Armstrong *et al.* 2001; Freret *et al.* 2006). The increase in the number of small follicles before superovulation treatment was associated with higher plasma concentrations of insulin and IGF1, which act in synergy with gonadotrophins (Gong 2002; Freret *et al.* 2006). Insulin and IGF1 are involved in the proliferation and steroidogenesis of granulosa cells from small follicles (Gong *et al.* 1993; Butler and Le Roith 2001). Although both insulin and IGF1 concentrations were increased in AMH H and AMH L heifers after administration of PG compared with control treatment, PG was only able to increase the superovulatory response in AMH H heifers.

Despite having similar numbers of inseminated oocytes and cleaved eggs in both treatment groups, there was a significant increase in Day 7 Grade 1–3 blastocysts and Grade 1 blastocysts (expressed as a percentage of fertilised oocytes) after PG compared with control treatment in both AMH groups of heifers.

These results are related to the quality of oocytes and their developmental competence. PG administration increased the number of Grade 1 oocytes in AMH H heifers and tended to increase the percentage of Grade 1 oocytes in AMH L heifers. Indeed, short-term changes in dietary energy intake influence both oocyte morphology and developmental potential (McEvoy *et al.* 1995; O'Callaghan *et al.* 2000). There is a high concordance between systemic and follicular fluid concentrations of IGF1, suggesting that follicles may regulate the uptake of systemic IGF1 (McEvoy *et al.* 1995; O'Callaghan *et al.* 2000). The observations that intra-ovarian IGF1 can regulate the response of granulosa and theca cells to gonadotrophin (Armstrong and Webb 1997; Webb *et al.* 1999; Vanholder *et al.* 2005) implicates this hormone as a candidate for mediating the effects of metabolic hormones on ovarian function and regulating oocyte developmental competence (Armstrong *et al.* 2001; Leroy *et al.* 2005). Changes in the ovarian IGF system have been shown to increase the sensitivity of follicles to FSH and, in combination with a dietary-induced increase in the concentration of circulating insulin and IGF1, contribute to the increased growth rate of the dominant follicle (Armstrong *et al.* 2001). The developmental competence of oocytes is of paramount importance in determining the success of an *in vitro* embryo production protocol (Sirard and Blondin 1996). In agreement with previous research (Blondin *et al.* 1997; Humblot *et al.* 2005), there is increasing evidence that competence is acquired by the oocytes while they are still in the follicle, and this may be related to the IGF system (Armstrong *et al.* 2001).

Although PG altered the metabolic status in both AMH groups, AMH H heifers responded globally better than AMH L heifers in terms of the number of follicles, oocytes recovered and embryos produced. There was a positive correlation between AMH levels and the number of follicles, oocytes recovered and embryos produced after superovulatory treatment. Circulating AMH is a useful predictor of superovulatory response in donor animals. However, further studies are now needed to establish the reason for the difference in response to PG between the two AMH groups. We hypothesised that the difference may be related to ovarian status. PG can increase the number of small follicles in both types of animals, but the superovulatory response was higher in animals with a larger population of potential antral follicles that could be stimulated. Indeed, several groups have suggested that animals with low numbers of small antral follicles (and therefore low AMH) also show low fertility that is associated with the quality of the follicles (decreased sensitivity of granulosa cells to FSH and theca cells to LH), the oocytes and the corpora lutea (Ireland *et al.* 2009; Jimenez-Krassel *et al.* 2009; Mossa *et al.* 2010; Scheetz *et al.* 2012). Similarly to work by Jimenez-Krassel *et al.* (2009) we confirmed that in the control group P4 was lower in AMH L than AMH H heifers. Other strategies may be necessary to take advantage of the increase in the number of small follicles produced by PG treatment. In women diagnosed with low levels of AMH, increased doses of FSH have been used to obtain a better superovulation response (La Marca and Volpe 2006). Furthermore, the higher percentage of Grade 1 expanded blastocysts obtained in AMH H animals following PG compared with control (water) treatment suggests that the insulin and IGF1

system can act on the ovaries of these animals by increasing the quality and competence of oocytes.

Nutrition during the development of the ovulatory follicle or early formation of the corpus luteum may affect the further development of the corpus luteum (Gutierrez *et al.* 1997). In both control and treatment periods, all AMH L and AMH H heifers ovulated and had a corpus luteum on Days 5 and 7 (observed by ultrasonography) in response to the synchronisation treatment. PG administration reduced P4 concentrations compared with control treatment on Days 7 and 9. This decrease could have been due to an increase in P4 catabolism. Leiva *et al.* (2013) have reported a diminution in P4 concentrations in cows supplemented with a similar dose of PG, probably by enhanced portal vein blood flow (Kristensen and Raun 2007) and consequently circulating P4 hepatic catabolism (Sangsritavong *et al.* 2002). Over 90% of P4 in hepatic portal blood is metabolised during the first pass through the liver (Parr *et al.* 1993). Any increase in liver blood flow would likely produce a similar increase in P4 catabolism (Vasconcelos *et al.* 2003). In addition, insulin causes liver hypertrophy (Starzl *et al.* 1973) and could therefore increase P4 catabolism.

In summary, the results presented here show, for the first time, the response to PG in two groups of growth-restricted heifers with different ovarian populations of small follicles. This study shows that a short-term oral drench with PG increases systemic concentrations of metabolic factors (insulin, IGF1 and glucose) known to be positively related to fertility in heifers. It is interesting to note that PG selectively increased the number of follicles measured during superovulation, oocytes collected after superovulation and excellent quality, more advanced embryos. However, this effect was only observed in AMH H and not AMH L heifers. Therefore, PG was not able to compensate for the relatively poor superovulatory response observed in AMH L heifers. Further work is required to determine whether it is possible to improve the superovulatory response in heifers with low AMH.

### Conflict of interest

None declared.

### Acknowledgements

The authors thank Philippe Gauthier (DIFAGRI) for the gift of the PG, Mohammed Sehnine and Cyril Palleau for help during blood sample collection and OPU, and the farm workers at the experimental station farm of MIDATEST. The technical assistance of Christine Ficheux is also acknowledged.

### References

- Adamiak, S. J., Mackie, K., Watt, R. G., Webb, R., and Sinclair, K. D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* **73**, 918–926. doi:10.1095/BIOLREPROD.105.041483
- Armstrong, D. G., and Webb, R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* **2**, 139–146. doi:10.1530/ROR.0.0020139
- Armstrong, D. G., Mc Evoy, T. G., Baxter, G., Robinson, J. J., Hogg, C. O., and Woad, K. J. (2001). Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.* **64**, 1624–1632. doi:10.1095/BIOLREPROD64.6.1624
- Balogh, O. G., Fébel, H., Huszenicza, G., Kulcsár, M., Abonyi-Tóth, Z., Endrődi, T., and Gábor, G. (2012). Seasonal fertility differences in synchronised dairy cows: ultrasonic, metabolic and endocrine findings. *Acta Vet. Hung.* **60**, 131–143. doi:10.1556/AVET.2012.011
- Barnouin, J., Chillard, Y., Chacornac, J. P., and Lefavre, R. (1986). Microdosage automatisé sans déprotéinisation du 3-hydroxy-butyrat plasmatique chez les bovins. *Ann. Rech. Vet.* **17**, 129–139.
- Bazin, S. (1984). 'In Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie noires'. (Technipiel: Paris.)
- Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A., and Sirard, M. A. (1997). *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* **47**, 1061–1075. doi:10.1016/S0093-691X(97)00063-0
- Boland, M. P., Lonergan, P., and O'Callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology* **55**, 1323–1340. doi:10.1016/S0093-691X(01)00485-X
- Bols, P. E. J., Vandenheede, J. M. M., Van Soom, A., and de Kruif, A. (1995). Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* **43**, 677–687. doi:10.1016/0093-691X(94)00073-4
- Burgwald-Balstad, L. A., Caton, J. S., Burke, V. I., and Olson, K. C. (1995). Influence of forage level and naloxone injection on feed intake, digestion, and plasma hormone and metabolite concentrations in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* **73**, 2677–2686.
- Butler, A. A., and Le Roith, D. (2001). Control of growth by the somatotropic axis: GH and the IGF's have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 141–164. doi:10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.63.1.141
- Callesen, H., Løvendahl, P., Bak, A., and Greve, T. (1995). Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on Day 7 from super-ovulated dairy cattle. *J. Anim. Sci.* **73**, 1539–1543.
- Christensen, J. O., Grummer, R. R., Rasmussen, F. E., and Bertics, S. J. (1997). Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J. Dairy Sci.* **80**, 563–568. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(97)75971-X
- Ferlay, A., and Chilliard, Y. (1999). Effects of the infusion of non-selective beta-, and selective beta1- or beta2-adrenergic agonists, on body fat mobilisation in underfed or overfed non-pregnant heifers. *Reprod. Nutr. Dev.* **39**, 409–421. doi:10.1051/RND:19990401
- Freret, S., Grimard, B., Ponter, A. A., Joly, C., Ponsart, C., and Humblot, P. (2006). Reduction of body-weight gain enhances *in vitro* embryo production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction* **131**, 783–794. doi:10.1530/REP.1.00689
- Gamarra, G., Ponsart, C., Lacaze, S., Marquant-Leguienne, B., Deloche, M.-C., Monniaux, D., and Ponter, A. A. (2014). Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers. *Livest. Sci.* **162**, 240–251.
- Garnsworthy, P. C., Fouladi-Nashta, A. A., Mann, G. E., Sinclair, K. D., and Webb, R. (2009). Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction* **137**, 759–768. doi:10.1530/REP-08-0488
- Gong, J.-G. (2002). Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 229–241. doi:10.1016/S0739-7240(02)00159-5
- Gong, J.-G., McBride, D., Bramley, T. A., and Webb, R. (1993). Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **139**, 67–75. doi:10.1677/JOE.0.1390067
- Greer, R. C., Staigmiller, R. B., and Parrish, J. J. (1992). Female traits, ovary and follicle characteristics, and the conditional probability of normal

- oocyte development after superovulation of beef cows. *J. Anim. Sci.* **70**, 263–272.
- Grummer, R. R., Winkler, J. C., Bertics, S. J., and Studer, V. A. (1994). Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* **77**, 3618–3623. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(94)77306-9
- Gutiérrez, C. G., Campbell, B. K., and Webb, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* **56**, 608–616. doi:10.1095/BIOLREPROD56.3.608
- Guyader-Joly, C., Ponchon, S., Durand, M., Heyman, Y., Renard, J. P., and Ménézo, Y. (1999). Effect of lecithin on *in vitro* and *in vivo* survival of *in vitro* produced bovine blastocysts after cryopreservation. *Theriogenology* **52**, 1193–1202. doi:10.1016/S0093-691X(99)00211-3
- Hidalgo, C. O., Gomez, E., Prieto, L., Duque, P., Goyache, F., Fernandez, L., Fernandez, I., Facal, N., and Diez, C. (2004). Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology* **62**, 664–676. doi:10.1016/J.THERIOGENOL.2003.11.006
- Humblot, P., Holm, P., Lonergan, P., Wrenzycki, C., Lequarré, A. S., Guyader-Joly, C., Herrmann, D., Lopes, A., Rizos, D., Niemann, H., and Callesen, H. (2005). Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* **63**, 1149–1166. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.06.002
- Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Perez, G. I., Evans, A. C. O., and Ireland, J. J. (2008). Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* **79**, 1219–1225. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.071670
- Ireland, J. J., Zielak-Steciwo, A. E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P. G., Smith, G. W., Lonergan, P., and Evans, A. O. C. (2009). Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol. Reprod.* **80**, 954–964. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.073791
- Jepson, M. M., Bates, P. C., and Millward, D. J. (1988). The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *Br. J. Nutr.* **59**, 397–415. doi:10.1079/BJN19830049
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J. S., Lonergan, P., Evans, A. C. O., and Ireland, J. J. (2009). Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* **80**, 1272–1281. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.075093
- Johnson, R. B. (1954). The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Vet.* **44**, 6–21.
- Kristensen, N. B., and Raun, B. M. L. (2007). Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **90**, 4707–4717. doi:10.3168/JDS.2007-0295
- La Marca, A., and Volpe, A. (2006). Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **64**, 603–610. doi:10.1111/J.1365-2265.2006.02533.X
- Lalman, D. L., Williams, J. E., Hess, B. W., Thomas, M. G., and Keisler, D. H. (2000). Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. *J. Anim. Sci.* **78**, 530–538.
- Leiva, T., Cooke, R. F., Aboin, A. C., Soares, H. F., Barbosa, M., Madureira, A. M. L., Borges, M. A. F., and Vasconcelos, J. L. M. (2013). Effects of propiogenic ingredients on serum concentration of insulin and progesterone in non-lactating cows. *Livest. Sci.* **153**, 165–172. doi:10.1016/J.LIVSCI.2013.02.003
- Leroy, J. L., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruijff, A., Genicot, G., and Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction* **130**, 485–495. doi:10.1530/REP.1.00735
- Lozano, J. M., Lonergan, P., Boland, M. P., and O’Callaghan, D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* **125**, 543–553. doi:10.1530/REP.0.1250543
- Majerus, V., De Roover, R., Etienne, D., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., and Donnay, I. (1999). Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* **52**, 1169–1179. doi:10.1016/S0093-691X(99)00209-5
- Mantovani, R., Enright, W. J., Keane, M. G., Roche, J. F., and Bolan, M. P. (1993). Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. In ‘Proceedings of the 9th AETE Meeting, Lyon, France’. (Ed. Fondation Marcel Merieux.) p. 234. (European Embryo Transfer Association: Paris, France.) [Abstract]
- Maplesden, D. C. (1954). Propylene glycol in the treatment of ketosis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **18**, 287–293.
- Marquant-Le Guienne, B. (1998). Petit atlas de l’ovocyte bovin. *Elevage Insémin.* **288**, 24–30.
- McEvoy, T. G., Robinson, J. J., Aitken, R. P., Findlay, P. A., Palmer, R. M., and Robertson, I. S. (1995). Dietary-induced suppression of preovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent *in vivo* and *in vitro* development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.* **39**, 89–107. doi:10.1016/0378-4320(95)01392-D
- Miyoshi, S., Pate, J. L., and Palmquist, D. L. (2001). Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* **68**, 29–43. doi:10.1016/S0378-4320(01)00137-3
- Monniaux, D., di Clemente, N., Touzé, J. L., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., Picard, J. Y., and Fabre, S. (2008). Intrafollicular steroids and anti-Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* **79**, 387–396. doi:10.1095/BIOLREPROD.107.065847
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., and Larroque, H. (2010). Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 1083–1091. doi:10.1071/RD09279
- Morgan, L. M., Hampton, S. M., Tredger, J. A., Cramb, R., and Marks, (1988). Modifications of gastric inhibitory polypeptide (GIP) secretion in man by a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* **59**, 373–380. doi:10.1079/BJN19880046
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Lonergan, P., Evans, A. C. O., and Ireland, J. J. (2010). Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reproduction* **140**, 713–720. doi:10.1530/REP-10-0214
- Nielsen, N. I., and Ingvarsen, K. L. (2004). Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim. Feed Sci. Technol.* **115**, 191–213. doi:10.1016/J.ANI FEEDSCI.2004.03.008
- O’Callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L. J., and Boland, M. P. (2000). Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* **118**, 303–313.
- Papadopoulos, S., Lonergan, P., and Gath, Quinn, K. M., Evans, A. C. O., O’Callaghan, D., and Bolan, M. P. (2001). Effect of diet quantity and

- urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology* **55**, 1059–1069. doi:10.1016/S0093-691X(01)00466-6
- Parr, R. A., Davis, I. F., Miles, M. A., and Squires, T. J. (1993). Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.* **55**, 311–316. doi:10.1016/0034-5288(93)90100-T
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Touze, J., Dupont, M., Briant, E., Remy, E., Beckers, J. F., and Monniaux, D. (2009). Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* **80**, 50–59. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.072157
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé, J.-L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S., and Monniaux, D. (2012). Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod. Fertil. Dev.* **24**, 932–944. doi:10.1071/RD11290
- Rizos, D., Kenny, D. A., Griffin, W., Quinn, K., Duffy, P., Mulligan, F. J., Roche, J. F., Boland, M. P., and Lonergan, P. (2008). The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. *Theriogenology* **69**, 688–699. doi:10.1016/J.THERIOGENOL.2007.12.001
- Sangsrivavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., and Wiltbank, M. C. (2002). High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **85**, 2831–2842. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74370-1
- Santos, J. E., Cerri, L., and Sartori, R. (2008). Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* **69**, 88–97. doi:10.1016/J.THERIOGENOL.2007.09.010
- SAS Institute. (2000). 'SAS/STAT Software: User's Guide, Release 8.0.' (Cary, NC: SAS Institute Inc.)
- Scaramuzzi, R. J., Campbell, B. K., Downing, J. A., Kendall, N. R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M., and Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* **46**, 339–354. doi:10.1051/RND:2006016
- Scheetz, D., Folger, J. K., Smith, G. W., and Ireland, J. J. (2012). Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. *Reprod. Fertil. Dev.* **24**, 327–336. doi:10.1071/RD11020
- Seneda, M. M., Esper, C., Mansano, J., Ademir de Oliveira, J., and Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.* **67**, 37–43. doi:10.1016/S0378-4320(01)00113-0
- Sirard, M. A., and Blondin, P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 417–426. doi:10.1016/0378-4320(96)01518-7
- Starzl, T. E., Francavilla, A., Halgrimson, C. G., Francavilla, F. R., Porter, K. A., Brown, T. H., and Putnam, C. W. (1973). The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal blood. *Surg. Gynecol. Obstet.* **137**, 179–199.
- Vanholder, T., Leroy, J. L., Soom, A. vs, Opsomer, G., Maes, D., Coryn, M., and de Kruif, A. (2005). Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* **87**, 33–44. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.09.006
- Vasconcelos, J. L. M., Sangsrivavong, S., Tsai, S. J., and Wiltbank, M. C. (2003). Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* **60**, 795–807. doi:10.1016/S0093-691X(03)00102-X
- Webb, R., Campbell, B. K., Garverick, H. A., Gong, J.-G., Gutierrez, C. G., and Armstrong, D. G. (1999). Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **54**, 33–48.
- Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J.-G., and Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* **82**(E-Suppl.), E63–E74.
- Yelich, J. vs, Wettemann, R. P., Marston, T. T., and Spicer, L. J. (1996). Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest. Anim. Endocrinol.* **13**, 325–338. doi:10.1016/0739-7240(96)00046-X

**Chapitre 6**

**Etude expérimentale n°3**

**La supplémentation avec du propylène glycol modifie l'expression des gènes du système IGF dans les COCs et l'expression de gènes candidats sélectionnés dans les embryons produits in vitro chez les génisses présentant deux profils contrastés d'AMH et soumises à une alimentation restreinte.**

**G. Gamarra, C. Ponsart, S. Lacaze, F. Nuttinck, A. Cordova, P. Mermillod, B. Le Guienne,  
D. Monniaux, P. Humblot, A.A. Ponter**

En préparation

**Propylene glycol feeding supplementation modifies IGF system gene expression in COC and the expression of selected candidate genes in embryos produced in vitro in feed-restricted heifers with two AMH profiles.**

**Abstract**

Dietary supplementation with propylene glycol (PG) increases the rate of grade 1 in vitro produced embryos from feed restricted females with two AMH profiles (Gamarra et al., 2014 *Reprod. Fertil. Dev*). The aim of this study was to evaluate the effects du PG feeding supplement on (1) the concentrations of insulin and IGF1 in fluid follicular, (2) the gene expression patterns of the IGF system in oocytes (*IGF1R*, *IGFBP2*), in cumulus cells (*IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP2*, *IGFBP4*) and (3) the expression pattern of nine important genes for embryo development (*PLIN2*, *SCD*, *ATPA1*, *GLUT 1*, *AQP3*, *DNMT3A*, *HSPA9B*, *BAX* and *TP53*) in restricted heifers with low and high AMH levels. Feed-restricted heifers (growth rate of 600 g/day) with low (AMH L; 1–80 pgmL<sup>-1</sup>; n=7) or high (AMH H; 150 pgmL<sup>-1</sup> ; n=9) received a single daily drench of 400 mL of water (group restricted, R) from Day 1 to Day 9 of a first synchronized estrous cycle followed by 400 mL of PG from Day 1 to Day 9 of the second synchronized estrous cycle (group restricted + PG, RPG). Ovum Pick-Up (OPU) was performed following stimulation of follicular growth, on Days 5 of each oestrous cycle to produce embryos in vitro and on Days 9 without stimulation of follicular growth to obtain oocytes and cumulus cells. Additional on days 9 insulin and IGF1 levels were measured in follicular fluids, from follicles  $\geq 8$  mm . The same protocol was used in control animals (n=6, growth rate of 900 g/day).

IGF1 concentrations were decreased in follicular fluid from R group compared to control animals in both groups of heifers, these levels were restored with PG; insulin concentrations were not different. In cumulus cells, the expression levels of *IGF1*, *IGFBP4* were decreased in restricted AMH L and AMH H, the expression of *IGF1R* was also reduced in restricted AMH H. PG restored the expression of *IGF1*, *IGF1R* in AMH H group. No differences were observed for the *IGFBP2* gene. In the oocytes, the expression levels of *IGF1R* were decreased only in restricted AMH L and restored after PG administration. No differences were observed for the *IGFBP2* gene. In embryos produced from restricted AMH L animals compared to control animals expression of *PLIN2*, *GLUT1*, *DNMT3A*, *HSPA9B* were decreased and restored after PG supplementation. The expression of *PLIN2*, *SCD*, *GLUT1*, *AQP3*, *DNMT3A*, *BAX* and *HSPA9B* were decreased in embryos produced from restricted

AMH H heifers compared to control. PG restored gene expression of *SCD*, *AQP3*, increased the expression of *GLUT1* and decreased *ATP5A1* gene in AMH H. Additionally PG maintained low expression of *BAX* gene in AMH H compared to AMH B and Control animals. No differences were observed for *TP53* gene. In conclusion, this work shows for the first time that feed restriction and dietary supplementation by PG in heifers modified the pattern of the IGF system in cumulus cells and oocytes and produced changes in gene expression in blastocysts differently in AMH L and AMH H heifers. These results suggest the existence of an epigenetic regulation induced by PG during follicular growth, which can regulate gene expression level up to the blastocyst stage.

**La supplémentation avec du propylène glycol modifie l'expression des gènes du système IGF dans les COCs et l'expression de gènes candidats sélectionnés dans les embryons produits in vitro chez les génisses présentant deux profils AMH soumises à une alimentation restreinte.**

La supplémentation avec du propylène glycol (PG) augmente le pourcentage d'embryons de qualité 1 produits in vitro de génisses soumises à une alimentation restreinte avec deux profils AMH (Gamarra et al., 2014 *Reprod. Fertil. Dev.*).

**Objectif**

Le but de cette étude était d'évaluer les effets de la supplémentation du PG sur (1) les concentrations d'insuline et de l'IGF1 dans le liquide folliculaire, (2) les profils d'expression de gènes du système IGF dans les ovocytes (*IGF1R*, *IGFBP2*), dans les cellules du cumulus (*IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP2*, *IGFBP4*) et (3) le profil d'expression de neuf gènes impliqués dans le métabolisme et du stockage lipidique (*PLIN2*, *SCD*), le métabolisme énergétique (*ATP5A1*, *GLUT1*), la perméabilité des membranes (*AQP3*), les marqueurs épigénétiques (*DNMT3A*), l'apoptose (*BAX*, *TP53*) et la transformation de protéines (*HSPA9B*) sur des blastocystes expansés de qualité 1 chez des génisses restreintes avec des taux d'AMH bas et haut.

**Matériel et méthodes**

**Animaux**

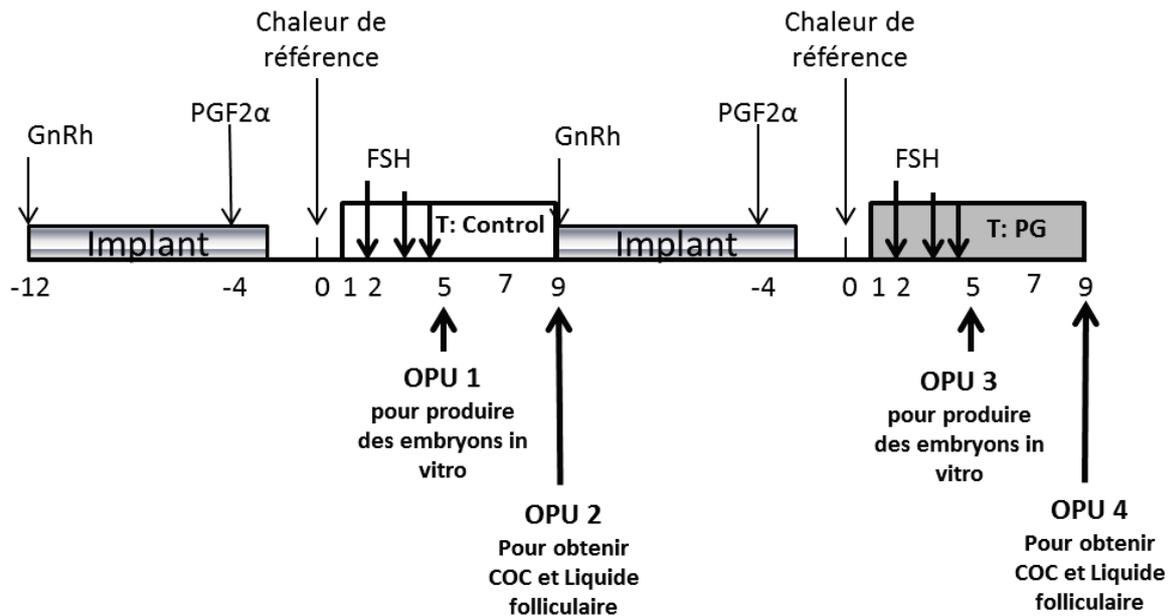
Tout le travail expérimental a été effectué à la station expérimentale de Biotechnologies de l'Union régionale des coopératives d'insémination animale du Sud-ouest de la France (MIDATEST- DENGUIN). Seize génisses laitières Holstein, d'âge de  $15,8 \pm 1,2$  mois, de poids vif moyen de  $370 \pm 41,2$  kg et de condition corporelle de  $2,3 \pm 0,3$  (BCS; sur l'échelle de 0 = mince à 5 = grasse, Bazin, 1984) ont été utilisées pour l'étude. Les génisses ont été confirmées cyclées par palpation rectale avant leur introduction à la station. Avant la période expérimentale, elles ont été allotées en stabulation et ont eu la même alimentation composée de foin de prairie naturelle et d'un concentré commercial. Pendant l'expérience, les génisses ont été logées individuellement et ont reçu les traitements expérimentaux. L'eau était disponible ad libitum.

### **Protocole expérimentale**

Les génisses ont été sélectionnées avant l'expérience selon leur profil d'AMH contrasté : bas (AMH B; 1-80 pgmL<sup>-1</sup>; n = 7) vs. haut (AMH H; 150 pgmL<sup>-1</sup> ; n = 9). Elles ont eu une alimentation restreinte permettant une croissance quotidienne de 600 g/jour et ont reçu une dose quotidienne de 400 ml d'eau (groupe restreint, R-Contrôle) du jour 1 au jour 9 d'un premier cycle d'œstrus synchronisé, suivi de 400 ml de PG du jour 1 au jour 9 lors du second cycle œstral synchronisé (groupe restreint + PG, R-PG). Les Ovum Pick-Up (OPU) ont été réalisés après stimulation FSH les jours 5 et 9 de chaque cycle œstral ; le 5<sup>ème</sup> jour, après stimulation, les ovocytes ont été utilisés pour produire des embryons in vitro et le 9<sup>ème</sup> jour, sans stimulation préalable, les ovocytes et les cellules du cumulus ont été collectés en vue d'analyses de transcriptomie. De plus, lors de l'OPU du jour 9, le liquide folliculaire des follicules supérieurs à 8 mm a été collecté, afin de mesurer les niveaux d'insuline et d'IGF1.

Le même protocole a été appliqué chez un lot témoin de génisses, non restreintes (n = 6, GMQ 900 g/jour) et ne recevant aucune supplémentation (ni PG, ni eau). Ces génisses ont été sélectionnées aléatoirement parmi les 16 génisses, 3 avec des niveaux haut d'AMH et 3 avec des niveaux bas d'AMH. Les blastocystes épanouis produits de qualité 1 ont été analysés conjointement pour l'analyse des gènes.

Le protocole expérimental est détaillé dans la Figure 35.



**Figure 35. Protocole expérimental chez des génisses laitières présentant un profil AMH Bas (B, n=7) et AMH Haut (H, n=9) et soumises à une alimentation restreinte (600 g/j).** Le jour des chaleurs induites a été défini comme jour de référence (J0). Les OPU 1 et 3 ont été réalisées à J5 après stimulation pour l'obtention de COCs et la production in vitro d'embryons. Les OPU 2 et 4 ont été réalisées le jour 9 (sans stimulation) pour l'obtention de liquide folliculaire et COCs. Pour le groupe restreint, les premières synchronisations ont correspondu au traitement contrôle (R-contrôle) avec l'administration d'un placebo (400 ml d'eau) distribué de J1 à J9. Les deuxièmes synchronisations ont correspondu au traitement PG (R-PG) avec l'administration du PG (400 ml). Le même protocole a également été appliqué chez un groupe de génisses Témoin (n=6), ayant reçu une alimentation non restreinte, permettant un GMQ de 900 g/j mais sans supplémentation.

### Régime alimentaire et contrôle de croissance

Après une période d'adaptation de 4 semaines, les génisses ont été nourries avec une ration ajustée pour un objectif de 600 g de gain moyen quotidien (GMQ) et composée d'un concentré commercial et de foin distribués à 8 h du matin. L'eau a été disponible ad libitum.

Le GMQ a été suivi grâce à des doubles pesées réalisées toutes les 2 semaines et la quantité de concentré a été éventuellement réajustée pour obtenir le GMQ souhaité. La NEC a été évaluée toutes les 4 semaines.

### **Ponction folliculaire OPU (Ovum Pick Up)**

Les jours 5 et 9 après synchronisation, l'aspiration folliculaire (OPU) a été réalisée avec un échographe Parus 240 (Esaote Pie Medical, Hospimedi, Valdampierre, France) équipé d'un transducteur multi angle sectoriel de 7.5 MHz. Les génisses ont reçu avant l'aspiration une injection épidurale de lidocaïne (Laocaïne®, Schering-Plough vétérinaire). Un système de guide d'aiguille a été utilisé et les follicules ont été ponctionnés avec des aiguilles de 18 G1 ½ BC montées sur des supports stériles liés à une pompe à vide (Cook Veterinary) reliée à un système de tuyauterie en silicone (Tygon®). Le contenu folliculaire a été recueilli dans des tubes stériles de 50 ml (un tube par animal) contenant du milieu de collecte (EuroFlush®, IMV-Technologies) additionné de 0.5% d'héparine sodique (Héparine Choay®, Sanofi avertis). Les tubes contenant les milieux étaient placés dans un réchauffeur (COOK® V-FTH-2000) calibré à 38,5°C pour éviter tout choc thermique aux ovocytes. Un kit d'aspiration et un support d'aiguilles stériles ont été utilisés pour chaque génisse. Le changement de l'aiguille de ponction a été effectué très régulièrement.

Le jour 9 les liquides folliculaires ont été prélevés dans les follicules de taille > 8 mm. Le liquide a été centrifugé à 3000 rpm pendant 3 minutes, conservé et congelé à -80°C immédiatement.

### **Maturation in vitro, fécondation et culture**

Les COCs obtenus de chaque génisse ont été traités séparément. Les COCs ont été isolés dans des boîtes de pétri et rincés deux fois dans du milieu de collecte. Les ovocytes collectés au cours des sessions d'OPU ont été jugés selon les critères morphologiques classiques (cytoplasme et cellules de cumulus) décrits par Marquant-Leguienne (1998) en quatre catégories : Grade 1, l'ensemble du cumulus oophorus est présent, l'ovocyte vu à travers les cellules du cumulus doit avoir un aspect homogène et une couleur uniforme. Grade 2, nombre de couches de cellules du cumulus supérieur ou égal à 5, cytoplasme de l'ovocyte peut présenter des zones plus ou moins grandes de pigmentation différente, Grade 3, nombre de couches de cellules du cumulus supérieur ou égal à 3, cytoplasme de l'ovocyte peut présenter des zones plus ou moins grandes de pigmentation différente. Grade 4, cumulus oophorus peut être en grande partie ou totalement absent ou expansé, cytoplasme de l'ovocyte peut présenter des zones de pigmentation fortement différente. La maturation in vitro a été réalisée en milieu M199 (M4530 ; Sigma, St Louis, MO, USA), supplémenté avec 10 µg/mL FSH (Stimufol), 50 µg/mL de gentamicyne, 1 µg/mL 17 β-estradiol, 2 µg/mL LH (Stimufol)

et 5 ng/ml de facteurs de croissance. Les COCs de qualité 1, 2 et 3 ont été lavés une fois dans le milieu de maturation avant d'être incubés pendant 24 h à la température de 38.5 °C , sous 95% d' humidité et 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air. La fécondation in vitro (FIV) a été réalisée avec des ovocytes maturés en utilisant de la semence congelée et décongelée avec un taureau de race INRA 95. Le milieu de fécondation a été à base de Tyroïde Albumine Lactate et pyruvate (TALP) avec du sérum d'albumine bovine (BSA), Héparine, penicillamine, hyptaourine et épinephrine. Les ovocytes et spermatozoïdes ont été incubés pendant 18 h à 38.5°C sous 95% d'humidité, 5% CO<sub>2</sub> dans l'air. Le jour de FIV a été défini comme le jour 0.

Après la FIV, les possibles zygotes ont été rincés dans un milieu de culture à base SOF (synthetic oviduct fluid, Minitube) supplémenté avec 0.06 g /mL de BSA, 0.036 g/mL de pyruvate de Na, 10 µl d'acides aminés, 20 µl d'acides aminés non essentiels et 1% sérum de vache en œstrus. Tous les possibles zygotes ont été mis en culture dans 420 µl de milieu de culture sous 400µl d'huile minéral (Sigma-M4810) à 38,5 C°, dans une étuve sous 5 % de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> et 95% d'humidité. Les embryons produits in vitro ont été évalués après 7 et 8 jours de la culture in vitro par leur stade de développement et leur qualité selon les critères décrits par Callesen et al. (1995).

### **Détermination de l'expression des gènes du système IGF, extraction d'ARNm et RT-PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction) dans les cellules du cumulus et dans les ovocytes**

Les COCs obtenus de chaque génisse ont été traités séparément. Les COCs ont été rincés dans du PBS, les cellules du cumulus séparées de l'ovocyte par pipetages répétés. Les ovocytes dénudés ont été rincés dans du PBS sans BSA puis transférés dans des tubes de 1.5ml RNase et DNase free stériles dans un minimum de milieu. Les cellules du cumulus ont été centrifugées à 3000 rpp pendant 3 minutes dans le même type de tube et le surnageant éliminé. Les tubes ont été conservés à -80 °C.

Les niveaux d'expression de gènes *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP2* et *IGFBP4* ont été quantifiés dans les cellules du cumulus et les niveaux d'expression de gènes *IGF1R* et *IGFBP2* dans les ovocytes par la technique RT-qPCR comme décrit précédemment (Khan et al 2012, Touzard et al 2013). La  $\beta$ -*ACTIN* et la protéine ribosomique L19 (*RPL19*) ont été choisis comme les gènes de référence bovine pour la normalisation.

Une quantité totale d'ARN a été extraite d'un pool de 4 à 10 COCs, de 4 à 10 cellules du cumulus ou de 4 à 10 ovocytes avec l'utilisation de ARN-Plus de Quantum (Qbiogen) et PicoPur RNA isolation kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA) respectivement, selon le protocole du fabricant. L'ARN du gène externe luciférase (amorce sense: 5' AGAGATACGCCCTGGTTCCT 3', amorce antisense: 5' ATAAATAACGCGCCCAACAC 3'; Bui et al., 2009) a été additionné par échantillon (1 pg/CC ou ovocyte) pour contrôler l'extraction d'ARN et la transcription inverse. La contamination par l'ADN génomique a été éliminée en utilisant un traitement DNase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir d'ARN total en utilisant oligodT (désoxythymidine) amorces et la transcriptase inverse de Super Script III (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Tous les facteurs ont été examinés par amplification d'un volume de produit de RT-COC correspondant à 0,15 équivalent ovocyte ou cumulus /  $\mu\text{L}$ .

L'ADN complémentaire (ADNc) pour les courbes standards de PCR en temps réel ont été produits comme décrit précédemment (Nuttinck et al 2004). Deux mesures de chaque échantillon ont été réalisées comme répétitions techniques. Les réactions de PCR ont été réalisées en ajoutant 5 $\mu\text{L}$  de produit de RT-PCR au mélange qui contenait 12,5 $\mu\text{L}$  de Master Mix Sybr Green (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 0,5 $\mu\text{L}$  amorce senses et amorce antisenses, 6,5  $\mu\text{L}$  de l'eau (volume total 25  $\mu\text{L}$ ). PCR a été effectuée sur l'appareil StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) en utilisant des conditions de cyclage universels: 95, 8°C pendant 10 min, puis 40 cycles à 95,8 °C pendant 15 s et 60,8 °C pendant 1 min, suivie d'une étape de vérification de fusion de la courbe. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems).

Les amorces conçues étaient basées sur des séquences d'ADNc (telle que décrites ci-dessus) en utilisant un logiciel de conception (Primer Express, Applied Biosystems) ou obtenues à partir de la littérature (Tableaux 13 et 14). Pour tous les facteurs, cinq dilutions log de l'ADNc purifié approprié ont été incluses dans chaque essai et utilisées pour générer une courbe standard. Suite à la PCR, une courbe de fusion a été réalisée sur les produits amplifiés pour s'assurer que des amplicons de PCR spécifiques seulement ont été obtenus et quantifiés. L'expression de tous les ARNm cibles a été déterminée dans chaque échantillon au cours de tests indépendants. Les réactions PCR ont été établies en double exemplaire. La valeur médiane des doublons PCR a été examinée et a ensuite été exprimée comme ratio de moyenne géométrique des ARN m  $\beta$ -ACTIN et RPL19 pour chaque échantillon.

**Tableau 13. Primers utilisés pour la réaction RT-PCR pour produire la gamme standard.**

| Nom du gène | References            |                  | Séquence ( 5'-3')         | Taille du Fragment (pb) |
|-------------|-----------------------|------------------|---------------------------|-------------------------|
| IGF-1       |                       | Amorce sense     | GCAGGAAACAAGAACTACAGA ATG | 262                     |
|             |                       | Amorce antisense | AGGATCAACAGCAATCTACCAAC   |                         |
| IGFR-1      | Amstrong et al., 2000 | Amorce sense     | CCAAGCTAAACCGGCTAAAC      | 310                     |
|             |                       | Amorce antisense | TAATCACCA ACCCTCCCA C     |                         |
| IGFBP-2     | Amstrong et al., 1998 | Amorce sense     | ACTCCCTACACATCCCCA AC     | 120                     |
|             |                       | Amorce antisense | GATCAGCTTCCCGGTGTT AC     |                         |
| IGFBP-4     | Amstrong et al., 1998 | Amorce sense     | ATCGAGGCCATCCAGGAAAGC     | 227                     |
|             |                       | Amorce antisense | CGCCCGGTGCAGCTCACTCTG     |                         |
| β-ACTIN     | Alonso et al., 1986   | Amorce sense     | GACTACCTCATGAAGATCCTC     | 310                     |
|             |                       | Amorce antisense | CGGATGTCCACGTCA CACTTC    |                         |
| RPL19       | Touzard et al., 2013  | Amorce sense     | CCCCAATGAGACCAATGAAATC    | 73                      |
|             |                       | Amorce antisense | CAGCCCATCTTTGATCAGCTT     |                         |

**Tableau 14. Couple d'amorces utilisé pour la RT-PCR en temps réel.**

| Gène    |                  | Séquence ( 5'-3')          | Taille du Fragment (pb) |
|---------|------------------|----------------------------|-------------------------|
| β-ACTIN | Amorce sense     | GCT TTA CCA CCA CAG CCG AG | 101                     |
|         | Amorce antisense | CGA CGC AGC AGT AGC CAT CT |                         |
| PTGS2   | Amorce sense     | TCCGCCAATTATAATGTGCAC      | 101                     |
|         | Amorce antisense | GGCAGTCATCAGGCACAGGA       |                         |
| IGF-I   | Amorce sense     | CAAAAGATGGGCATTTCCCC       | 101                     |
|         | Amorce antisense | CTCCAGGGTCATTTTTGCAAG      |                         |
| IGFR-I  | Amorce sense     | CAATGGGCAGAGCGATCATC       | 81                      |
|         | Amorce antisense | GGACGGATCCCGTGTCTTC        |                         |
| IGFBP-2 | Amorce sense     | ACTGTGACAAGCATGGCCTG       | 81                      |
|         | Amorce antisense | TCACACACCAGCACTCCCC        |                         |
| IGFBP-4 | Amorce sense     | AACAACAGCTTCAGCCCCTG       | 81                      |
|         | Amorce antisense | GGTGCTCCGGTCTCGAATTT       |                         |

### Détermination de l'expression des gènes candidats, extraction d'ARNm et RT-PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction) de blastocystes épanouis.

L'expression de gènes candidats importants pour la survie et qualité embryonnaire a été analysée sur des blastocystes épanouis de qualité 1, au 7ème jour de culture in vitro. Les embryons ont été rincés dans du PBS stérile, placés immédiatement en tubes RNaseDNase-free et congelés à sec et conservés à 80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

Neuf gènes ont été analysés selon les niveaux d'AMH, traitement et période et détaillés dans le Tableau 15. Les gènes choisis dans la présente étude ont été les suivants : *PLIN2* (perilipin 2, aussi connu comme adipophilin) et *SCD* (stearoyl-CoA desaturase) impliqués dans le métabolisme et le stockage lipidique, *ATP5A1* (ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit) et *Glut 1*, associés au métabolisme énergétique, *AQP3* (aquaporin 3), lié à la perméabilité des membranes, *DNMT3A* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A), associé comme marqueurs épigénétiques, *BAX* (Bcl-2-associated X protein) et *TP53* (tumor protein 53), liés à l'apoptose, *HSPA9B* (heat shock 70-kDa protein 9), aussi connu comme mortalin associé à la transformation de protéines.

Chaque gène a été évalué comme relatif de deux gènes de ménage : *RPL19* et *YWHAZ*. Les qPCR analyses ont été répliquées trois fois avec 15 blastocystes épanouis pour chaque traitement.

L'extraction d'ARN ainsi que la transcription reverse vers cDNA ont été réalisées dans l'Unité de Physiologie de Reproduction et Comportements (PRC) de l'INRA (Nouzilly) selon le protocole décrit par Cordova et al. (2014). Pour l'extraction de l'ARN, les embryons ont subis trois gels-dégels en alternant azote liquide bain marie à 32°C et ensuite 200 µL de Trizol® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ont été ajoutés dans chaque échantillon. L'ARN du gène externe luciférase (amorce sense: 5' TCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG 3', amorce antisense: 5'AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC 3') a été additionné en quantité proportionnelle au nombre d'embryons par échantillon (1 pg/embryon) pour contrôler la qualité de l'extraction de l'ARN, transcription reverse et problèmes de manipulation. Chaque tube Eppendorf contenait 5 embryons. Ensuite, 60 µL de Chloroforme a été ajouté à chaque échantillon et incubé pendant 10 minutes sur glace. Après une centrifugation à 14000 g, à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant a été déposé dans un nouveau tube de 1,5 mL. 1 µL de Glycogène, ainsi qu'un volume équivalent d'isopropanol ont été additionnés. Les échantillons ont été ainsi gardés à -20°C pendant une heure pour précipiter l'ARN et le glycogène. Après la centrifugation, le surnageant a été enlevé avec précaution et le culot lavé deux fois avec de l'éthanol à 70% et une fois à 100%. Le culot a été mis en suspension dans une solution d'eau DNase RNase free . Après extraction, les échantillons ont été soumis à un traitement par la DNase et RQ1 DNase (Promega, France) pour éviter de possibles contaminations avec DNA.

Pour la transcription reverse (RT) le kit de Mouse Monoleukemia Virus (MMLV, Invitrogen) Reverse Transcriptase a été utilisé. Dans un premier temps, a été ajouté à l'ARN traité par la DNase (Promega, France) un mélange de primers oligo DT (Promega, France) et random oligos (Promega, France) avec une solution de dNTP et incubés pendant 5 minutes à 70°C. Ensuite, le First Strand Buffer, le DTT, le RNAsin et le MMLV-RT ont été rajoutés et incubés pendant 1 heure à 37°C suivi de 10 minutes à 65°C, selon les indications du fabricant. Après la RT, chaque échantillon a été dilué afin d'obtenir une concentration de 0.01 équivalent embryon /  $\mu\text{L}$ . Du cDNA a été produit indépendamment depuis une production in vitro standard d'embryons éclos pour avoir une courbe standard afin d'évaluer l'efficacité de chaque paire de primers. Toutes les courbes standard ont eu une efficacité près de 1. Les courbes standard ont été diluées trois fois afin d'obtenir 7 points de courbe. q-PCR provenaient des échantillons d'intérêt (analysé par triplicatas) et courbe standard (analysé par duplicatas) ont été analysés dans 20  $\mu\text{L}$  de volume final de réaction par puit (96 puits qPCR par plaque, ThermoScientific AB-0900). Le volume final par puit contenait : 10  $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR master mix (Biorad), 0.15  $\mu\text{L}$  de 25mM d'amorces sens et amorces antisense primers, 4.70  $\mu\text{L}$  of DEPC H<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{L}$  of cDNA substrat (0.01 eq/embryon par  $\mu\text{L}$ , 0.1 eq embryon par  $\mu\text{L}$  comme point initial de la courbe standard ou H<sub>2</sub>O comme contrôle). La réaction a été développée avec real-time PCR dans un appareil MyiQCycler (Biorad Laboratories, Marnes La Coquette, France) selon les recommandations du fabricant. Les conditions d'amplification ont été initiées à 95°C (3 minutes), suivi de 40 cycles à 95°C (30 secondes), 60°C (30 secondes), et 72°C (20 secondes), suivi ensuite par l'acquisition de la courbe de fusion (acquisition de fluorescente chaque 0.5°C). Les primers de chaque gène ont été désignés en utilisant le software primer 3. Les primers ont été testés dans un pool de blastocystes épanouis et une électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) a été réalisée afin d'évaluer la synthèse d'un seul produit et la taille appropriée du fragment amplifié. Les produits de PCR ont été purifiés et envoyés à séquencer au Beckman Coulter Genomics (UK) afin de vérifier la séquence amplifiée. Tous les fragments amplifiés ont eu une similarité près du 100%.

**Tableau 15. Primers utilisés pour RT-qPCR.**

| Nom du gène |                  | Sequence ( 5'-3')         | Taille du Fragment (pb) | Banque de gènes Numero Acc |
|-------------|------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
| PLIN2       | amorce sens      | TCGGCTACGATGATACAGAT      | 195                     | NM_173980.2                |
|             | amorce antisense | ACACAGAGTAGATGTCACCA      |                         |                            |
| SCD         | amorce sens      | TGGCTTTTTCTTCTCTCACG      | 126                     | NM_173959.4                |
|             | amorce antisense | TACCTCCTCTGGAACATCAC      |                         |                            |
| ATP5A1      | amorce sens      | CTCTTGAGTCGTGGTGTGCG      | 184                     | NM_174684.2                |
|             | amorce antisense | CCTGATGTTGGCTGATAACGTG    |                         |                            |
| GLUT1       | amorce sens      | CTGATCCTGGGTCGCTTCAT      | 68                      | NM_174602.2                |
|             | amorce antisense | ACGTACATGGGCACAAAACCA     |                         |                            |
| AQP3        | amorce sens      | GTCCACCACCTCCCCTAGTA      | 196                     | NM_001079794.1             |
|             | amorce antisense | TATCTGGAAAACCACGCACA      |                         |                            |
| DNMT3A      | amorce sens      | CACAGAAGCATATCCAGGAA      | 210                     | NM_001206502.1             |
|             | amorce antisense | GGACCACCACATTCTCAAAG      |                         |                            |
| BAX         | amorce sens      | AGAGGATGATCGCAGCTGTGGA    | 300                     | NM_173894.1                |
|             | amorce antisense | CAAAGATGGTCACTGTCTGCCATGT |                         |                            |
| TP53        | amorce sens      | AGCTGGTGTGGTAGGCAGT       | 180                     | NM_174201.2                |
|             | amorce antisense | CCTCACCATCATCACACTGG      |                         |                            |
| HSPA9B      | amorce sens      | ATTGCCCATGCCAAAAGGCC      | 197                     | NM_001034524.1             |
|             | amorce antisense | AGCACACCTCCCTGAATGGC      |                         |                            |
| GAPDH       | amorce sens      | TTCAACGGCAGTCAAGG         | 119                     | NM_001034034.2             |
|             | amorce antisense | ACATACTCAGCACCAGCATCA     |                         |                            |
| YWHAZ       | amorce sens      | GCATCCCACAGACTATTTCC      | 120                     | NM_174814.2                |
|             | amorce antisense | GCAAAGACAATGACAGACCA      |                         |                            |
| RPL19       | amorce sens      | AATCGCCAATGCCAACTC        | 156                     | NM_00104051.6              |
|             | amorce antisense | CCCTTCGCTTACCTATACC       |                         |                            |

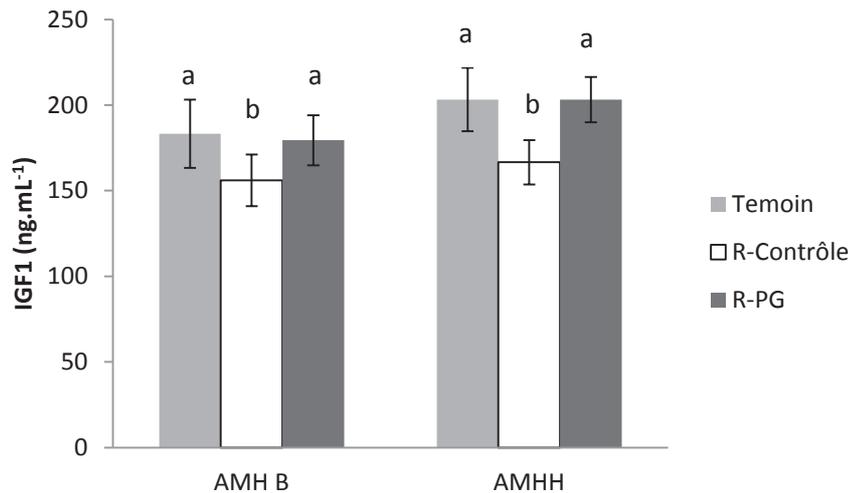
## Principaux Résultats

Cette étude est en cours d'analyse, avec un article en cours de rédaction. Les premiers résultats sont présentés ci-dessous :

### a) Liquide Folliculaire

L'administration de PG a restauré les concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire (pour les deux profils AMH B et AMH H) par rapport au groupe restreint Contrôle. En outre, le niveau d'IGF1 dans le groupe PG a été comparable à celui du groupe Témoin non restreint (Figure 36).

L'administration de PG n'a pas permis d'induire de différences significatives des concentrations d'insuline dans le liquide folliculaire.



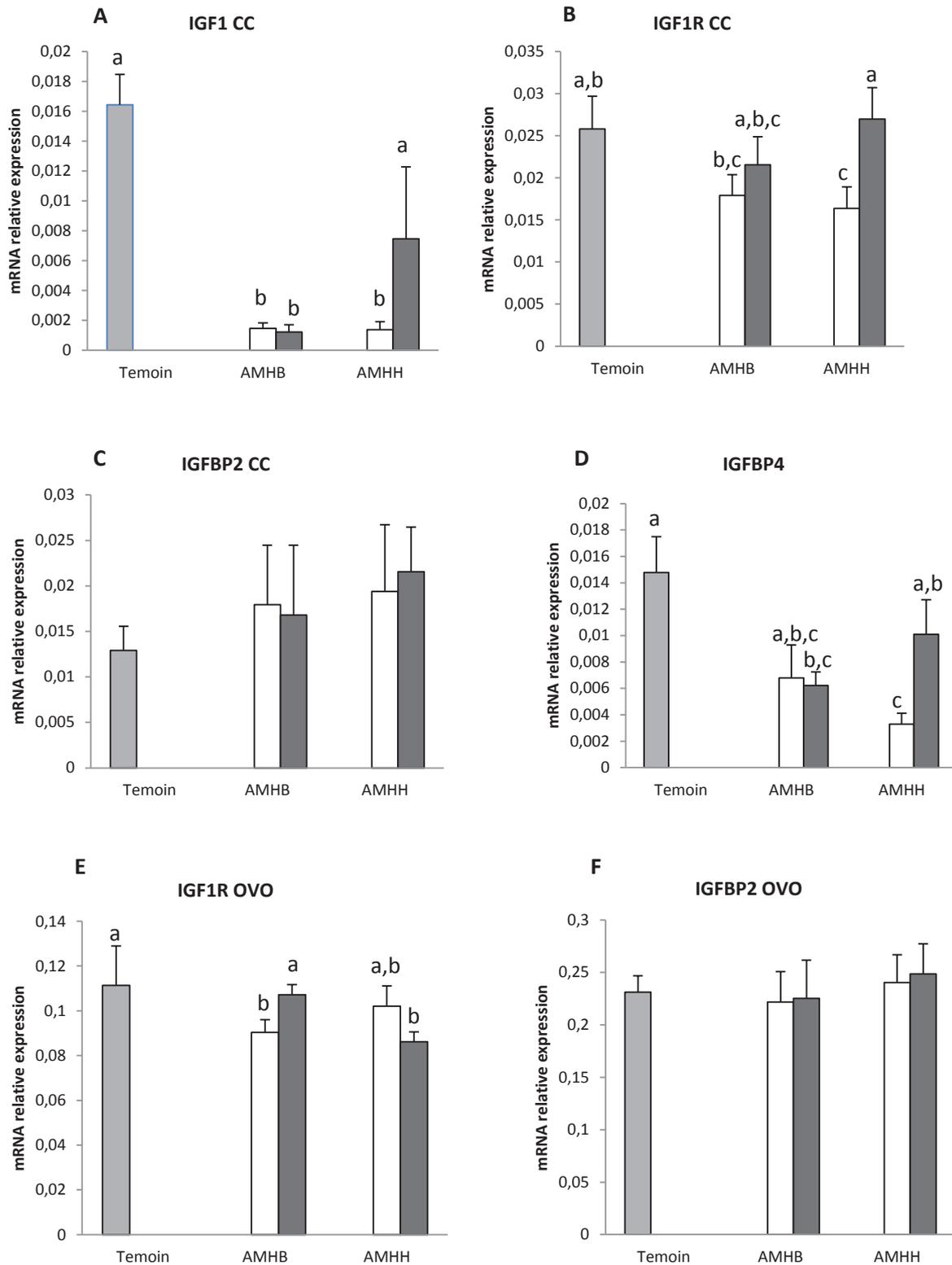
**Figure 36. Concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire (moyenne  $\pm$  SEM) de génisses laitières ponctionnées au 9<sup>ème</sup> jour d'un cycle synchronisé, en fonction du régime alimentaire et de leur niveau d'AMH. a,b (P < 0,05).**

#### **b) Expression des gènes du système IGF1 dans les COCs**

Dans les cellules du cumulus, l'expression de l'ARNm des gènes *IGF1* et *IGFBP4* a été réduite après la période de restriction alimentaire, pour les deux profils d'AMH par rapport au groupe Témoin. L'expression d'*IGF1R* est réduite avec la restriction alimentaire dans le groupe AMH H par comparaison au groupe Témoin. L'administration de PG a restauré les niveaux d'expression des gènes *IGF1*, *IGF1R* et d'*IGFBP4* pour le groupe AMH H. Aucune différence n'a été mise en évidence pour l'expression du gène *IGFBP2* (Figure 37, A, B, C, D). Pour les ovocytes, la restriction n'a pas affecté l'expression des gènes *IGF1R* et *IGFBP2*, cependant la supplémentation de PG a augmenté l'expression d'*IGF1R* pour le groupe AMH B, sans différence significative pour l'expression d'*IGFBP2* (Figure 37, E, F.).

#### **c) Expression de gènes associés à la viabilité des embryons**

La restriction alimentaire a diminué l'expression des gènes *PLIN2*, *GLUT1*, *DNMT3A*, *HSPA9B* dans le groupe AMH B. L'administration de PG a restauré l'expression de ces gènes au même niveau que celui du groupe Témoin. En relation avec le groupe AMH H, la restriction alimentaire a diminué l'expression des gènes *PLIN2*, *SCD*, *GLUT1*, *AQP3*, *DNMT3A*, *BAX* et *HSPA9B* mais PG a restauré l'expression des gènes *SCD*, *AQP3* et a augmenté l'expression du gène *GLUT1* et a diminué l'expression du gène *ATP5A1*. De plus, l'administration de PG a maintenu une expression faible du gène *BAX* par rapport au groupe AMH B et Témoin. Pour *TP53*, aucun effet de la restriction ni de l'administration de PG n'a été mis en évidence (Figure 38).



**Figure 37.** Expression des ARNm des gènes du système IGF dans les cellules du cumulus (A, B, C et D) et dans les ovocytes (E et F) collectés le 9<sup>ème</sup> jour d'un cycle synchronisé, en fonction du régime alimentaire des génisses et du profil d'AMH. AMH H (n=9) vs. AMH B (n=7), restriction alimentaire (R) : R-Contrôle □ ; R-PG ■ vs. Témoin ■ ; groupe Témoin : alimentation non restreinte (n=6) (moyenne ± SEM). a,b,c (P < 0,05).

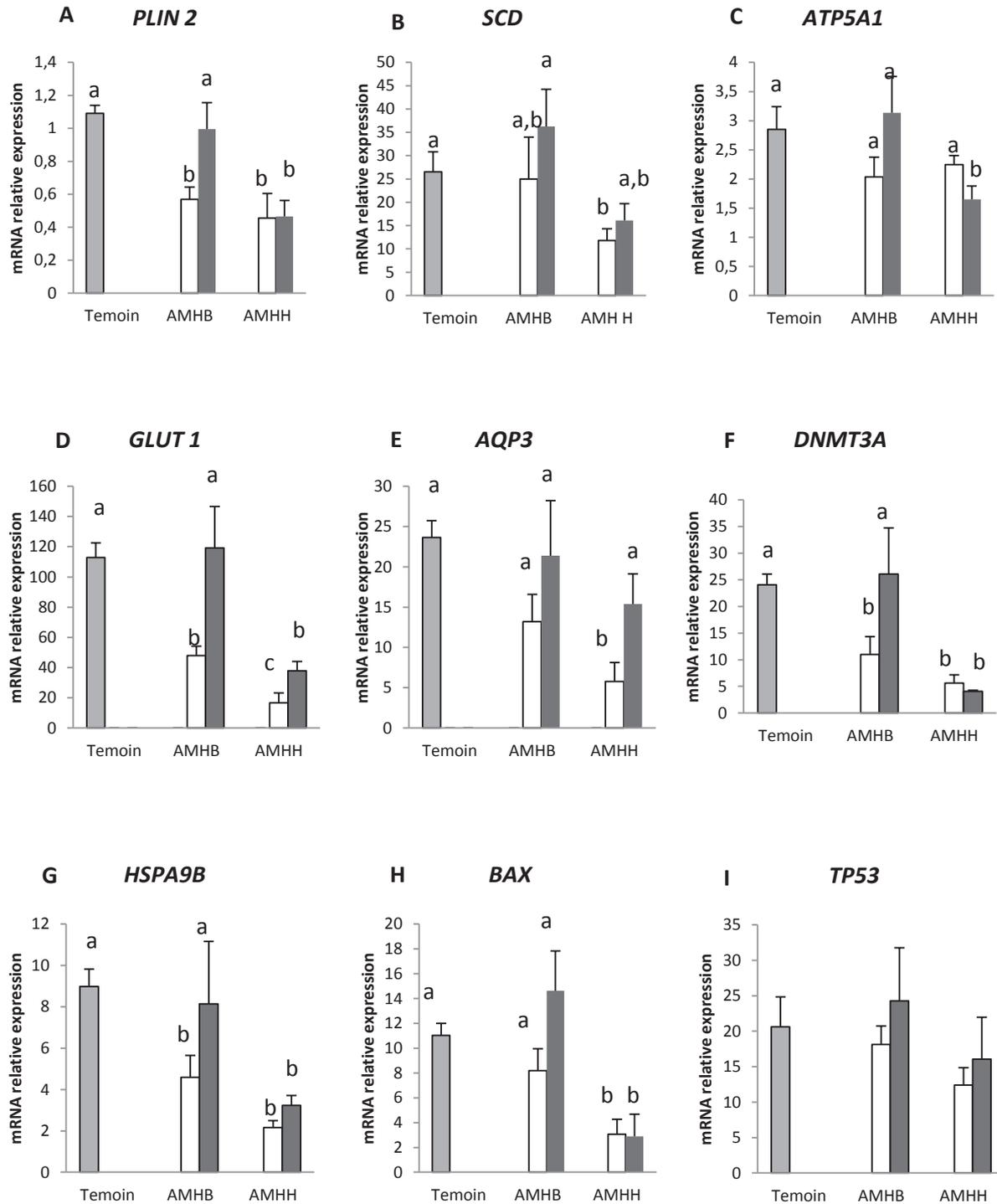


Figure 38. Expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme et du stockage lipidique (A et B), le métabolisme énergétique (C et D), la perméabilité des membranes (E), les marqueurs épigénétiques (F), la transformation de protéines (G), l'apoptose (H et I) chez des blastocystes expansés de qualité 1 produits à partir de génisses laitières en fonction du régime alimentaire et du profil d'AMH. AMH H (n=9) vs. AMH B (n=7), restriction alimentaire (R) : R-Contrôle □; R-PG ■ vs. Témoin ■; groupe Témoin : alimentation non restreinte (n=6). (moyenne ± SEM) a,b,c (P < 0,05).

## Discussion et conclusion

Les résultats du liquide folliculaire et l'expression des gènes du système IGF dans les COCs, ont mis en évidence une modification de l'environnement folliculaire, passant par l'augmentation de concentrations d'IGF1 induite par l'administration du PG dans les deux groupes de génisses. Cependant, dans les analyses de l'expression du système IGF réalisé dans les cellules du cumulus et les ovocytes, le PG a agi différemment selon les profils des animaux, avec une augmentation des niveaux d'IGF1 et d'IGF1R dans les cellules du cumulus chez les génisses présentant un profil AMH H, alors que seule l'expression d'IGF1R a été modifiée dans les ovocytes issus des génisses du groupe AMH B. De la même manière, les effets de l'addition de PG ont été différents selon le profil d'AMH pour l'expression des gènes candidats dans les blastocystes de qualité 1. L'administration de PG a restauré l'expression de gènes d'importance pour la qualité des embryons et qui ont été affectés par la restriction alimentaire, comme par exemple *GLUT 1*, gène transporteur de glucose chez les génisses présentant un profil AMH B. Le PG a augmenté aussi les niveaux d'expression de *GLUT 1* chez les génisses AMH H mais à un niveau inférieur à celui observé chez les génisses de profil AMH B. Des auteurs ont montré qu'un faible nombre de transporteurs a été associé à un faible taux de blastocystes (Oropeza et al., 2004) et il a été postulé que ce faible nombre affectait la compaction et la blastulation (Thompson 2000). De même, l'expression du gène *AQP3*, gène qui facilite la circulation de l'eau, important pour la congélabilité des embryons a augmenté dans le groupe AMH H. De plus, il est intéressant de noter que la restriction alimentaire a diminué l'expression du gène *BAX* (protéine pro-apoptotique) seulement dans le groupe AMH H, et que l'administration de PG a maintenu ces profils d'expression à un niveau faible. Le PG a également maintenu l'expression de *PLIN 2* à un niveau faible, ce gène étant impliqué dans le stockage des lipides.

En conclusion, ce travail montre qu'une alimentation restreinte associée à une supplémentation de PG chez des génisses laitières a modifié le profil d'expression de gènes du système IGF dans les ovocytes et les cellules cumulus et celui des blastocystes produits *in vitro*, de qualité 1. La supplémentation de courte durée de PG a restauré l'expression de plusieurs gènes de survie embryonnaire dans les blastocystes, même si des différences ont été mises en évidence pour les génisses des groupes AMH B et AMH H. Ces résultats suggèrent l'existence d'une régulation épigénétique induite par PG pendant la croissance folliculaire, qui peut réguler le niveau d'expression des gènes jusqu'au stade blastocyste.

**Chapitre 7. Discussion générale**

Dans le cadre de cette thèse, les effets d'une supplémentation de PG et des variations métaboliques associées sur la production d'embryons in vitro ont été investigués chez des donneuses superovulées de race Prim'Holstein présentant des profils/niveaux d'AMH contrastés.

À cette fin, nous avons dans un premier temps précisé les relations dose – effets du propylène glycol en poudre chez les génisses laitières afin d'optimiser la quantité et les modalités de distribution du propylène glycol, en suivant les concentrations plasmatiques des principaux métabolites et hormones impliqués dans le métabolisme énergétique et la croissance folliculaire (étude expérimentale 1). A partir des résultats de cette étude, nous avons choisi d'utiliser le PG sous une forme plus rapidement ingérée (forme liquide), en travaillant chez des génisses soumises à une alimentation restreinte et présentant des profils d'AMH contrastés. Ce modèle expérimental discriminant a permis d'investiguer les effets du PG sur les métabolites et hormones métaboliques sériques, la croissance folliculaire, la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire, la quantité et la qualité des ovocytes et des embryons produits in vitro (morphologie et cinétique ; étude expérimentale 2). Enfin, nous avons précisé chez les génisses soumises à une alimentation restreinte les modifications induites au niveau ovarien par la supplémentation avec PG, en analysant les hormones métaboliques intra-folliculaires, les profils d'expression des gènes du système IGF dans les ovocytes et les cellules du cumulus ainsi que le profil d'expression de gènes candidats impactant le développement de l'embryon in vitro (étude expérimentale 3).

Les résultats obtenus sont synthétisés dans les tableaux 16 et 17

Tableau 16. Synthèse des résultats expérimentaux, suite à une administration de PG en poudre ou sous forme liquide.

| Groupes  | Génisses alimentation normale (GMQ: 900 g/j) (expérimentation1)      |   | Génisses alimentation restreinte (GMQ : 600 g/j) (expérimentations 2 et 3)   |  |
|--|--|---|--|--|
|  | PG150 (150 g PG)   | PG300 (300 g PG)                              | PG (400 mL)  |  |
|  | PG150 vs. Contrôle   | PG300 vs. Contrôle                            | AMH B  | AMH H  |
|  |  |   | R PG vs. R Contrôle  | R PG vs. R Contrôle  |
| <b>Métabolites (concentrations plasmatiques)</b>                           | ↑ Glucose<br>↓ BHB<br>→ Urée   | ↑ Glucose<br>↓ BHB<br>→ Urée                  | ↑ Glucose<br>↓ BHB<br>↓ Urée   | ↑ Glucose<br>↓ BHB<br>↓ Urée   |
| <b>Hormones métaboliques (concentrations plasmatiques)</b>                 | → Insuline<br>↑ IGF1 (jour 6 du cycle œstral)                        | → Insuline<br>→ IGF1                          | ↑ Insuline<br>↑ IGF1 (jours 5 and 7 du cycle œstral)   | ↑ Insuline<br>↑ IGF1 (jours 2, 5 and 7 du cycle œstral)  |
| <b>Hormones métaboliques (concentrations dans le liquide folliculaire)</b> | Non exploré  | Non exploré                                   | → Insuline<br>↑ IGF1   | → Insuline<br>↑ IGF1   |
| <b>Hormones reproductives</b>  | ↑ Progestérone (jours 9 et 12 du cycle œstral)<br>→ Estradiol, → AMH | → Progestérone<br>→ Estradiol<br>→ AMH        | ↓ Progestérone (jours 5 et 9 du cycle œstral)<br>Estradiol Non exploré   | ↓ Progestérone (jours 5 et 9 du cycle œstral)<br>Estradiol Non exploré   |
| <b>Follicules</b>  | ↑ follicules 2-3 mm le jour 2 du cycle œstral                        | ↑ follicules 2-3 mm le jour 2 du cycle œstral | ↑ follicules 2-3 mm le jour 2 du cycle œstral (avant stimulation de la croissance folliculaire)<br>→ Follicules 4-7 mm le jour 5 du cycle œstral (après stimulation de la croissance folliculaire)   | ↑ follicules 2-3 mm le jour 2 du cycle œstral (avant stimulation de la croissance folliculaire)<br>↑ follicules 4-7 mm le jour 5 du cycle œstral (après stimulation de la croissance folliculaire)   |
| <b>Production d'ovocytes</b>   | Non exploré  | Non exploré                                   | → Quantité des ovocytes<br>↑ Ovocytes qualité 1  | → Quantité des ovocytes<br>↑ Ovocytes qualité 1  |
| <b>Production d'embryons</b>   | Non exploré  | Non exploré                                   | → Nombre Total d'embryons (3,6 vs. 3,2)<br>→ Nombre Total d'embryons qualité 1 (3,2 vs. 1,9)<br>↑ Taux de blastocystes total (50% vs. 37,8%)<br>↑ Taux de blastocystes qualité 1 (45% vs. 22,7%)   | ↑ Nombre Total d'embryons (10,4 vs. 7,3)<br>↑ Nombre d'embryons qualité 1 (8,9 vs. 5,2)<br>↑ Taux de blastocystes total (48,3% vs. 36,4%)<br>↑ Taux de blastocystes qualité 1 (41,1% vs. 26,1%)  |
| <b>Gènes du système IGF1</b>   | Non exploré  | Non exploré                                   | <b>Cellules du cumulus :</b><br>→ <i>IGF1</i> , → <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i> , → <i>IGFBP4</i><br><b>Ovocyte :</b><br>↑ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i>   | <b>Cellules du cumulus :</b><br>↑ <i>IGF1</i> , ↑ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i> , ↑ <i>IGFBP4</i><br><b>Ovocyte:</b><br>→ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i>  |
| <b>Gènes candidats impactant le développement des embryons</b>             | Non exploré  | Non exploré                                   | <b>Métabolisme lipidique et stockage :</b> ↑ <i>PLIN2</i> , → <i>SCD</i><br><b>Métabolisme énergétique :</b> → <i>ATP5A1</i> , ↑ <i>GLUT1</i> ,<br><b>Perméabilité des membranes :</b> → <i>AQP3</i> ,<br><b>Marques épigénétiques :</b> → <i>DNMT3A</i><br><b>Apoptose :</b> → <i>BAX</i> , → <i>TP53</i> , <b>Stress :</b> ↑ <i>HSPA9B</i> | <b>Métabolisme lipidique et stockage :</b> → <i>PLIN2</i> , → <i>SCD</i><br><b>Métabolisme énergétique :</b> ↓ <i>ATP5A1</i> , ↑ <i>GLUT1</i> ,<br><b>Perméabilité des membranes :</b> ↑ <i>AQP3</i> ,<br><b>Marques épigénétiques :</b> → <i>DNMT3A</i><br><b>Apoptose :</b> → <i>BAX</i> , → <i>TP53</i> , <b>Stress :</b> → <i>HSPA9B</i> |

↑ : augmentation, ↓ : diminution, → : Pas de différence

**Tableau 17. Synthèse des résultats de l'expérimentation 3 (comparaison entre le groupe Témoin (GMQ 900 g/j) et les groupes recevant une alimentation restreinte (R Contrôle) ou une alimentation restreinte combinée à une supplémentation en PG (R PG).**

| Groupes  | AMHB R contrôle (600 g/j) vs.Témoin (900 g/j)  | AMHH R contrôle (600 g/j) vs. Témoin (900 g/j)  | AMHB R PG (600 g/j) vs.Témoin (900 g/j)   | AMHH R PG (600 g/j) vs. Témoin (900 g/j)  |
|--|--|---|---|---|
| <b>Hormones métaboliques (concentrations dans le liquide folliculaire)</b> | → Insuline<br>↓ IGF1   | → Insuline<br>↓ IGF1  | → Insuline<br>→ IGF1  | → Insuline<br>→ IGF1  |
| <b>Gènes système IGF1</b>  | Cellules du cumulus :<br>↓ <i>IGF1</i> , → <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i> , ↓ <i>IGFBP4</i><br><br>Ovocyte :<br>↓ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i>   | Cellules du cumulus :<br>↓ <i>IGF1</i> , ↓ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i> , ↓ <i>IGFBP4</i><br><br>Ovocyte :<br>→ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i>  | Cellules du cumulus :<br>↓ <i>IGF1</i> , → <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i> , ↓ <i>IGFBP4</i><br><br>Ovocyte :<br>→ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i>  | Cellules du cumulus :<br>→ <i>IGF1</i> , → <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i> , → <i>IGFBP4</i><br><br>Ovocyte :<br>↓ <i>IGF1R</i> , → <i>IGFBP2</i>  |
| <b>Gènes candidats impactant la viabilité des embryons</b>                 | <b>Métabolisme lipidique et stockage :</b><br>↓ <i>PLIN2</i> , → <i>SCD</i><br><b>Métabolisme énergétique :</b><br>→ <i>ATP5A1</i> , ↓ <i>GLUT1</i> ,<br><b>Perméabilité des membranes :</b><br>→ <i>AQP3</i> ,<br><b>Marques épigénétiques :</b> ↓ <i>DNMT3A</i><br><b>Apoptose :</b> → <i>BAX</i> , → <i>TP53</i> ,<br><b>Stress :</b> ↓ <i>HSPA9B</i> | <b>Métabolisme lipidique et stockage :</b><br>↓ <i>PLIN2</i> , ↓ <i>SCD</i><br><b>Métabolisme énergétique :</b><br>→ <i>ATP5A1</i> , ↓ <i>GLUT1</i> ,<br><b>Perméabilité des membranes :</b><br>↓ <i>AQP3</i> ,<br><b>Marques épigénétiques :</b><br>↓ <i>DNMT3A</i><br><b>Apoptose :</b> ↓ <i>BAX</i> , → <i>TP53</i> ,<br><b>Stress :</b> ↓ <i>HSPA9B</i> | <b>Métabolisme lipidique et stockage :</b><br>→ <i>PLIN2</i> , → <i>SCD</i><br><b>Métabolisme énergétique :</b><br>→ <i>ATP5A1</i> , → <i>GLUT1</i> ,<br><b>Perméabilité des membranes :</b><br>→ <i>AQP3</i> ,<br><b>Marques épigénétiques :</b><br>→ <i>DNMT3A</i><br><b>Apoptose :</b> → <i>BAX</i> , → <i>TP53</i> ,<br><b>Stress :</b> → <i>HSPA9B</i> | <b>Métabolisme lipidique et stockage :</b><br>↓ <i>PLIN2</i> , → <i>SCD</i><br><b>Métabolisme énergétique :</b> ↓ <i>ATP5A1</i> ,<br>↓ <i>GLUT1</i> ,<br><b>Perméabilité des membranes :</b> → <i>AQP3</i> ,<br><b>Marques épigénétiques :</b> ↓ <i>DNMT3A</i><br><b>Apoptose :</b> ↓ <i>BAX</i> , → <i>TP53</i> ,<br><b>Stress :</b> ↓ <i>HSPA9B</i> |

↑ : augmentation, ↓ : diminution, → : Pas de différence

## **1. Maximiser les effets du PG sur les concentrations plasmatiques de métabolites, des hormones métaboliques et reproductives.**

Dans l'expérimentation 1, les travaux réalisés chez les génisses avec une alimentation classique (GMQ : 900 g/j) ont mis en évidence un effet modéré du PG administré en poudre, avec des concentrations élevées de glucose et des concentrations faibles de BHB conformes à d'autres études (Studer et al., 1993 ; Butler et al., 2005 ; Rizos et al., 2008 ; Chung et al., 2009). Cependant, aucun effet n'a été observé sur les concentrations d'insuline. Ces résultats sont contraires à ceux rapportés dans différents études qui obtiennent une augmentation des concentrations plasmatiques d'insuline avec une supplémentation de PG (Studer et al., 1993 ; Grummer et al., 1994 ; Christensen et al., 1997 ; Miyoshi, et al., 2001 ; Hidalgo et al., 2004 ; Butler et al., 2006 ; Rizos, et al., 2008 ; Chung et al., 2009). Ces résultats discordants peuvent être en partie expliqués par le mode d'administration (en poudre) avec un problème d'appétence, d'où découlent des variations de rapidité d'ingestion et des intervalles différents entre l'ingestion de PG et la collecte du sang.

Le choix initial d'une supplémentation de PG sous forme de poudre avait été principalement motivé par l'aspect facile et pratique de ce mode d'administration et son utilisation éventuelle en élevage. Néanmoins, il a été observé au cours de notre expérience que le temps d'ingestion était variable entre animaux, malgré la quantité relativement limitée de PG à ingérer. De plus, l'administration orale du PG sous forme liquide a un effet plus prononcé sur l'insuline qu'une administration faisant partie de la ration complète (Cozzi et al., 1996 ; Chung et al., 2009) ou un mélange de PG avec le concentré (Shinfield et al., 2002). Les effets moins marqués du PG avec la ration complète peuvent être en partie expliqués par une prise de PG sur une longue période de temps alors que l'administration orale est immédiate (Nielsen et Ingvarsten, 2004). La prise rapide de PG par les animaux serait donc très importante pour maximiser la réponse de l'insuline au PG. Une prise lente pourrait occasionner en partie une fermentation du PG dans le rumen. Le PG est alors moins disponible pour être absorbé et métabolisé dans le foie. Par conséquent, sa transformation en glucose est limitée et il en résulte une augmentation plus faible de l'insuline. Cependant, les concentrations élevées de glucose dans notre étude indiquent que l'administration du PG a bien eu des effets glucogéniques bien que des pics d'insuline n'aient pas été détectés. Dans notre expérimentation, nous avons réalisé les dosages toutes les 2 heures et la possibilité d'avoir manqué le pic d'insuline n'est pas à exclure. Cela pourrait expliquer en partie les effets mineurs observés après l'ingestion de PG en poudre sur l'insuline dans notre

expérience. De longs intervalles de temps entre l'administration de PG et la collecte de sang ont également occasionné des effets mineurs du PG sur les niveaux d'insuline dans différentes études (Cozzi et al., 1996 ; Shinfield et al., 2002). De plus, plusieurs auteurs ont rapporté que le pic de glucose est maintenu après celui de l'insuline et se maintient plus longtemps que celui observé pour l'insuline (Studer et al., 1993 ; Grummer et al., 1994 ; Cozzi et al., 1996).

Le PG administré en poudre a diminué les concentrations de BHB à plusieurs reprises au cours des cinétiques, comme rapporté par d'autres études (Grummer et al., 1994 ; Rizos et al., 2008). Cependant, ces variations n'ont pas été très fortes. La faible réponse du BHB après l'ingestion de PG peut être expliquée par l'état métabolique des animaux. Dans notre expérience comme dans celle réalisée par Christensen et al. (1997), nous avons utilisé des génisses alimentées selon leurs besoins avec une balance énergétique positive et apparemment avec des niveaux bas d'AGNE. L'ingestion de PG a occasionné une réduction importante des concentrations plasmatiques de BHB chez des animaux ayant des concentrations élevées d'AGNE associées à une balance énergétique négative (Nielsen et Ingvarsten, 2004) ou chez des génisses recevant une alimentation restreinte (Grummer et al., 1994).

En relation avec les doses de PG administrées dans notre étude, le traitement avec PG300 (soit 600 g de PG, 50% de pureté) a semblé être plus efficace pour augmenter les niveaux de glucose et diminuer les niveaux de BHB en comparaison au traitement PG150 (300 g de PG ; 50% de pureté).

Au vue de ces résultats, la suite de nos travaux a été réalisée avec du PG sous forme liquide et distribué par voie orale (400 mL). Dans l'expérimentation 2, le modèle animal a en outre inclus des génisses avec une alimentation restreinte, afin d'avoir un effet plus net dans la réponse du PG aux métabolites et hormones métaboliques. Il est important de noter que les génisses n'ont pas été sous-alimentées de façon drastique, mais seulement restreintes de façon modérée : le GMQ était diminué mais les besoins d'entretien et de croissance étaient couverts à 100 % avec ce GMQ imposé de 600 g/j. Ce modèle peut refléter la restriction alimentaire observée dans certains élevages, en particulier lorsque les génisses sont nourries au foin, sans supplémentation particulière.

Les résultats de l'expérimentation 2 ont été conformes à ceux observés dans d'autres études (Grummer et al., 1994 ; Christensen et al., 1997 ; Miyoshi et al., 2001). Le PG oral a bien augmenté les concentrations d'insuline, de glucose et a diminué les concentrations de

BHB et d'urée pour toutes les génisses. De plus, les concentrations d'IGF1 ont été augmentées avec le PG les jours 5 et 7 du cycle œstral chez les génisses présentant un profil AMH B et les jours 2, 5 et 7 chez les génisses présentant un profil AMH H. Dans l'expérimentation 1, une augmentation des concentrations d'IGF1 a été observée pour le groupe PG150 le jour 6 du cycle œstral. De la même façon, une augmentation des concentrations d'IGF1 a été trouvée après supplémentation de PG dans d'autres études le jour 0 du cycle œstral (Hidalgo et al., 2004) ou avec une augmentation d'apports énergétiques (Burgwald-Balstad et al., 1995 ; Yelich et al., 1996 ; Lalman et al., 2000 ; Armstrong et al., 2001).

En relation avec les hormones de la reproduction, une augmentation des concentrations de progestérone a été observée chez les génisses ayant reçu le PG en poudre les jours 9 et 12 du cycle œstral (exp. 1) ce qui est conforme aux travaux d'Hidalgo et al. (2004) ayant rapporté une augmentation des concentrations d'IGF1, de P4 et une amélioration de la qualité des corps jaunes après administration de PG chez des génisses receveuses. Des études ont montré que l'insuline module les concentrations plasmatiques de P4 chez les femelles bovines. Plus spécifiquement, l'insuline stimule la stéroïdogénèse ovarienne (Spicer et Echterkamp, 1995) et aussi réduit l'expression hépatique d'enzymes associées au catabolisme de la P4 comme CYP2C et CYP3A (Murray, 1991 ; Butler et al., 2003 ; Lemley et al., 2008). Cependant, cette constatation n'a pas été reproduite lors de l'expérimentation 2 : les concentrations plasmatiques de P4 mesurées les jours 5 et 9 du cycle ont été plus faibles après l'administration de PG liquide. Des études ont souligné cette divergence en mettant en avant une augmentation du flux sanguin hépatique provoqué par le PG (Kristensen et Raun, 2007 ; Leiva et al., 2013) avec comme conséquence un catabolisme hépatique de P4 plus prononcé (Sangsrivong et al., 2002). Pour conforter cette hypothèse, Moriel et al. (2008) ont suggéré que l'augmentation du flux hépatique remplace tout effet inhibiteur potentiel de l'insuline sur le catabolisme hépatique de P4.

Des études *in vitro* ont aussi montré que l'insuline utilisée à des concentrations physiologiques augmente la production d'œstradiol dans les cellules de la granulosa (Willis et al., 1996). Cependant, l'augmentation des apports alimentaires peut diminuer les concentrations plasmatiques d'œstradiol par une augmentation de la clearance hépatique (Sangsrivong et al., 2002). Dans l'expérimentation 1, aucune différence n'a été montrée entre les groupes recevant le PG en poudre et témoin. De la même façon, Butler et al. (2006) n'ont pas observé de différence pour les concentrations d'œstradiol après administration de

PG chez des vaches au cours du post-partum. Pour des raisons budgétaires, les analyses d'œstradiol de l'expérimentation 2 n'ont pu être réalisées.

**En conclusion, ces travaux ont mis en évidence des effets plus marqués après une administration du PG sous forme orale. Les doses adaptées pour les génisses sont de 300 g pour la poudre et 400 mL pour la forme liquide. Les effets métaboliques ont été observés dès le 5<sup>ème</sup> jour de supplémentation (concentrations d'IGF1), ce qui permet de proposer un plan de supplémentation de courte durée chez des donneuses d'ovocytes, de 5 à 6 jours précédant l'OPU à partir de l'émergence de la vague folliculaire précédant l'OPU, par exemple 2 jours avant le traitement de stimulation de la croissance folliculaire par l'hormone FSH, au moment de la ponction du follicule dominant.**

## **2. Effets du PG sur la croissance folliculaire, la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire, la qualité des ovocytes et la production d'embryons.**

Un effet favorable du PG sur la croissance folliculaire a été observé avec une augmentation du recrutement de petits follicules (2-3 mm), pendant la première vague folliculaire, tant avec le PG administré en liquide comme sous forme de poudre. De façon intéressante, une corrélation positive des niveaux d'insuline avec le nombre de petits follicules de 2-3 mm ( $r = 0,45$ ,  $P = 0,0094$ ) et le nombre de follicules de 2-8mm ( $r = 0,40$ ,  $P = 0,0247$ ) a été observée le jour 2 du cycle œstral pour tous les groupes de génisses. Dans l'expérimentation 2, ceci a permis d'augmenter la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire par l'hormone FSH chez les génisses présentant un profil AMH H.

Plusieurs études in vitro ont mis en évidence que l'insuline et l'IGF1 sont d'importants médiateurs du développement folliculaire, de la prolifération et synthèses de stéroïdes des cellules de la granulosa des petits follicules (Gong et al., 1993 ; Spicer et al., 1994 ; Totey et al., 1996 ; Butler et Le Roith, 2001). De plus, Bossaert et al. (2010) ont montré l'importance de l'insuline dans la croissance folliculaire précoce : aucun récepteur d'insuline (IR) n'a été trouvé dans les follicules préantraux, alors qu'une forte présence d'IR a été observée dans les cellules de la granulosa des petits follicules antraux (< 5mm) et une moindre présence dans les follicules de plus grande taille (> 5mm). Ceci pourrait expliquer que l'augmentation des niveaux d'insuline par les apports alimentaires est associée à l'augmentation du nombre de petits follicules (< 4mm), sans effet sur les nombres de follicules moyens (4-8 mm) ou grands (> 8mm) comme obtenu dans le présent travail (Gutierrez et al., 1997 ; Freret et al., 2006 ; Bossaert et al., 2010).

De la même manière, d'autres auteurs ont rapporté une augmentation de la croissance folliculaire et du recrutement de petits follicules avec une augmentation des apports alimentaires, et de façon concomitante une augmentation des niveaux d'insuline et IGF1 qui interagissent en synergie avec les gonadotropines (Armstrong et al., 2001 ; Gong et al., 2002 ; Martins et al., 2006 ; Garnsworthy et al., 2008). Ces effets combinés résultent en un nombre supérieur de follicules ovulés ou de follicules aspirés après un traitement de stimulation de la croissance folliculaire (Gong et al., 2002 ; Martins et al., 2006). En outre, les mécanismes impliquent la sensibilité à l'IGF1 des petits follicules à la stimulation des gonadotropines : d'après Mazerbourg et al. (2003), l'IGF1 stimule la transition du stade de follicules sensibles aux gonadotropines au stade follicules dépendants des gonadotropines (Mazerbourg et al., 2003), ce qui a été le cas dans notre groupe AMH H puisque l'effet du PG a été maintenu pour les follicules moyens.

Cependant, d'autres travaux n'ont pas permis d'augmenter leur recrutement lors du traitement de stimulation de la croissance folliculaire, et ce, malgré l'augmentation des niveaux d'insuline et l'augmentation de la quantité des petits follicules (Freret et al., 2006). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans notre travail chez les génisses du groupe AMH B. Malgré les niveaux élevés d'IGF1 dosés chez les animaux AMH B avec le PG, la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire n'a pas été augmentée de façon significative. Ce résultat pourrait être expliqué par une moindre variabilité des nombres de follicules susceptibles d'être recrutés (et donc des différences plus difficiles à mettre en évidence avec les méthodes statistiques) ou pourrait résulter d'une qualité folliculaire différente chez ces animaux présentant un profil hormonal particulier (AMH B). En effet, des études réalisées chez la femme et la vache, préalablement caractérisées par un nombre faible de petits follicules antraux (et donc des niveaux peu élevés d'AMH) ont mis en évidence une moindre réponse à la stimulation des gonadotropines aux cours de cycles de FIV ou superovulation en comparaison à celles ayant un nombre élevé de petits follicules antraux (Barreto Melo et al., 2009; Hsu et al., 2011 ; Ireland et al., 2007). Scheets et al. (2012) ont rapporté que les cellules de la granulosa de ces types d'animaux et femmes ont une capacité diminuée à répondre à la FSH, qui pourrait contribuer ou provoquer une diminution de la fonction ovarienne, de la réponse à la stimulation des gonadotropines et de la fertilité. De plus, comme rapporté par Jimenes-Krassel et al. (2009), nous avons observé des concentrations plasmatiques de progestérone inférieures chez les génisses du groupe non supplémenté présentant un niveau AMH B, par rapport à celles présentant un profil AMH H.

Aucun effet du PG n'a été observé sur la quantité d'ovocytes collectés par OPU, cependant la qualité des ovocytes et leur compétence au développement ont été améliorées. Le PG a augmenté le nombre d'ovocytes de qualité 1 pour le groupe AMH H de façon significative et le pourcentage d'ovocytes de qualité 1 pour le groupe AMH B (tendance). Une corrélation positive significative a été estimée entre les niveaux d'AMH et le nombre d'ovocytes de qualité 1 après l'administration de PG ( $r = 0,80$ ,  $P = 0,002$ ). La qualité de l'ovocyte a un rôle très important dans la capacité de développement embryonnaire *in vivo* et *in vitro* (Greve et al., 1995 ; Sirard et Blondin., 1996 ; Sirard et al., 2006). En accord avec des recherches antérieures (Blondin et al., 1997 ; Humblot et al., 2005), il a été démontré que la compétence est acquise par les ovocytes alors qu'ils sont encore présents dans le follicule, et ce, certainement en lien avec le système de l'IGF (Armstrong et al., 2001). Sachant que les ovocytes ont été soumis à une supplémentation de PG pendant 5 jours avant l'OPU et collectés au stade immature au 5<sup>ème</sup> jour du cycle, il est intéressant de noter que les effets positifs sur la compétence ovocytaire ont été acquis pendant cette courte période de supplémentation, au cours de la croissance folliculaire terminale.

Après fécondation *in vitro*, la vitesse de développement, et plus spécifiquement le délai d'apparition de la première division (segmentation) et/ou celui de l'apparition du stade blastocyste est en relation avec la compétence au développement des embryons (Lonergan et al., 1999 ; Matoba et al., 2014). Notre travail a confirmé l'augmentation de la compétence ovocytaire et embryonnaire avec l'administration de PG, après analyse de la cinétique des embryons jusqu'au stade 8 cellules. Le PG a accru la vitesse de multiplication cellulaire, 48 heures après l'insémination dans les deux groupes d'AMH avec une proportion plus importante d'embryons à 8 cellules par rapport aux stades 2 et 4 cellules (Groupe AMH B : 16,4% vs. 43,8% et Groupe AMH H : 27,1% vs. 52,5%).

Bien que le PG ait augmenté les taux de blastocystes totaux et de blastocystes de qualité 1 (par rapport aux ovocytes inséminés) dans tous les groupes de génisses, le PG a augmenté les nombres totaux de blastocystes et de blastocystes de qualité 1 développés le 7<sup>ème</sup> jour de culture, seulement pour les génisses du groupe AMH H. Une augmentation non significative du nombre de blastocystes de qualité 1 a été observée dans le groupe de génisses présentant un profil AMH B. A nouveau, cette différence liée au statut AMH peut être expliquée par une moindre variabilité dans ce groupe de génisses (du fait des faibles nombres de follicules susceptibles d'être recrutés) ou à l'incapacité de PG à augmenter la quantité des

ovocytes compétents. Des concentrations basses d'AMH ne sont pas seulement un indicateur d'une faible réserve ovarienne mais aussi d'une efficacité reproductive réduite (Ireland et al., 2010 ; Evans et al., 2012 ; Mossa et al., 2012). Chez des animaux avec une faible réserve folliculaire, des quantités plus élevées de marqueurs associés à une moindre qualité ovocytaire comme par exemple les cathepsines, ont été décrites dans les cellules du cumulus (Ireland et al., 2009). Cependant la relation entre AMH et qualité des ovocytes reste controversée. Dans notre expérimentation 2, nous n'avons pas trouvé de différence entre les taux de blastocystes totaux et ceux de qualité 1 selon les profils d'AMH. De plus, aucune corrélation significative n'a été observée entre les niveaux d'AMH et les taux de blastocystes totaux ( $r = -0,02$ ,  $P = 0,9175$ ) et de blastocystes de qualité 1 ( $r = -0,04$ ,  $P = 0,8102$ ). De même, des études récentes n'ont pas trouvé de corrélation significative entre la compétence ovocytaire (évaluée par le taux de blastocystes produits in vitro) le niveau d'AMH chez des femelles *Bos taurus* et *Bos indicus* (Guerreiro et al., 2014 ; Silva-Santos et al., 2014). Des études complémentaires seraient nécessaires pour clarifier ces divergences et mieux comprendre les mécanismes expliquant les effets de l'AMH sur l'efficacité reproductive.

**En conclusion, nos travaux ont confirmé la possibilité d'administrer le PG chez des génisses restreintes afin de stimuler la croissance des petits follicules, dès 2 jours après le début de la supplémentation. Nous avons mis en évidence des effets originaux sur la qualité des ovocytes collectés par OPU et leur compétence de développement, en particulier chez les génisses présentant un profil AMH H, ainsi que sur la qualité et la cinétique de développement des embryons produits in vitro à partir de ces ovocytes. En cohérence avec les effets métaboliques observés après supplémentation, ces résultats permettent de conforter un plan de supplémentation de courte durée chez des donneuses d'ovocytes, de 5 à 6 jours précédant l'OPU, à compter de l'émergence de la vague folliculaire précédant l'OPU, par exemple 2 jours avant le traitement de la stimulation de la croissance folliculaire par l'hormone FSH, au moment de la ponction du follicule dominant, qui induit l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire. En outre, ces résultats sur la qualité ovocytaire nous ont conduits à concevoir une investigation plus précise des effets au niveau ovarien (études d'expression des gènes) de la supplémentation orale de PG.**

### **3. Influence de l'administration orale de PG sur les concentrations intra-folliculaires des hormones métaboliques, sur les profils d'expression des gènes du système IGF1 dans les COCs et des gènes candidats associés à la qualité embryonnaire.**

Les résultats des expériences 1 et 2 nous ont amenés à formuler l'hypothèse selon laquelle les modifications plasmatiques de l'insuline et de l'IGF1 induites par PG étaient reflétées au niveau du liquide folliculaire et impactaient les profils d'expression des gènes du système IGF1 dans les COCs et ceux de gènes candidats de qualité embryonnaire (expérimentation 3). Ces différents paramètres ont été étudiés en fonction du type de profil AMH des donneuses (AMH B ou AMH H) et comparés à un lot de génisses ayant eu une croissance de 900 g/j (lot Témoin) pour étudier les mêmes paramètres.

Cette étude est en cours d'analyse mais la discussion des premiers résultats est présentée ci-dessous.

#### **3.1 Liquide Folliculaire.**

Le liquide folliculaire compose le micro-environnement de l'ovocyte. De ce fait, il est au moins partiellement responsable de la qualité et du développement ultérieur de l'embryon (McNatty, 1978). Effectivement, des études suggèrent que la compétence des ovocytes est acquise au cours du processus de la folliculogénèse (Blondin et al., 1997 ; Mermillod et al., 1999 ; Sutton et al., 2003). Le liquide folliculaire procure à l'ovocyte une protection contre la protéolyse et l'extrusion pendant l'ovulation (Espey et Lipner, 1994) et agit comme un tampon de l'environnement intrafolliculaire contre l'influence des conditions externes présentées par le flux sanguin (Gosden et al., 1988). Le liquide folliculaire contient à la fois des constituants du plasma sanguin qui traversent la barrière folliculaire et des produits issus de l'activité sécrétoire des cellules de la granulosa et de la thèque (Gosden et al., 1988 ; Fortune, 1994). La composition du liquide folliculaire varie au cours du cycle et selon la taille des follicules (Leroy et al., 2004b ; Orsi et al., 2005). La variation des apports alimentaires peut aussi faire varier les concentrations intra-folliculaires de différentes hormones et métabolites : hormones stéroïdes (Rhind et McNeilly, 1998 ; O'Callaghan et al., 2000 ; Armstrong et al., 2002c ; Comin et al., 2002), IGF1 (O'Callaghan et al., 2000) et IGFBP (Comin et al., 2002), glucose et insuline (Landau et al., 2000), AGNE (Comin et al., 2002 ; Jorritsma et al., 2003). Il a été montré chez les vaches en post-partum une étroite corrélation entre les niveaux plasmatiques et folliculaires pour certains métabolites (Leroy et al., 2004b ; Bender et al., 2010). Des changements métaboliques dans les concentrations sériques sont ainsi reflétés dans le liquide

folliculaire et peuvent donc affecter la qualité à la fois de l'ovocyte et des cellules de la granulosa (Walters et al., 2002 ; Jorritsma et al., 2003 ; Leroy et al., 2004a, 2004b, 2005b).

Dans notre étude, le PG a accru les concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire chez les groupes traités (pour les deux profils AMH B et AMH H) par rapport au groupe contrôle. De plus, une corrélation positive a été trouvée le 9<sup>ème</sup> jour du cycle entre les concentrations plasmatiques d'IGF1 et celles du liquide folliculaire ( $r = 0,81$ ,  $P < 0,0001$ ). Les niveaux d'IGF1 dans le sérum et le liquide folliculaire chez des vaches laitières sont positivement corrélés avec le statut énergétique et sont essentiels pour le développement folliculaire normal (Walters et al., 2002 ; Van der Hurk et Zhao, 2005).

Cependant, l'administration de PG n'a pas permis d'induire des différences significatives des concentrations d'insuline dans le liquide folliculaire. Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses peuvent être avancées : la première est l'intervalle entre l'administration de PG et le prélèvement du liquide folliculaire (entre 18 et 24 heures) qui n'a peut-être pas permis de détecter le pic d'insuline dans le liquide folliculaire. Landau et al. (2000) affirment que le moment de prise de l'échantillon du liquide folliculaire est crucial pour mettre en évidence des effets de l'alimentation sur la composition du liquide folliculaire. La seconde hypothèse concerne la taille du follicule où a été prélevé le liquide folliculaire. Bossaert et al. (2010) ont observé une plus forte présence de récepteurs à l'insuline dans les cellules de la granulosa des petits follicules antraux ( $< 5$  mm) chez la vache. De même, Ying et al. (2011) ont rencontré des niveaux d'insuline supérieurs seulement dans les petits follicules ( $< 2,5$  mm) chez des brebis recevant une ration de 1,56 kg brut/j par rapport à une ration de contrôle apportant 1,06 kg brut/j. Dans notre étude, les prélèvements ont été faits à partir de follicules  $\geq 8$  mm et il est possible que l'augmentation des concentrations d'insuline provoquées par PG soit supérieure dans les petits follicules ( $< 5$  mm). Cependant l'aspiration du liquide folliculaire des petits follicules est difficile à réaliser avec la technique d'OPU chez les bovins, ce qui représente une limite pour les explorations in vivo dans nos études.

### **3.2 Profils d'expression des gènes du système IGF1 dans les COCs.**

Le système d'IGF est impliqué dans le contrôle du développement folliculaire chez les mammifères. De nombreuses études font état de ses effets sur la prolifération des cellules folliculaires et sur la stéroïdogénèse (Lucy et al., 2000 ; Monget et al., 2002).

Au cours de la croissance folliculaire, l'IGF1 agit en synergie avec les gonadotrophines FSH et LH pour réguler la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque (Campbell et al., 1996, 1998 ; Gutierrez et al., 1997).

Des études antérieures sur les follicules ovariens chez les ovins (Munoz-Gutierrez et al., 2004) et des bovins (Llewellyn et al., 2007) ont rapporté que l'expression des composants du système IGF, soit deux ligands (*IGF1* et *IGF2*), leurs deux récepteurs (*IGF1R*, *IGF2R*) et au moins six protéines de liaison (IGFBPs) (Monget et al., 2002) sont nutritionnellement régulées. Des changements de l'expression de ces gènes au cours de modifications alimentaires ont été observés dans l'oviducte (Fenwick et al., 2008b), le foie (Fenwick et al., 2008a), l'utérus (Wathes et al., 2009) et l'ovaire (Armstrong et al., 2001 ; Llewellyn et al., 2007).

La bio-activité des IGF1 et IGF2 dans l'ovaire est modulée par des protéines de liaison (IGFBPs) et entre eux modulent la folliculogénèse (Monget et al., 1993, 1996, 2002 ; Monniaux et al., 1994 ; Spicer et al., 1995). Dans les ovaires des ovins et des bovins, l'IGFBP-2 et IGFBP-5 sont synthétisés localement dans la paroi du follicule par les cellules de la granulosa, et les IGFBP-4 et IGFBP-6 dans les cellules de la thèque (Armstrong et al., 1998). Les concentrations d'IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5 dans le liquide folliculaire diminuent au cours de la croissance folliculaire et du développement des follicules dominants chez la vache (Spicer et Echtenkamp, 1995 ; Stewart et al., 1996).

Dans notre étude, comme pour les résultats obtenus par Nuttinck et al. (2004), nous avons trouvé la présence d'ARNm des gènes *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP2* et *IGFBP4* dans les cellules du cumulus et *IGF1R* et *IGFBP2* dans les ovocytes. Il apparaît qu'*IGF1R* a une expression supérieure dans les ovocytes à celle des cellules du cumulus.

Dans les cellules du cumulus, l'expression des gènes *IGF1* et *IGFBP4* a été diminuée avec la restriction alimentaire dans les deux profils AMH de génisses. La restriction a aussi diminué l'expression d'*IGF1R* dans le groupe AMH H. Ces résultats différents de ceux trouvés chez les brebis où aucune différence n'a été trouvée dans l'expression d'*IGF1* et *IGF1R* dans les cellules de la granulosa avec une sous-alimentation (0,5 x besoin d'entretien) (Pisani et al., 2008). PG a restauré l'expression des gènes *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP4* seulement dans le groupe AMH H indiquant une réponse différente à la supplémentation en PG selon les caractéristiques folliculaires propres à chaque animal (niveau d'AMH).

Dans les ovocytes, la restriction alimentaire a diminué l'expression d'*IGF1R* dans le groupe AMH B et la supplémentation de PG les a restaurés aux mêmes niveaux que le groupe Témoin. La présence d'ARNm codant pour *IGF1R* dans les ovocytes et les variations de niveaux observées sont cohérentes avec le fait que l'*IGF1* peut réguler la maturation des ovocytes directement en se liant à son récepteur (Armstrong et al., 2001).

A la différence de l'étude d'Armstrong et al. (2001), dans laquelle l'expression d'*IGFBP2* dans les cellules de la granulosa et *IGFBP4* dans les cellules de la thèque de petits follicules (< 4 mm) ont été réduites chez les bovins soumis à un régime alimentaire de haute énergie, nous n'avons pas observé de modification significative des profils d'expression des gènes *IGFBP-2* et *IGFBP-4* dans les cellules du cumulus et dans les ovocytes suite à l'administration de PG, quel que soient les groupes. La réduction d'*IGFBP-2* et *IGFBP-4* permettrait d'augmenter la biodisponibilité de l'*IGF1* dans les petits follicules résultant d'une augmentation de leur réponse à la FSH, et par conséquent un taux de croissance accru de petits follicules (Armstrong et al., 2001). Cependant la différence de résultats obtenue dans notre étude peut être expliquée par la taille des follicules aspirés pour obtenir les COCs, (follicules aspirés  $\geq 8$  mm). En effet, dans l'étude citée par Armstrong et al. (2001), aucune différence n'a été observée dans les follicules de taille supérieure à 4 mm. La stimulation de la croissance folliculaire obtenue dans nos expérimentations 1 et 2 semble indiquer des effets de PG plutôt ciblés sur les petits follicules (< 4 mm) mais les mécanismes restent à confirmer.

D'autre part, bien que nous ayons trouvé des effets particulièrement marqués pour le groupe AMH H liés à l'administration de PG, il est possible que le schéma expérimental ait biaisé les résultats obtenus au 9<sup>ème</sup> jour du cycle : en effet, outre la moindre qualité morphologique des COCs collectés le 9<sup>ème</sup> jour du cycle, le taux de récupération des ovocytes par rapport au nombre de follicules comptabilisés avant prélèvement a été inférieur le jour 9. De plus, la présence de liquide hémorragique témoigne probablement des effets conjugués du traitement de la stimulation de la croissance folliculaire et de l'OPU réalisées 4 jours auparavant, limitant le temps de récupération des ovaires. Il est possible de répéter des OPU deux fois par semaine pour obtenir des ovocytes de qualité mais généralement, ces ponctions sont faites sans traitement de la stimulation de la croissance folliculaire préalable (De Roover et al., 2008).

**Enfin, les résultats de l'administration de PG suggèrent l'existence d'une régulation de la qualité ovocytaire induite par PG pendant la croissance folliculaire via des modifications du système IGF au niveau ovarien : augmentation des niveaux d'expression des gènes *IGF1* et *IGF1R* dans les cellules du cumulus et du gène *IGF1R* dans les ovocytes, associés à de hautes concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire. Ces modifications pourraient être à l'origine de l'augmentation de la croissance folliculaire, du taux plus élevé de blastocystes développés *in vitro* et du nombre supérieur de blastocystes de qualité 1. Ces constats ont été plus marqués pour le groupe AMH H. Cependant des travaux complémentaires seraient nécessaires pour déterminer les effets du PG spécifiquement sur les petits follicules et dans des conditions garantissant une absence d'interaction entre les opérations.**

### **3.3 Profils d'expression de gènes candidats de qualité embryonnaire.**

La classification morphologique est communément utilisée comme critère d'évaluation de la qualité embryonnaire. Néanmoins, cette évaluation reste subjective et des études récentes ont investigué les relations entre l'aspect morphologique des embryons et des techniques invasives impliquant des études d'expression génique (Lonergan et al., 2006). Ces techniques ont été utilisées pour mesurer les différences de qualité des embryons *in vivo* et *in vitro*, évalués aux mêmes stades, après classification morphologique, en estimant la survie après congélation des embryons, afin d'apprécier les effets de différents milieux de culture et techniques de culture (niveaux d'O<sub>2</sub>, densité d'embryons mis en culture, co-culture...), etc. (Rizos et al., 2002b, 2003 ; Corcoran et al., 2006 ; Oliviera et al., 2005 ; Lonergan et al., 2006; Correa et al., 2007).

Ces études ont montré d'importants changements dans le profil d'expression de gènes dans les ovocytes et embryons en réponse à des modifications de la nutrition chez les bovins (Wrenzycki et al., 2000), chez les ovins (Pisani et al., 2008), chez les souris (Wakefield et al., 2008), chez les porcins (Warzych et al., 2011). Par exemple, Wrenzycki et al. (2000) ont conclu que les différences observées dans l'expression d'un gène impliqué dans la protection contre le stress oxydatif (Cu/Zn-SOD) et des substrats métaboliques (pyruvate) chez des embryons produits *in vivo* pourraient être attribués à la composition et la quantité de la ration alimentaire distribuée aux génisses donneuses.

Concernant la qualité des embryons, la diminution ou l'augmentation de l'expression de ces gènes peuvent avoir un effet positif sur la qualité: par exemple une diminution du gène *PLIN2* impliqué dans le stockage des lipides nécessaire au développement embryonnaire (Sastre et al., 2014) est favorable à la survie embryonnaire. A l'inverse, une diminution de *GLUT1* (transporteur de glucose) affecte la qualité des embryons par la diminution du nombre de cellules et par conséquent augmente l'apoptose (Pantaleon et al., 2001). Dans notre étude, il est intéressant de noter que la restriction alimentaire a diminué l'expression des gènes *PLIN2*, *GLUT1*, *DNMT3A*, *HSPA9B* dans le groupe AMH B (sans supplémentation) alors que l'administration de PG a permis de restaurer l'expression de ces gènes au même niveau que ceux observés dans le groupe Témoin recevant une alimentation normale.

Une augmentation de l'expression du gène *AQP3*, facilitant la circulation de l'eau et impactant la congélabilité des embryons est un marqueur positif de la qualité des embryons (Huang et al., 2006). BAX est une protéine pro-apoptotique, son activation conduit à la rupture de la perméabilité de la membrane externe, au relargage du cytochrome C dans le cytoplasme et à l'activation de caspases responsables de la mort cellulaire (Boumela et al., 2009). *ATP5A1* gène contrôlant la synthèse d'ATP est impliqué dans la régulation de l'état énergétique de la cellule (Yotov et St-Arnaud, 1993). Une haute expression de ce gène contribue à un métabolisme plus intensif tandis que les mutations causent une mort embryonnaire (Pedersen, 1994). De même, une haute expression de ce gène ont été trouvée dans les biopsies de blastocystes bovins qui ne donnent pas lieu à une gestation (Deb et al., 2011). Chez les génisses présentant un profil AMH H, la restriction alimentaire a diminué l'expression des gènes *PLIN2*, *SCD*, *GLUT1*, *ATP5A1*, *AQP3*, *DNMT3A*, *BAX* et *HSPA9B* mais l'administration de PG a restauré l'expression des gènes *SCD*, *AQP3*, a diminué l'expression d'*ATP5A1* et a augmenté l'expression du gène *GLUT1*.

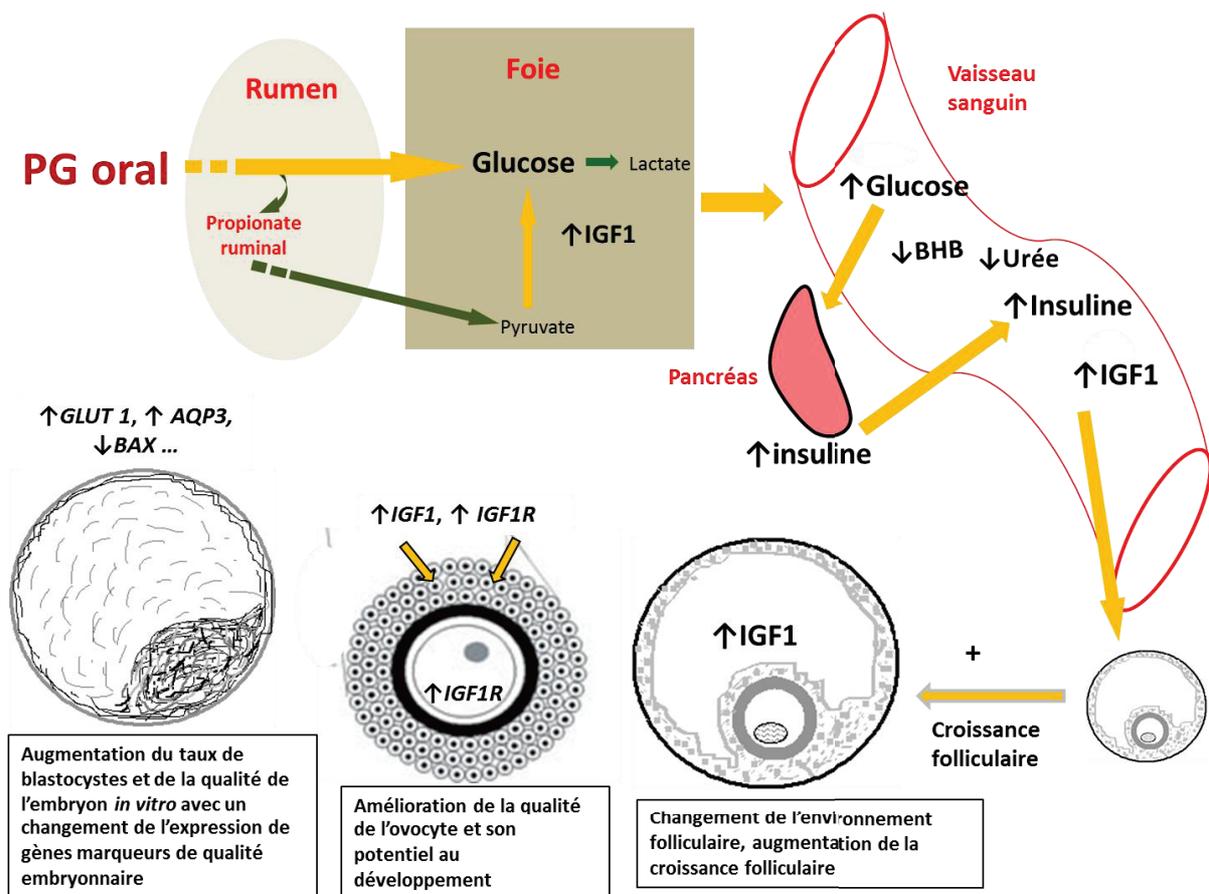
Dans notre expérimentation 2, le groupe de génisses ayant eu une alimentation restreinte a produit un taux inférieur de blastocystes en comparaison au groupe ayant reçu en plus une supplémentation de PG pour les deux profils d'AMH. Ces différences sont probablement en partie expliquées par les modifications de l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire, encore perceptibles après 7 jours de culture in vitro. Le PG a augmenté la qualité des embryons pour le groupe AMH B en augmentant l'expression des gènes *GLUT1* et *DNMT3A*, tandis qu'il y a une amélioration de la qualité des embryons du groupe AMH H via le niveau d'expression de *PLIN2*, en augmentant *AQP3* et en maintenant

un faible niveau d'expression de *BAX*. Des études ont montré de forts niveaux d'expression de ce dernier dans les ovocytes de moindre qualité morphologique et dans les embryons dégénérés (Yang & Rajamahendran, 2002).

L'administration de PG pendant 5 jours a été suffisante pour agir sur le système IGF des COCs et modifier positivement l'expression de certains gènes au niveau embryonnaire. Cependant d'autres gènes n'ont pas été modifiés ou ont été modifiés de façon différentielle selon le profil des génisses : par exemple, PG a augmenté l'expression de *GLUT1* dans le groupe AMH H, mais pas au même niveau que celle du groupe AMH B. Il est possible que le PG nécessite plus de temps pour interagir sur certains gènes en fonction du niveau d'AMH. D'autres investigations seraient nécessaires pour répondre à ces questions.

**Hormis la fonctionnalité de chaque gène, la conclusion majeure de cette expérience est qu'un traitement alimentaire des donneuses, même de courte durée est capable d'affecter le profil d'expression des gènes dans les embryons produits par OPU-FIV à partir d'ovocytes sortis très tôt du contexte maternel. Il est intéressant de trouver des effets sur l'expression des gènes au stade blastocyste alors que l'ovocyte a été collecté avant la maturation du follicule; ce constat est fait après plusieurs cycles cellulaires après sortie du contexte de restriction ou de supplémentation avec PG. Ces résultats plaident pour une néo-synthèse d'ARN embryonnaire qui a été affectée par le traitement qu'a reçu l'ovocyte, soit par des transcrits régulateurs stockés dans l'ovocyte qui vont plus ou moins activer les gènes exprimés dans l'embryon, soit par des régulations de type épigénétique qui passent à travers les cycles cellulaires en fonction de l'environnement que l'ovocyte a connu pendant sa croissance folliculaire. La croissance et la différenciation de l'ovocyte dans le follicule impactent donc l'expression des gènes dans le blastocyste.**

Un bilan des mécanismes d'action du PG suggérés par les résultats obtenus est présenté en Figure 39.



**Figure 39. Bilan du mode d'action du PG administré sous forme liquide chez les génisses laitières.** Lorsque la génisse reçoit du PG (drenchage) il passe dans le rumen et une partie est métabolisée en propionate mais le plus part est absorbé et passe directement dans le foie et est converti en glucose. Le propionate est transformé en pyruvate et une partie en glucose qui passe dans le sang. L'augmentation de glucose stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas, qui passe dans le sang. Produit par le foie l'IGF1 passe dans le sang. Ce mode d'actions suggère que l'administration de PG stimule la croissance folliculaire, change l'environnement folliculaire et améliore la qualité et taux de blastocystes du probablement à l'existence d'une régulation de la qualité ovocytaire induite par PG pendant la croissance folliculaire via des modifications du système IGF au niveau ovarien. Dans la Figure, la partie métabolique du PG a été adaptée d'Hidalgo et al. (2007) et la représentation graphique des follicules, ovocytes et embryons proviennent de Leroy et al. (2008b).

#### **4. Utiliser l'AMH comme marqueur endocrinien pour prédire la production d'embryons in vitro chez les bovins.**

Rico et al. (2012) ont démontré que l'AMH peut être utilisée comme marqueur de l'activité ovarienne et prédicteur de la production d'embryons in vivo en réponse au traitement de gonadotropines dans les schémas MOET. Ces auteurs ont montré une forte différence des concentrations d'AMH entre individus mais peu de variations pour le même individu. Rico et al. (2012) ont de plus proposé un seuil compris entre 75 et 80 pg.mL<sup>-1</sup> pour écarter les vaches avec une faible capacité de réponse au traitement de superovulation et de production d'embryons.

Dans notre étude, le groupe de génisses présentant un profil AMH B avait des valeurs d'AMH comprises entre 1 et 80 pg.mL<sup>-1</sup>, tandis que les génisses présentant un profil d'AMH H avaient des concentrations supérieures à 150 pg.mL<sup>-1</sup>. Des corrélations significatives positives ont été mises en évidence entre les niveaux d'AMH et de nombreux paramètres folliculaires et ovocytaires dans notre étude : le nombre de petits follicules (2-3mm) le jour 2 du cycle avant stimulation de la croissance folliculaire par l'hormone FSH ( $r = 0,64$  ;  $P = 0,0071$ ), le nombre de follicules de (2-8 mm) le jour 2 ( $r = 0,71$  ;  $P = 0,002$ ), le nombre de follicules de 2 à plus de 8 mm le jour 5 du cycle après stimulation de la croissance folliculaire comptés avant l'OPU ( $r = 0,87$ ,  $P < 0,0001$ ), le nombre total d'ovocytes ( $r = 0,84$  ;  $P < 0,0001$ ), le nombre d'ovocytes de qualité 1-3 ( $r = 0,60$  ;  $P = 0,0133$ ), le nombre d'ovocytes de qualité 1 ( $r = 0,45$  ;  $P = 0,0792$ ) et le nombre de blastocystes de qualité 1 ( $r = 0,56$  ;  $P = 0,0250$ ) pour le groupe contrôle. Ces résultats indiquent que les concentrations plasmatiques d'AMH mesurées avant stimulation de la croissance folliculaire peuvent être un marqueur endocrinien fiable et un possible prédicteur pour la production in vitro chez les bovins. Rico et al. (2012) ont publié des observations concordantes en comptant les nombres de follicules aspirés par OPU. De la même manière, une étude contemporaine à la nôtre (Guerrero et al., 2014) affiche des résultats similaires avec une corrélation positive pour le nombre de follicules, le nombre total d'ovocytes aspirés, et la production d'embryons in vitro. Cependant, quelques réserves ou précautions sont à considérer pour bien utiliser ce critère AMH compte tenu des variations observées entre les études. Comme rapporté par Rico et al. (2012), de nombreux facteurs liés à la prise des échantillons impactent les concentrations dosées par les méthodes ELISA : en particulier, la méthode de collecte des échantillons, leur conservation après prélèvement, la méthode de dosage sont des facteurs très importants pouvant modifier les résultats (Rico et al., 2012). En outre, des variations ont également été

rapportées en fonction de l'âge des génisses chez le bovins (Monniaux et al., 2013) et chez les ovins (La Hoz et al., 2014), ce qui nécessite de bien standardiser les protocoles de prélèvements chez les jeunes femelles, en particulier par rapport à la puberté.

## **Chapitre 8. Conclusions et perspectives**

L'originalité de cette expérimentation a été de mesurer l'effet d'une modulation transitoire de l'insuline basée sur une supplémentation de PG, dans un modèle expérimental de production d'embryons *in vitro*. Ce modèle a permis d'analyser les modifications métaboliques et hormonales induites par le PG dans différents tissus et liquides biologiques des génisses (plasma, liquide folliculaire, COCs, embryons), à différents stades au cours du cycle oestral, en utilisant chaque génisse comme son propre témoin. En outre, nous avons pu investiguer ces effets en fonction des niveaux d'AMH des donneuses qui correspondent à des profils contrastés de réserve folliculaire. L'administration de PG liquide par voie orale pendant une courte durée a permis d'augmenter les concentrations plasmatiques de métabolites et hormones métaboliques (insuline, IGF1, glucose) connus pour être liés positivement à la fertilité des génisses. Le PG a stimulé le nombre de petits follicules deux jours après le début de la supplémentation. La supplémentation a amélioré la compétence de développement ovocytaire, avec une augmentation du taux de blastocystes développés *in vitro* chez les génisses présentant des profils d'AMH élevés ou non (AMH B et AMH H). De plus, l'administration orale de PG a augmenté les concentrations d'IGF1 dans le liquide folliculaire et a permis de restaurer l'expression de quelques gènes, marqueurs de qualité embryonnaire au niveau de celle observée chez un lot de génisses nourries normalement, chez les blastocystes produits *in vitro* dans les deux groupes de génisses.

La conclusion majeure de ces travaux est qu'un traitement alimentaire des génisses donneuses, même de courte durée, est en mesure de stimuler la croissance folliculaire, d'améliorer la compétence ovocytaire et par conséquent la production d'embryons *in vitro*. Comme le PG a modifié le profil d'expression des gènes dans les embryons produits par OPU-FIV à partir d'ovocytes, sortis très tôt du contexte maternel, il est possible que les modifications de l'environnement maternel induites par le PG puissent être régulées via le système IGF1 de la façon suivante : néo-synthèse d'ARN embryonnaire, activation de transcrits régulateurs stockés dans l'ovocyte qui peuvent activer les gènes exprimés dans l'embryon, régulations de type épigénétique qui passent à travers les cycles cellulaires en fonction de l'environnement que l'ovocyte a connu pendant sa croissance folliculaire.

L'administration courte de PG chez les génisses peut devenir un outil performant dans les schémas de sélection en augmentant l'efficacité de la technique OPU-PIV. Cette supplémentation peut permettre d'augmenter la production individuelle des embryons de

donneuses de haute valeur génétique. Ces travaux ont permis de proposer un plan de supplémentation de courte durée chez des donneuses d'ovocytes, de 5 à 6 jours précédant l'OPU, à compter de l'émergence de la vague folliculaire précédant l'OPU, par exemple 2 jours avant la stimulation de la croissance folliculaire, au moment de la ponction du follicule dominant, qui induit l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire. Actuellement avec l'arrivée de la génomique un plus grand nombre d'ovocytes et d'embryons de qualité sont nécessaires pour accroître le progrès génétique. Les améliorations rencontrées avec le PG sur la qualité des ovocytes et des embryons peuvent être déterminants dans l'amélioration des taux de gestation et de la congélabilité des embryons OPU-PIV, cette hypothèse reste toutefois à vérifier. De plus, au vue de ces résultats il apparaît intéressant aussi de tester une administration de PG sur une courte durée pour la production in vivo d'embryons (Schéma MOET). Enfin, ce processus peut être intéressant aussi pour des éleveurs voulant démultiplier individuellement leurs meilleurs animaux. Ce protocole peut être utilisé chez des génisses arrivant à la station de donneuses avec un retard de croissance; ce cas est régulièrement rencontré.

Cette étude a permis de confirmer que l'AMH peut être un marqueur endocrinien prédicteur de la production d'embryons in vitro chez les bovins et devenir un outil de sélection des donneuses sur leur capacité à produire des embryons in vitro associée à la sélection génomique. Certains effets ont été plus marqués chez les génisses de profil AMH H : le PG a augmenté la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire par l'hormone FSH et la quantité des embryons totaux et de qualité 1 seulement pour les génisses présentant un profil AMH H. L'administration de PG a augmenté l'expression des gènes *IGF1* et *IGFR* des cellules du cumulus dans le groupe AMH H et l'expression d'*IGF1R* des ovocytes dans le groupe AMH B. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il est possible d'améliorer la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire et la production d'embryons chez les génisses présentant un faible niveau d'AMH. Chez les femmes présentant des niveaux bas d'AMH, une augmentation des doses de FSH est utilisée pour avoir une meilleure réponse superovulatoire (La Marca and Volpe, 2006), aussi des traitements avec des hormones comme la DHEA (Dehydroepiandrosterone) qui augmentent les concentrations d'IGF1 sont employés (Xu et al., 2014 ; Casson et al., 2000). Une autre stratégie peut être l'administration courte de PG qui améliore la qualité des ovocytes associée à des doses plus importantes de FSH dans le traitement de stimulation de la croissance folliculaire chez les femelles bovines avec une réserve folliculaire réduite.

En conclusion, cette étude confirme l'importance de l'environnement maternel sur la compétence ovocytaire et l'influence de la nutrition maternelle sur le développement embryonnaire précoce, même si les caractéristiques ovariennes propres à chaque animal restent un facteur de variation majeur de la réponse à la stimulation de la croissance folliculaire. Elle laisse entrevoir de multiples perspectives de travaux pour l'amélioration d'embryons in vitro et in vivo, afin de préciser les marqueurs impliqués dans les mécanismes de régulation liant environnement maternel et qualité embryonnaire (transcrits d'origine maternelle ou embryonnaire ; marques épigénétiques), d'optimiser les milieux utilisés pour la culture in vitro en fonction des caractéristiques nutritionnelles des donneuses ou encore d'adapter la préparation des donneuses par des approches de nutriginomique, en fonction de leur profil métabolique ou reproductif.

|                                    |
|------------------------------------|
| <b>Références Bibliographiques</b> |
|------------------------------------|

1. Aardema, H., Lolicato, F., van de Lest, C.H.A., Brouwers, J.F., Vaandrager, A.B., van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J., Vos, P.L.A.M., Helms, J.B., Gadella, B.M. **2013**. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol Reprod.* 27;88(6):164.
2. Adam C.L., Gadd T.S., Findlay P.A., Wathes D.C. **2000**. Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulation of luteinizing hormone secretion, and expression of mRNAs for IGFs, their receptors and binding proteins in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol* 166, 247–254.
3. Adamiak S.J., Mackie .K, Watt R.G., Webb R., Sinclair K.D. **2005**: Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod* 73, 918– 926.
4. Adamiak, S. J., K. Powell, J. A. Rooke, R. Webb, and K. D. Sinclair. **2006**. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 131:247–258.
5. Akagi S., Kaneko H., Nakanishi Y., Takedomi T., Watanabe G., Taya K. **1997**. Ovarian response and FSH profile in cows following injection of various doses of inhibin antiserum. *J Vet Med Sci*; 59:1129–35.
6. Aktas M.S., Ozkanlar S., UCAR O, Ozkanlar Y., Kaynard O., Aytakin I. **2011**. Relationships between Body Condition Score and some metabolic blood parameters in early lactating dairy cows *Revue Méd. Vét.* 162, 12, 586-592
7. Albuz F.K., Sasseville M., Lane M., Armstrong D.T., Thompson J.G., Gilchrist R.B. **2010**. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum Reprod* 25:2999–3011.
8. Allan G.J., Flint D.J., Patel K. **2001**. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reprod* 122.(1), 31-39.
9. Al-Trad B., Reisberg K. Wittek T., Penner G.B., Alkaassem A., Gäbel G., Fürll M., and Aschenbach J.R. **2009**. Increasing intravenous infusions of glucose improve body condition but not lactation performance in midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:5645–5658.
10. Alvarez P., Spicer L.J., Chase Jr C.C., Payton M.E., Hamilton T.D., Steward R.E., Hammond A.C., Olson T.A., Wettemann R.P. **2000**. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci* 2000;78:1291–302.
11. Argov N., Arav A., Sklan D. **2004**. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology* 61, 947–962.
12. Armstrong D.G., Gong J.G., Gardner J.O., Baxter G., Hogg C.O., Webb R. **2002**. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reprod* 123 (3), 371-378.
13. Armstrong D.G., McEvoy T.G., Baxter G., Robinson J.J., Hogg C.O., Woad K.J., Webb R. and Sinclair K.D. **2001**. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction* 64, 1624–1632.

14. Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ, **2002b**: Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 123, 789–797.
15. Armstrong DG, Gong JG, Webb R, **2002a**. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction (Suppl. )* 61, 403–414.
16. Armstrong DG1, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. **2002c**. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. Mar;123(3):371-8.
17. Arruda R.P., E.C.C. Celeghini, M.A. Alonso, H.F. Carvalho, K.M. Lemes, D.F. Silva, S.A.F. Rodriguez, F.J. **2012**. Affonso Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen in vivo and in vitro *Anim Reprod*, v.9, n.3, p.345-353
18. Bagavandoss P., Midgley A.R. and Wicha M. **1983**. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31, 633–640.
19. Ball, P. J. H. and A. R. Peters. **2004**. Fertilization, Conception and Pregnancy. *Reproduction in Cattle*, Blackwell Publishing Ltd: 56-67.
20. Barreto Melo, M. A. B., Garrido, N., Alvarez, C., Bellver, J., Meseguer, M., Pellicer, A., and Remohí, J. **2009**. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/ embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. *Fertil. Steril.* 91(1), 148–156.
21. Bastos M.R., Martins A.C., Melo L., Carrijo L.H.D., Rumpf R., Sartori R. **2007**. Effect of body condition score and feed intake on the superovulatory response and embryo production in Nelore heifers. *Acta Sci Vet*, 35(suppl. 3):1242. (abstract).
22. Batista E.O.S., Macedo G.G., Sala R.V., Ortolan M.D.D.V., Sá Filho M.F., Del Valle T.A., Jesus E.F., Lopes R.N.V.R., Rennó F.P. and Baruselli P.S. **2014**. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers *Reprod Dom Anim* 49, 448–452.
23. Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., and Wu, G. **2008**. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell-signalling pathways. *Reprod. Biol.* 8, 179–211.
24. Bazin S. **1984**. In *Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie noires*. Paris: Technipel.
25. Bazin S. **1989**. *Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Montbéliardes*. Ed ITEB. Paris: Technipel.
26. Beam, S. W. and W. R. Butler. **1999**. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Supplement* 54:411-424.
27. Bell, A. W. **1995**. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci* 73: 2804-2819.
28. Belloc E., Piqué M., and Méndez R. **2008**. Sequential waves of polyadenylation and deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 665–670.
29. Bender K., Walsh S., Evans A. C. O, Fair T., and Brennan L. **2010**. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction* 139:1047-1055.
30. Bergfeld E. G. M., Kojima F. N., Cupp A. S., Wehrman M. E., Peters K. E., Garcia Winder M., Kinder J. E. **1994**. "Ovarian follicular development of prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake". *Biology of Reproduction* 51: 1051-1057.

31. Berne, R.M. and Levy, M.N. **1993**. Hormones of the pancreatic islets. Physiology, 3rd edn, (Mosby Year Book, St Louis, MO), 851–875
32. Bertoldo M-J., Bernard J., Duffard N., Mermillod P., Locatelli Y. **2013**. Régulation de la croissance des follicules pré-antraux, un frein à l'épuisement de la réserve ovarienne Gyne'cologie Obstet'rique & Fertilité 41 :540–543
33. Betteridge K.J., Fléchon J.E., **1988**. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. Theriogenology 29, 155–187
34. Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Martinez N., Lima F.S., Staples C.R., Thatcher W.W., Santos J.E.P. **2012**. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows Anim Reprod, v.9, n.3, p.260-272.
35. Block J., Hansen P.J., Loureiro B., Bonilla L. **2011**. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro: actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. Theriogenology. 2011 Dec;76(9):1602-9.
36. Blondin P, Sirard MA. **1995**. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev, 41:54-62
37. Blondin P, Vigneault C., Nivet A.L, Sirard M.A. **2012**. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? Anim Reprod, v.9, n.3, p.281-289
38. Blondin P., Beaulieu M., Fournier V., Morin N., Crawford L., Madan P., King W.A.. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. Theriogenology 71:30-38.
39. Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., Sirard, M.A., **2002**. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol. Reprod. 66, 38–43.
40. Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A., and Sirard, M. A. **1997**. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. Theriogenology 47, 1061–1075
41. Bó G.A., Guerrero D.C., Tribulo A., Tribulo H., Tribulo R., Rogan D., Mapletoft R.J.. **2010**. New approaches to superovulation in the cow. Reprod Fertil Dev. 22(1):106-12.
42. Bó, G. A., Guerrero, D. C., and Adams, G. P. **2008**. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. Theriogenology 69, 81–87.
43. Bonczek, R.R., Young, C.W., Wheaton, J.E., Miller, K.P. **1988**. Responses of somatotropin, insulin, prolactin, and thyroxine to selection for milk yields in Holsteins. J. Dairy Sci. 71, 2470–2479.
44. Boni R. **2012**. Origins and effects of oocyte quality in cattle. Anim Reprod, v.9, n.3, p.333-340.
45. Borş SI, Gheorghe Solcan, Alina Vlad-Sabie. **2014**. Effects of propylene glycol supplementation on blood indicators of hepatic function, body condition score, milk fat-protein concentration and reproductive performance of dairy cows Acta vet. Brno. 83: 027–032
46. Bossaert, P., De Cock, H., Leroy, J.L.M.R., De Campeneere, S., Bols, P.E. J., Filliers, M., and Opsomer, G. **2010**. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. Theriogenology 73, 1210–1219.
47. Bossaert, P., Leroy, J. L. M. R., De Campeneere, S., De Vlieghe, S., and Opsomer, G. **2009**. Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian-Blue, Holstein-Friesian and East-Flemish breeds. J. Dairy Sci. 92, 4404–4411.

48. Bossis, I., R. P. Wettemann, S. D. Welty, J. A. Vizcarra, L. J. Spicer, and M. G. Diskin. **1999**. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J. Anim. Sci.* 77:1536–1546.
49. Boumela I, Guillemain Y., Guérin J.-F., Aouacheria A. **2009**. Les régulateurs d'apoptose de la famille Bcl-2 dans les gamètes et lors du développement embryonnaire précoce The Bcl-2 family pathway in gametes and preimplantation embryos. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 37, Issue 9, September 2009, Pages 720–732.
50. Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.D.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A., **1982**. Normal development following in vitro fertilisation in the cow. *Biol. Reprod.* 27, 147–158.
51. Britt, J. H. **1992**. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Proceedings of the Annual Convention – American Association of Bovine Practitioners*.
52. Brockman, R.P. **1984**. Pancreatic and adrenal hormonal regulation of metabolism. In *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, Proc. 6th Int. Symp. on Ruminant Physiology, Banff, Canada, (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ), 405–419
53. Brockman, R.P., Laarveld, B. **1986**. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. *Livest. Prod. Sci.* 14, 313-334.
54. Brunet S., Maro B. **2005**. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*, 130, 801-811.
55. Brunschwig P., Champion H., Touzé J.P., Dupont R, Beauchamp J.J. **1995**. Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches normandes. Institut de l'Élevage (Eds), 28p.
56. Burgwald-Balstad L.A., Caton J.S., Burke V.I. and Olson K.C. **1995**. Influence of forage level and naloxone injection on feed intake, digestion, and plasma hormone and metabolite concentrations in dairy heifers. *Journal of Animal Science* 73 2677–2686.
57. Butler S T, Pelton S. H., and Butler W. R. **2006**. Energy Balance, Metabolic Status, and the First Postpartum Ovarian Follicle Wave in Cows Administered Propylene Glycol. *J. Dairy Sci.* 89:2938-2951.
58. Butler S.T., Marr A.L., Pelton S.H., Radcliff R.P., Lucy M.C., Butler W.R. **2003a**. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J. Endocrinol.* 176, 205–217
59. Butler W.R. **2000**. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 2: 449–457.
60. Butler, A. A., and Le Roith, D. **2001**. Control of growth by the somatotropic axis: GH and the IGF's have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 141–164.
61. Butler, W. R. **2003b**. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* Volume 83, Issues 2–3: 211–218.
62. Butler, W.R., Everett, R.W. & Coppock, C.E. **1981**. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. *Journal of Animal Science* 53(3), 742-748.
63. Callesen, H., Løvendahl, P., Bak, A., and Greve, T. **1995**. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on Day 7 from superovulated dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 1539–1543.

64. Campbell B.K., Scaramuzzi R.J. & Webb R. **1996**. Induction and main tenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility* 106 7–16.
65. Campbell B.K., Baird D.T. and Webb R. **1998**. Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cul- tured in a serum-free system. *Journal of Reproduction and Fertility* 112 69–77.
66. Campbell N.A., Reece J.B., and Mitchell L.G. **1999**. *Biology*. edn 5th: In: Benjamin/Cummings.
67. Canfield R.W. and Butler W.R. **1991**. Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69:740-746.
68. Cetica P., Pintos L., Dalvit G., Beconi M. **2002**. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124, 675–681.
69. Chagas L. M., Gore P. J. S., Graham GMacdonald., K. A., and Blache D. **2008**. Effect of restricted feeding and monopropylene gly- col postpartum on metabolic hormones and postpartum anestrus in grazing dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 91:1822–1833.
70. Chagas, L. M., Gore P. J. S., Meier S., Macdonald K. A., and Verkerk G. A. **2007**. Effect of monopropylene glycol on luteinizing hormone, metabolites, and postpartum anovulatory intervals in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1168–1175.
71. Chastant-Maillard S., Fournier R., Remy D. **2005**. Actualités sur le cycle de la vache. *Point Vet ; numéro spécial (36) : 10-15*
72. Chastant-Maillard S., Quinton H., Lauffenburger J., Cordonnier-Lefort N., Richard C., Marchal J., Mormede P., Renard J.P. **2003**. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 125: 555-563.
73. Chatot C.L., Ziomek C.A., Bavister B.D., Lewis J.L., Torres I. **1989**. An improved culture medium supports development of random bread 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 86: 679-688
74. Chelikani P.K., Ambrose J.D., Kennelly J.J. **2003**. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. *Theriogenology*, 60 : 707–725
75. Christensen, J. O., Grummer, R. R., Rasmussen, F. E. , Bertics, S. J., **1997**. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 563-568.
76. Chun S.Y., Eisenhauer K.M., Minami S., Billig H., Perlas E., Hsueh A.J. **1996**. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137:1447-1456.
77. Chung Y.H, Martinez C. M., Brown., N. E , Cassidy T. W., Varga G. A. **2009**. Ruminal and blood responses to propylene glycol during frequent feeding *J. Dairy Sci.* 92:4555-4564
78. Coffey, M. P., Emmans G. C., and Brotherstone S. **2001**. Genetic evaluation of dairy bulls for energy balance traits using random regression. *Anim. Sci.* 73:29–40.
79. Comin A., Gerin D., Cappa A., Marchi V., Renaville R., Motta M., Fazzini U. & Prandi A. **2002**. The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. *Theriogenology* 58 (5), 899- 910.
80. Comizzoli P., Marquant-Le Guienne B., Heyman Y., Renard J.P. **2000**. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 62:1677–1684.

81. Comizzoli P., Urner F., Sakkas D., and Renard J. P. **2003**. Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the S phase in bovine zygotes. *Biol. Reprod.* 68, 1934–1940.
82. Connor E.E., Barao S.M., Kimrey A.S., Parlier A.B., Douglass L.W., Dahl G.E. **2000**. Predicting growth in Angus bulls: the use of GHRH challenge, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins. *J Anim Sci* 2000;78:2913–8.
83. Corcoran D., Fair T., Park S., Rizos D., Patel O.V., Smith G.W., Coussens P.M., Ireland J.J., Boland M.P., Evans A.C., Lonergan P. **2006**. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo culture bovine embryos. *Reproduction*, v.131, p.651-660.
84. Cordova A., Perreau C., Uzbekova S., Ponsart C., Locatelli Y., Mermillod P. **2014**. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology* 81: 1163–1173.
85. Corrêa G.A., Rumpf R., Mundim T.C., Franco M.M., Dode M.A. **2008**. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci.* Mar 3;104 (2-4):132-42.
86. Coy P. and Avilés M. 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc.* **2010** Aug;85(3):593-605
87. Cozzi G., Berzaghi, P., Gottardo, F., Gabai, G., Andrighetto, I. **1996**. Effects of feeding propylene glycol to mid-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 43–51.
88. Daftary SS, Gore AC. **2005**. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med*;230:292–306.
89. Dalton J.C., Nadir S., Bame J.H., Noftsinger M., Nebel R.L. and Saacke R.G. **2001**. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 84 (11), 2413-2418.
90. Davis, M. E., and R. C. M. Simmen. **1997**. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:317– 324.
91. De Roover R., Feugang J.M., Bols P.E., Genicot G., Hanzen Ch. **2008**. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle In Vitro Embryo Production. *Reprod Domest Anim.* 43(2):239-45.
92. De Vries A., Overton M., Fetrow J., Leslie K., Eicker S., Rogers G. **2008**. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *J Dairy Sci*, 91:847-856.
93. Deb G.K., Jin J.I, Kwon T.H., Choi B.H., Bang J.I, Dey S.R., Cho IR, Kong IK. **2011**. Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Reprod Biol Endocrinol*;9:121.
94. DeFronzo R.A., Bonadonna R.C. and Ferrannini E. **1992**. Pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care*, 3, 318–368
95. Deleuze S., Goudet G. **2010**. Cysteamine Supplementation of In vitro Maturation Media: A Review. *Reprod Domest Anim.* 2010 Dec;45(6):e476-82
96. Derivaux J, Ectors F. **1986**. Reproduction chez les animaux domestiques - 3ème édition revue. Louvain-La-Neuve : Cabay, 1141 p.
97. Dieleman S.J., Hendriksen P.J.M., Viuff D., Thomsen P.D., Hyttel P., Knijn H.M, Wrenzycki C., Kruip T.A., Niemann H., Gadella B.M., Bevers M.M. and Vos P.L.A.M. **2002**. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on

- developmental capacity and quality of pre-implantation embryos *Theriogenology* 57 5-20.
98. Disenhaus C., Cutullic E., Freret S. Paccard P. Ponsart C. **1988**. Vers une cohérence des pratiques de détection des chaleurs : intégrer la vache, l'éleveur et le système d'élevage. *Renc. Rech. Ruminants*, 2010, 17.
  99. Dorman, D.C., Haschek, W.M. **1991**. Fatal propylene glycol toxicosis in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 1643–1644.
  100. Dorshkind K, Horseman ND. **2000**. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrinol Rev*;21:292–312.
  101. Downs, S.M., Utecht, A.M. **1999**. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte–cumulus cell complexes. *Biol. Reprod.* 60, 1446–1452.
  102. Driancourt M.A. **2001**. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55 1211–1239.
  103. Driancourt M.A. and Thuel B. **1998**. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review, *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 345–362.
  104. Drion P.V., Beckers J.F., Ectors F.J., Hanzen C., Houtain J.-Y. and Lonergan P. **1996**. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale: 1. Folliculogénèse et atresie. *Le Point Vétérinaire* 28 (numéro spécial "Reproduction des ruminants"), 37-47.
  105. Drion P.V., Beckers J.F., Derkenne F., Hanzen Ch. **2000**. Le développement folliculaire chez la vache. 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du postpartum. *Annales de Médecine Vétérinaire* 2000, 144, 385-404
  106. Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., and Themmen, A. P. **2002**. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076–1084.
  107. Durocher J, Morin N, Blondin P. **2006**. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*, 65:102-115.
  108. Earle, D. F. **1976**. A guide to scoring dairy cow condition. *J. Agric.(Victoria)* 74:228–231.
  109. Edmonson, A. J., Lean I. J., Weaver L. D., Farver T, and Webster G.. **1989**. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Dairy Sci.* 72:68–78.
  110. Edwards R.G. **1974**. Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 37, 189–219.
  111. Ellis, J. L., Qiao F., and Cant J. P. **2006**. Evaluation of net energy expenditures of dairy cows according to body weight changes over a full lactation. *J. Dairy Sci.* 89:1546–1557.
  112. El-Roeiy, A., Chen, X., Roberts, V.J., LeRoith, D., Roberts Jr., C.T., Yen, S.S. **1993**. Expression of insulin-like growth factor (IGF-1 and IGF-II) and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1411–1418.
  113. El-Roeiy, A., Chen, X., Roberts, V.J., Shimasaki, S., Ling, N., Le Roith, D., Roberts Jr., C.T., Yen, S.S. **1994**. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF binding proteins 1–6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 1488–1496.

114. Ennuyer M. **2000**. Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction - Point Vet., 31 (209) : 377-383
115. Ereno R.L. , A. G. Pupulim , B. Loureiro , M. G. Favoreto , A. C. S. Castilho , J. Buratini and C. M. Barros. **2012**. 175 The effect of nutrition on ovarian follicle population and plasma anti-mullerian hormone concentration in Aberdeen Angus heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 25(1) 236-236
116. Espey L.L. and Lipner H. **1994**. Ovulation. In *The Physiology of Reproduction*, edn 2, pp 725–780. Eds E Knobil & JD Neill. New York, NY: Raven Press.
117. Esposito G., Irons P.C., Webb E. C., Chapwanya A. **2014**. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows *Animal Reproduction Science* 144: 60– 71
118. Evans A.CO., Mossa F., Walsh S.W., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Ireland J.LH., Smith G.W., Ireland J.J. **2012**. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Domest Anim*, 47:31-37.
119. Eyestone, W.H. and First, N.L. **1989**. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned media. *J. Reprod. Fertil*, 85, 715-720.
120. Fair, T., Hyttel P., and Greve T. **1995**. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development* 42, 437-442.
121. Fair T. **2003**. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence *Animal Reproduction Science* 78 203–216
122. Fair T. **2010**. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 22, 13–20
123. Fair T. **2013**. Molecular and endocrine determinants of oocyte competence *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p.277-282.
124. Fenwick, M.A., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Patton, J., Murphy, J.J., Wathes, D.C. **2008a**. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 31–44.
125. Fenwick, M.A., Llewellyn, S., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Murphy, J.J., Patton, J., Wathes, D.C. **2008b**. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. *Reproduction* 135, 63–75.
126. Ferreira E.M., Vireque A.A., Adona P.R., Meirelles F.V., Ferriani R.A., Navarro P.A. **2009**. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836–848.
127. Fluker M.R., Hooper W.M., Yuzpe A.A. **1999**. Withholding gonadotropins ("coasting") to minimize the risk of ovarian hyperstimulation during superovulation and in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*, 71:294-301.
128. Forde N., Beltman M.E., Lonergan P., Diskin M., Roche J.F., Crowe M.A. **2011**. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle *Animal Reproduction Science* 124: 163–169
129. Formigoni, A., Cornil, M., Prandi, A., Mordenti, A., Rossi, A., Portetelle, D., Renaville, R. **1996**. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J. Dairy Res.* 63, 11–24.
130. Fortune J.E. **1994**. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50 225–232.

131. Fortune J.E. **2003**. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 78, 135-163.
132. Fouladi-Nashta A.A., Gutierrez C.G., Garnsworthy P.C. and Webb R. **2005**. Effects of dietary carbohydrate source on oocyte/embryo quality and development in high-yielding, lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, Special issue (2005), 135–136.
133. Fréret. **2007**. Variation of dietary intake intake metabolic status and embryo production in superovulated dairy cattle. PhD thesis. Ecole Doctorale ABIES. AgroParisTech.
134. Freret S., Grimard B., Ponter A.A., Joly C., Ponsart C. and Humblot P. **2006**. Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction* 131 783–794.
135. Friggens, N. C., Ridder C., and Lovendahl P. **2007**. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5453–5467.
136. Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G. **2001**. Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, 55:1341–1357.
137. Gamarra G. Lacaze S. , Ponsart C., Mouneyseyes M, Marquant Le Guienne B. (accepte for publication). In vitro embryo production from oocytes fertilized with unsorted or x-sorted sperm and issued from subfertile high genetic merit cows submitted or not to a 48 h coasting period following FSH stimulation. Proceedings of the 30 th Scientific meeting of European Embryo Transfer Association (AETE).
138. Gamarra, G., Ponsart, C., Lacaze, S., Le Guienne, B., Humblot, P., Deloche, M.-C., Monniaux, D., and Ponter, A. A. **2014**. Dietary propylene glycol and in vitro embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. *Reprod. Fertil. Dev.*
139. Gao, H., Wu, G., Spencer, T. E., Johnson, G. A., Li, X., and Bazer, F. W. **2009**. Select nutrients in the ovine uterine lumen. I. Amino acids, glucose, and ions in uterine luminal flushings of cyclic and pregnant ewes. *Biol. Reprod.* 80, 86–93.
140. Garnsworthy .PC., Lock A., Mann G.E., Sinclair K.D and Webb R. **2008**. Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. *Journal of Dairy Science* 91 3814–3823.
141. Garnsworthy, P. C., Fouladi-Nashta, A. A., Mann, G. E., Sinclair, K. D., and Webb, R. **2009**. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction* 137, 759–768.
142. Gayrard V. *Physiologie de la reproduction des mammifères*. **2007**. École Nationale vétérinaire, Toulouse, septembre, 198 pp.
143. Georgiou A.S., Snijders A.P, Sostaric E., Aflatoonian R., Vazquez J.L., Vazquez J.M., Roca J., Martinez E.A., Wright P.C., Fazeli A. **2007**. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res* 6, 4656–4666.
144. Giesecke D., Stangassinger M., Veitinger W. **1987**. Plasma-Insulin und Insulinantwort bei Kühen mit hoher Milchleistung. *Fortschr. Tierphysiol. Tierernaehr.* Nr. 18, 20–29.
145. Gigli I., Cushman R. A., Wahl, C. M., and Fortune, J. E. **2005**. Evidence for a role for anti-Müllerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 480–488.
146. Giudice L.C. **1992**. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Reviews* 13 641–669.
147. Gong J.G., Lee W.J., Garnsworthy P.C., Webb R. **2002**. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123:419-427.

148. Gong J.G., McBride D., Bramley T.A. and Webb R. **1993**. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 139 (1), 67-75.
149. Gosden R.G. **2002**. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186 (2), 149-153.
150. Gosden R.G., Hunter R.H., Telfer E., Torrance C. and Brown N. **1988**. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 82 813–825.
151. Granger A.L., Wyatt W.E., Craig W.M., Thompson, D.L., Hembry, F.G. **1989**. Effects of breed and wintering diet on growth puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-I in heifers. *Domest. Anim. Endocr.* 6, 253–263.
152. Greenwald G.S. and Roy S.K. **1994**. Follicular development and its control. In *The Physiology of Reroduction* 2nd Edn pp 629–724 Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press Ltd, New York.
153. Greve T., Callesen H., Hyttel P., Hoier R., Assey R., **1995**. The effect of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 11-50.
154. Greve T., Xu K. P., Callesen H., and Hyttel P. **1987**. In vivo develop- ment of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 4:281–285.
155. Grimard B., Marquant-Leguienne B., Remy D., Richard C., Nuttinck F., Humblot P. and Ponter A. A. **2013**. Postpartum variations of plasma IGF and IGFBPs, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and subsequent fertility. *Reprod Domest Anim* 48(2): 183-194.
156. Grimberg A. and Cohen P. **2000**. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J. Cell. Phy.* 183:1-9
157. Grinberg N., Elazar S., Rosenshine I., and Shpigel N. Y. **2008**.  $\beta$ -Hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 76:2802–2807.
158. Grummer R. R. **1993**. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 76: 3882-3896.
159. Grummer R.R., Winkler J.C., Bertics S.J., Studer V.A. **1994**. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 77, 3618-3623.
160. Guerreiro B.M, Batista E.O.S., Vieira L.M, Sá Filho M.F., Rodrigues C.A., Castro Netto A., Silveira C.R.A, Bayeux B.M., Dias E.A.R., Monteiro F.M, Accorsi M., Lopes R.N.V.R, Baruselli P.S. **2014**. Plasma anti-Mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrinol.* 23;49C:96-104
161. Gutierrez C.G., Oldham J., Bramley T.A., Gong J.G., Campbell B.K. and Webb R. **1997**. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science* 75 1876–1884.
162. Gutierrez-Adan A, Lonergan P., Rizos D., Ward F.A., Boland M.P., Pintado B. and J. de la Fuente J. **2001**. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Thenogenology* 55: 1117-1126, 2001
163. Gwazdauskas F.C., Kendrick K.W., Pryor A.W., Bailey T.L. **2000**. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. *J Dairy Sci* 83, 1625–1634.
164. Hadley M. E. **1996**. Pancreatic hormones and metabolic regulation. *Endocrinology*. 4th edn, (Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ), 231–255

165. Hall B. and Glaze J. B. **2013**. The use of sexed semen in the beef industry. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle October 15-16
166. Hallberg L.M., Ikeno Y., Englander E., Greeley Jr G.H. **2000**. Effects of aging and caloric restriction on IGF-I, IGF-I receptor, IGFBP-3 and IGFBP-4 gene expression in the rat stomach and colon. *Regulatory Peptides* 10;89(1-3):37-44.
167. Hanzen C., Lourtie O., Drion P.V. **2000**. Le développement folliculaire chez la vache I- Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann. Med. Vet.* 144, 223-235.
168. Hart I.C., Bines J.A., Balch C.C., Cowie A.T. **1975**. Hormone and metabolite differences between lactating beef and dairy cows. *Life Sci.* 16, 1285–1292.
169. Hart I.C., Bines J.A., Morant S.V., Ridley J.L. **1978**. Endocrine control of energy metabolism in the cow: comparison of the level of hormones (prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine) and metabolites in the plasma of high- and low-yielding cattle at various stages of lactation. *J. Endocrinol.* 77, 333–345.
170. Hasegawa Y., Miyamoto K., Sugino H., Takio K., Inoue M., Ibuki Y. **1994**. Progress with human and rat inhibin characterization. In: Burger HG, Findlay J, Robertson D, de Kretser D, Petraglia F, editors. *Inhibin and inhibin-related proteins*. Rome: Ares-Serono Symposia Publications, p. 5–24.
171. Hasler J.F. **2014**. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81:152–169
172. Hayirli A. **2006**. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet. Res. Commun.* 30:749–774.
173. Hayirli, A., Grummer, R. R., Nordheim, E. V., and Crump, P. M. **2002**. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 85, 3430–3443.
174. Hendriksen, P.J., P.L. Vos, W.N. Steenweg, M.M. Bevers and S.J. Dieleman. **2000**. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53:11-20.
175. Hennet M. and Combelles C. **2012**. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 819-83.
176. Hidalgo C. O., Gomez E., Prieto L., Duque P., Goyache F., Fernandez L. Fernandez I., Facal N, Diez C. **2004**. Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology* 62, 664-676.
177. Hidalgo C. O., Tamargo C., Gómez E. Piñeiro, Facal N., Diez C. **2007**. El propilenglicol mejora los resultados de la transferencia de embriones. *Tecnología Agroalimentaria*. N° 4, pp. 33-37.
178. Himpe, E., S. A. Abdul Rahim, P. Verdood, H. Mano, and R. Kooijman. **2013**. Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils. *Cell. Signal.* 25:666–673.
179. Hoedemaker, M., D. Prange, H. Zerbe, J. Frank, A. Daxenberger, and H. H. D. Meyer. **2004**. Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2136–2145
180. Holtenius, P., Holtenius, K. **1996**. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *J. Vet. Med. A* 43, 579-587.
181. Homa S.T. and Brown C.A. **1992**. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 94, 153–160.
182. Houseknecht, K. L., D. L. Boggs, D. R. Champion, J. L. Sartin, T. E. Kiser, G. B. Rampacek, and H. E. Amos. **1988**. Effect of dietary energy source and level on serum

- growth hormone, insulin-like growth factor-I, growth and body composition in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 66:2916–2923.
183. Hsu A., Arny M., Knee A. B., Bell C., Cook E., Novak A. L., and Grow, D. R. **2011**. Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. *Fertil. Steril.* 95(2), 474–479.
  184. Hsu W.H. and Crump M.H. **1989**. The endocrine pancreas. In: L. E. McDonald (ed), *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, 4th edn, (Lea and Febiger, Philadelphia, PA), 186–201
  185. Huang, H. F., He, R. H., Sun, C. C., Zhang, Y., Meng, Q. X., and Ma, Y. Y. **2006**. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum. Reprod. Update* 12, 785–795.
  186. Humblot, P., Holm, P., Lonergan, P., Wrenzycki, C., Lequarré, A. S., Guyader-Joly, C., Herrmann, D., Lopes, A., Rizos, D., Niemann, H., and Callesen, H. **2005**. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 63, 1149–1166
  187. Huyart C. **2004**. Relation entre la qualité des gamètes femelles et la fertilité chez la vache laitière. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Nantes). N-2004-152. 150 pages.
  188. Hwa V., Oh Y., and Rosenfeld R. G. **1999**. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 20: 761–787.
  189. Hyttel P., Fair T., Callesen H., and Greve T. **1997**. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23-32.
  190. Imai, K., Matoba S., Dochi O., and Shimohira I. **2002**. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *J. Vet. Med. Sci.* 64:887–891.
  191. Imai, K., Tagawa M., Yoshioka H., Matoba S., Narita M., Inaba Y., Aikawa Y., Ohtake M., and S. Kobayashi. **2006**. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. *J. Reprod. Dev.* 52(Suppl.):S19–S29.
  192. Ingvarsen K. L., and Boisclair Y. R.. 2001. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21:215–250.
  193. Ireland J.J, Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Smith G.W., Mossa F, Evans A.C.O. **2010**. Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters. *Biol Reprod*, 83:277. (abstract).
  194. Ireland J.J., Zielak A.E., Jimenez-Krassel F., Folger J., Bettegowda A., Scheetz D, Walsh S., Mossa F., Knight P.G., Smith G.W., Lonergan P., Evans A.C.O. **2009**. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod*, 80:954-964.
  195. Ireland, J. J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Lonergan, P., and Evans, A. C. O. **2007**. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum.Reprod.* 22, 1687–1695.
  196. Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Perez, G. I., Evans, A. C. O., and Ireland, J. J. **2008**. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225.
  197. Ivany, J. M., Anderson, D. E. **2001**. Propylene glycol toxicosis in a llama. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 243-244.

198. Jaiswal R.S., Singh J., Marshall L., Adams G.P. **2009**. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle R.S. *Theriogenology* 72: 81–90
199. Janes, A. N., Weekes, T. E. & Armstrong, D. G. **1985**. Insulin action and glucose metabolism in sheep fed on dried-grass or ground, maize-based diets. *British Journal of Nutrition*, 54(2), 459-471.
200. Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J. S., Lonergan, P., Evans, A. C. O., and Ireland, J. J. **2009**. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 1272–1281
201. Johnson, R.B. **1954**. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Vet.* 44, 6–21.
202. Jones EJ, Armstrong JD, Harvey RW. **1991**. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Braford, Charolais and Simmental heifers. *J Anim Sci* 69:1607–15.
203. Jorritsma, R. **2003**. Negative energy balance in dairy cows as related to fertility. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, PhD thesis.
204. Josso, N., and Clemente, N. **2003**. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 91–97.
205. Jost, A., Vigier, B., Prepin, J., and Perchellet, J. P. **1973**. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog. Horm. Res.* 29, 1–41.
206. Kahn, C.R., **1994**. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43, 1066–1084.
207. Khan D. R., Dube D., Gall L., Peynot N., Ruffini S, Laffont L., Le Bourhis D., Degrelle S., Jouneau A., Duranthon V. **2012**. Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. *PLoS ONE* 7(3): e34110.
208. Kakar M. A., Maddocks S., Lorimer M. F., Kleemann D. O., Rudiger S. R., Hartwich K. M., and Walker S. K. **2005**. The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Theriogenology* 64:1090–1103.
209. Kawashima C., Kida K., Hayashi K.G., Amaya Montoya C., Kaneko E., Matsunaga N., Shimizu T., Matsui M., Miyake Y., Schams D, Miyamoto A. **2007b**. Changes in plasma metabolic hormone concentrations during the ovarian cycles of Japanese Black and Holstein cattle. *J Reprod Dev.* 53: 247–54.
210. Kawashima C., Matsui M., Shimizu T., Kida K., and Miyamoto A. **2012**. Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *J. Reprod. Dev.* 58:10–16.
211. Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Montoya, C.A., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y., Schams, D., Miyamoto, A. **2007a**. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133, 155–163.
212. Kaye P.L. **1997**. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.* 2, 121– 127.
213. Kendrick K.W., Bailey T.L., Garst A.S., Pryor A.W., Ahmadzadeh A., Akers R.M., Eyestone W.E., Pearson R.E., Gwazdauskas F.C. **1999**. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J Dairy Sci* 82, 1731–1740.
214. Kerbrat, S., and C. Disenhaus. **2004**. A proposition for an updated behavioral characterization of the estrous period in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 87:223–238.

215. Kevenaar M.E., Meerasahib M.F., Kramer P., van de Lang-Born B.M., de Jong F.H., Groome N.P., Themmen A.P. and Visser J.A. **2006**. Serum anti-Mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 147 3228–3234.
216. Kitamura S.S., Antonelli A.C., Maruta C.A., Soares P.C., Sucupira M.C., Mori C.S., Miranda R.M. and Ortolani E.L. **2003** A model for ammonia poisoning in cattle. *Veterinary and human toxicology* 45 274 -277.
217. Knight P.G. **1996**. Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol*; 17:476–509.
218. Knight P.G, Glister C. **2001**. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, 121:503-512.
219. Knijn H. **2004**. Gene expression and apoptosis in bovine embryos during in vitro culture and in vivo development.. Thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands.
220. Knijn. **2012**. Oocyte Collection; What is New? WORKSHOP I December 2012 A.E.T.E. Newsletter N°38
221. Kölle S., Reese S., Kummer W. **2010**. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging *Theriogenology* 73 : 786–795
222. Kristensen, N. B., and Raun, B. M. L. **2007**. Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4707–4717.
223. Kruip T.A., Kemp B., 1999. Nutrition and fertility in agricultural domestic animals. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 124, 462–467.
224. Kruip T.A.M., Van Beek H., De Wit A., Postma A. **1995**. Quality of bovine oocytes in dairy cows post partum: consequences for embryo production in vivo and in vitro. *Proceedings of 11th Conference of the ESET, Hannover, 8–9 September 1995*, pp. 113–119.
225. Kurosaki N., Yamato O., Sato J., Naito Y., Mori F., Imoto S., Maede Y. **2007**. Biomarkers for the activation of calcium metabolism in dairy cows: elevation of tartrate-resistant acid phosphatase activity by lowering dietary cation–anion difference is associated with the prevention of milk fever. *J Vet Med Sci* 2007;69:265–70.
226. Kwintkiewicz, J., and Giudice L. C. **2009**. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin. Reprod. Med.* 27:43–51.
227. Lacau-Mengido I.M., Mejía M.E., Díaz-Torga G.S., Gonzalez Iglesias A., Formía N., Libertun C., Becú-Villalobos D. **2000**. Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J Anim Sci* 78:817–24.
228. Lahoz B., Alabart J.L., Cocero M.J., Monniaux D., Echegoyen E., Sánchez P., Folch J. **2014**. Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies *Theriogenology* 81: 347–357
229. Lalman D.L., Williams J.E., Hess B.W., Thomas M.G. and Keisler D.H. **2000**. Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. *J Anim Sci* 78 (3), 530-538.
230. Lammers B.P., Heinrichs A.J., Kensinger R.S. **1999**. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on growth, feed efficiency, and blood parameters. *J Dairy Sci* 1999;82:1746–52.
231. Landa, S., Braw-Tal R., Kaim, M., Bor, A., Bruckental, I. **2000**. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 64, 181–197.

232. Laranja da Fonseca I L.F.; Mazza Rodrigues P.H.; Veiga dos Santos M., Pinto Lima A., de Sousa Lucci. **2004**. Supplementation of dairy cows with propylene glycol during the periparturient period: effects on body condition score, milk yield, first estrus post-partum,  $\beta$ -hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids and glucose concentrations *Cienc. Rural* vol.34 no.3 Santa Maria .
233. Leiva T., Cooke R.F., Aboin A.C., Soares H.F., Barbosa M., Madureira A.M.L, Borges M.A.F., Vasconcelos J.L.M. **2013**. Effects of propiogenic ingredients on serum concentration of insulin and progesterone in non-lactating cows. *Livestock Science* 153:165–172
234. Lemley C.O., Butler S.T., Butler W.R., Wilson M.E. **2008**. Short communication: insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P4502C and 3A in dairy cows. *J.DairySci.* 91,641–645.
235. Leng S. L., Leeding K. S., Whitehead R. H., Bach L.A. **2001**. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced but not basal proliferation and adhesion of LIM 1215 colon cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 174(1-2): 121-127.
236. Leroy J. L M.R., Vanholder T., Opsomer G., Van soom A., and de Kruif A. **2006**. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and beta-hydroxybutyrate concentrations association with negative energy balance in dairy cows. *Repro. Domest . Anim* 41, 119-123.
237. Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., Dewulf J. and de Kruif A. **2004a**. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 62 (6), 1131-1143.
238. Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E. and de Kruif A. **2004b**. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 80 (3-4), 201-211.
239. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruif, G., Genicot, G., and Van Soom, A. **2005**. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130, 485–495.
240. Leroy, J. L., Van Soom A., Opsomer G, Goovaerts I. G. and Bols P. E. **2008b**. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim* 43(5): 623-632.
241. Leroy, J. L., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I. G. and Bols P. E.. **2008a**. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 43(5):612-22
242. Letelier C., Mallo F., Encinas T., Ros J. M., and Gonzalez-Bulnes, A. **2008**. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction* 136, 65–72.
243. Lien, T. F., Chang L. B., Hong Y. M, and Wu C. P.. **2010**. Effects of propylene glycol on milk production, serum metabolites, and reproductive performance during the transition period of dairy cows. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 23:372–378.
244. Llewellyn, S., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Murphy, J.J., Scaramuzzi, R.J., Wathes, D.C. **2007**. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system

- in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *Reproduction* 133, 627–639.
245. Lonergan P, Forde N. **2014**. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal* 8 Suppl 1:64-9
  246. Lonergan P., Carolan C., Van Langendonck A., Donnay I., Khatir H., Mermillod P., **1996**. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 54, 1420–1429.
  247. Lonergan P., Fair, T.; Corcoran D., Evans, A.C.O. **2006**. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, v.65, p.137-152.
  248. Lonergan P., Khatir H., Piumi F., Rieger D., Humblot P. and Boland M. P. **1999**. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117, 159–167.
  249. Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M.P., Gordon I. **1994**. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*, 37:48-53.
  250. Lorenzo P.L., Illera M.J., Illera J.C., Illera M. **1995**. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology* 44 109–118.
  251. Loureiro B. Oliveira L.J., Favoreto M.G., Hansen P.J. **2011**. Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Am J Reprod Immunol.* 65(6):578-88.
  252. Lowman, B. G., Scott N., and Somerville S. **1973**. Condition scoring of cattle. East of Scotland College of Agriculture, Bulletin No. 6, Edinburgh, UK.
  253. Lozano J. M., Lonergan P., Boland M. P., and O’Callaghan D. **2003**. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programs in ewes: Effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 125:543–553.
  254. Lucy M. C. **2003**. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction* 61: 415-427.
  255. Lucy M.C, Escalante R. C., Keisler D. H., Lamberson W. R, and Mathew D. J. **2013**. Short communication: Glucose infusion into early postpartum cows defines an upper physiological set point for blood glucose and causes rapid and reversible changes in blood hormones and metabolites *J. Dairy Sci.* 96 :5762–5768.
  256. Lucy M.C. **2000**. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci* 83:1635–47.
  257. Lucy M.C., Bilby C.R., Kirby C.J., Yuan W and Boyd C.K. **1999**. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal of Reproduction and Fertility* 54 (Suppl) 49–59.
  258. Luna-Pinto G, Cronjé P.B. **2000**. The roles of the insulin-like growth factor system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and compensatory growth in dairy heifers. *S Afr J Anim Sci* 30:155–63.
  259. Lussier J.G., Matton P, and Dufour J.J. **1987**. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 301-307.
  260. Macdonald K.A., Penno J.W., Bryant A.M., Roche J.R. **2005**. Effect of feeding level pre- and post-puberty and body weight at first calving on growth, milk production, and fertility in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 88:3363–75.
  261. Maciel M.N., Zieba D.A, Amstalden M., Keisler D.H., Neves J.P., Williams G.L. **2004**. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *J Anim Sci.* 82: 2930–6.

262. Mackey D.R., Sreenan J.M., Roche J.F., Diskin M.G. **1999**. Effect of Acute Nutritional Restriction on Incidence of Anovulation and Periovarian Estradiol and Gonadotropin Concentrations in Beef Heifers. *Biol Reprod* 61 (6), 1601-1607.
263. Mackey D.R., Wylie A.R., Sreenan J.M., Roche J.F., Diskin M.G. **2000**. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. *J Anim Sci.* 78(2):429-42
264. Makarevich A.V., Markkula M. **2002**. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biology of Reproduction* 66(2): 386-392.
265. Mann G.E., Green M.P., Sinclair K.D., Demmers K.J., Fray M.D., Gutierrez C.G., Garnsworthy P.C., Webb R. **2003**. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Animal Reproduction Science* 79 (2003) 71-79.
266. Mantovani R., Enright W.J., Keane M.G., Roche J.F., Boland MP. **1993**. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *Proceedings of 9th Scientific Meeting Embryo Transfer Association (AETE)*, pp. 234.
267. Maplesden, D.C. **1954**. Propylene glycol in the treatment of ketosis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 18, 287–293.
268. Mapletoft, R. J., and Hasler, J. F. **2005**. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech.* 24, 393–403.
269. Marchal R., Vigneron C., Perreau C., Bali-Papp A., and Mermillod P. **2002**. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 57:1523–1532.
270. Marquant-Le Guienne B., Gérard M., Solari A., and Thibault C. **1989**. In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 29:559–568.
271. Martin O., Friggens N. C, Dupont J., Salvetti P., Freret S., Rame C., Elis S., Gatién J., Disenhaus C. and Blanc F. **2013**. Data-derived reference profiles with corepresentation of progesterone, estradiol, LH, and FSH dynamics during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 79(2): 331-343.
272. Martins A.C., Ramos A.F., Mollo M.R., Pivato I., Camara J.U., Carrijo L.H.D., Driessen K., Rumpf R., Sartori R. **2006**. Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na produção in vitro de embriões bovinos. *Acta Sci Vet*, 34 (suppl. 1):290. (abstract). *Reprod Fertil*, 54:317-328
273. Matoba S., Bender K., Fahey A.G., Mamo S., Brennan L., Lonergan P., Fair T. **2014**. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Reprod Fertil Dev.* 26(2):337-45.
274. Matoba S., O'Hara L., Carter F., Kell, A.K., Fair T., Rizos D., Lonergan P. **2012**. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1257–1266.
275. Matoba S. **2012**. Studies of oocyte developmental competence in cattle. PhD Thesis. National University of Ireland.
276. Matoba S., Yoshioka H., Matsuda H., Sugimura S., Aikawa Y., Ohtake M., Hashiyada Y., Seta T., Nakagawa K., Lonergan P. and Imai K. **2013**. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm *J. Dairy Sci.* 97 :1–11
277. Matras J., Klebaniuk R., Kowalczyk-Vasilev E. **2012**. Impact of glucogenic additive in transition dairy cow diets of varying ruminal starch degradability on yield and composition of milk and reproductive parameters *Czech J. Anim. Sci.*, 57, (7): 301–311

278. Mazerbourg S., Bondy C. A., Zhou J., and Monget, P. **2003**. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 247–258.
279. Mc Ardle C.A., Holtorf A.P. **1989**. Oxitocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture : effects of insulin-like growth factor I, insulin and prostaglandins. *Endocrinology.* 124(3):1278-86.
280. McArt J. A. A., Nydam D. V. and Oetzel G. R.. **2012**. A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis *J. Dairy Sci.* 95 :2505–2512
281. McGee E.A. and Hsueh A.J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21 200–214.
282. McNatty K.P., Smith D.M., Makris A., Osathanondh R., Ryan K.J., **1978**. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in the antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 851–860.
283. Mermillod P. and Marchal R. **1999**. La maturation de l'ovocyte de mammifères. *Médecine-sciences.* 15 : 148-56
284. Mermillod P., Dalbiès-Tran R., Uzbekova S., Thélie A., Traverso J.-M., Perreau C., Papillier P. and Monget P. **2008**. Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle? *Monget Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 2), 393–400.
285. Mermillod P., Locatelli Y., Dalbiès-Tran R., Uzbekova S., Baril G., Guignot F., Perreau C., Poulin N., Touzé J. L., Penner S., Schmaltz B., and Cognié Y. **2006**. In vitro production of ruminant embryos: Results, limits and perspectives. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.), November 7-10
286. Mermillod P., Oussaid B., Cognie Y. **1999**. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 54:449-460.
287. Merton J.S., Knijn H.M. , Flapper H., Dotinga F. , Roelen B.A.J. , Vos P.L.A.M. , Mullaart E. **2013**. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics *Theriogenology* 80: 365–371
288. Merton J.S., Vermeulen Z.L., Otter T., Mullaart E., de Ruigh L., Hasler J.F. **2007**. Carbon-activated gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate following transfer of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 67, 1233–1238.
289. Metcalf J.A., Weekes T.E.C. **1990**. Effect of plane of nutrition on insulin sensitivity during lactation. *J Dairy Research.* 1990, 57, 465-478.
290. Mialot J.P., Constant F., Chastant-Maillard S., Ponter A.A., Grimard B. **2001**. La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications - Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie, Paris, Novembre 2001 : 163-168
291. Mihm M., Evans A.C. **2008**. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Domest Anim.* 2008 Jul;43 Suppl 2:48-56.
292. Miyoshi S., Pate J.L. and Palmquist D.L. **2001**. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal reproduction Science* 68 (1-2) 29-43.

293. Moallem U., Katz M., Lehrer H., Livshitz L., Yakoby S. **2007**. Role of peripartum dietary propylene glycol or protected fats on metabolism and early postpartum ovarian follicles. *J Dairy Sci* 90, 1243–1254
294. Mollo M.R., Rumpf R., Martins A.C., Carrijo L.H.D., Saueressig M.G., Sartori R. **2007**. Embryo production in superovulated Nelore heifers under low or high feed intake (abstract). *Acta Sci Vet* 35(Suppl 3):1241.
295. Monget P. **2004**. Fonctions hypothalamo-hypophysaire et ovarienne et fertilité. Journée de l'action transversale INRA Fécondité des vaches laitières, Nouzilly, France.
296. Monget P. and Bondy C. **2000**. Importance of the IGF system in early folliculogenesis *Molecular and Cellular Endocrinology* 163:89–93
297. Monget P., and Monniaux D. **1995**. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49, 321–333.
298. Monget P., Besnard N., Huet C., Pisselet C. and Monniaux D. **1996**. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculo- genesis. *Hormone Research* 45 211–217.
299. Monget P., Fabre S., Mulsant P., Lecerf F., Elsen J.M., Mazerbourg S., Pisselet C., Monniaux D. **2002**. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 23 139–154.
300. Monget P., Monniaux D., Pisselet C. and Durand P. **1993**. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology* 132 1438–1446.
301. Monniaux D., Drouilhet L., Rico C., Estienne A., Jarrier P., Touzé J.L., Sapa J, Phocas F., Dupont J., Dalbies-Tran R., Fabre S. **2013**. Regulation of anti- Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev* 25:1–16.
302. Monniaux D., Drouilhet L., Rico C., Estienne A., Jarrier P., Touzé J.L., Sapa J., Phocas F., Dupont J., Dalbiès-Tran R., Fabre S. **2012**. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals *Danielle Reprod Fertil Dev.* 2012;25(1):1-16.
303. Monniaux D., Huet C., Besnard N., Clément F., Bosc M., Pisselet C., Monget P. and Mariana J.C. **1997**. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals *Journal of reproduction and Fertility Supplement* 51 3-23.
304. Monniaux D., Mandon-Pepin B., Monget P. **1999**. Follicular atresia, a programmed wastage. *Med. Sci. (Paris)*, 15, 157-166.
305. Monniaux D., Pisselet C. and Fontaine J. **1994**. Uncoupling between proliferation and differentiation of ovine granulosa cells in vitro. *Journal of Endocrinology* 142 497–510.
306. Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., and Larroque, H. **2010**. Anti-Mu'llerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1083–1091
307. Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbies-Trans, R., Dupont, J., Fabre, S., Gerard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S. **2009**. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra Prod. Anim* 22, 59-76.
308. Monniaux, D., Chupin, D., and Saumande, J. **1983**. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19, 55–81.
309. Monniaux, D., di Clemente, N., Touzé, J.L., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., Picard, J.Y., Fabre, S., **2008**. Intrafollicular steroids and anti-Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 79, 387–396.

310. Moriel, P., Scatena, T.S., Sa Filho, O.G., Cooke, R.F., Vasconcelos, J.L.M. **2008**. Concentrations of progesterone and insulin in serum of nonlactating dairy cows in response to carbohydrate source and processing. *J. Dairy Sci.* 91, 4616–4621.
311. Mossa F., Walsh S.W., Butler S.T., Berry D.P., Carter F., Lonergan P., Smith G.W., Ireland J.J., Evans A.C. **2012**. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:2355-2361.
312. Mulvaney P. **1977**. Dairy cow condition scoring. Handout No. 4468. National Institute for Research in Dairying. Reading, UK.
313. Munoz-Gutierrez M., Blache D., Martin G.B. and Scaramuzzi R.J. **2002**. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 124 721–731.
314. Munoz-Gutierrez M., Blache D., Martin G.B. and Scaramuzzi R.J. **2004**. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction* 128 747–756.
315. Murray J. A. **1919**. Meat production. *J. Agric. Sci.* 9:174–181.
316. Murray M., **1991**. Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism inmalesheep liver. Quantitative importance of 6 $\beta$  hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIA subfamily in the pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 611–619.
317. Myers M.G. Jr., and White M.F. **1996**. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:615–658.
318. Nakada K. **2006**. How to improve reproductive efficacy from now in Japan? Find out the factors of late lactation to predict postpartum reproductive diseases. *J Reprod Dev* 52:177–83.
319. Nedambale T.L., Dinnyes A., Groen W., Dobrinsky J.R., Tian X.C., Yang X. **2004**. Comparisononin vitrofertilizedbovineembryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slowfreezing or vitrification. *Theriogenology* 62, 437–449.
320. Nielsen N. I. and Ingvarsen K.L. **2004**. Propylene glycol for dairy cows A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology*. 115,191-213.
321. Nilsson E., Rogers N., Skinner M.K. **2007**. Actions of anti-mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 134, 209–221.
322. Nishimoto H., Matsutani R., Yamamoto S., Takahashi T., Hayashi K.G., Miyamoto A., Hamano S., Tetsuka M. **2006**. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 188, 111– 119.
323. Nivet A.L., Bunel A., Labrecque R., Belanger J., Vigneault C., Blondin P., Sirard M.A. **2012**. FSH, withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 143, 165–171.
324. Nolan R., O'Callaghan D., Duby R.T., Lonergan P. and Boland M.P. **1998**. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50 (8), 1263-1274.
325. Nuttinck F., Charpigny G., Mermillod P., Loosfelt H., Meduri G., Freret S., Grimard B. and Heyman Y. **2004**. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domestic Animal Endocrinology* 27, 179–195.

326. O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ & Boland MP. **2000**. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 118 (2), 303-313.
327. Ohkura S., Tanaka T., Nagatani S., Bucholtz D. C., Tsukamura H., Maeda K., and Foster D. L. **2000**. Central, but not peripheral, glucose-sensing mechanisms mediate glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the sheep. *Endocrinology* 141:4472–4480.
328. Oliviera A.T.D., Lopes R.F.F., Rodriguez J.L. **2005**. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1559-1572.
329. Opsomer, G., Gröhn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H. & Kruif, A.d. **2000**. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology* 53, 841-857.
330. Oropeza A, C. Wrenzycki, D. Herrmann, K.-G. Haderler, and H. Niemann. **2004**. Improvement of the Developmental Capacity of Oocytes from Prepubertal Cattle by Intraovarian Insulin-Like Growth Factor-I Application *Biology of Reproduction* 70, 1634–1643.
331. Orsi N.M., Gopichandran N., Leese H.J., Picton H.M. and Harris S.E. **2005**. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reprod* 129 (2), 219-228.
332. Owens, F. N., Secrist D. S., Hill W. J, and Gill D. R.. **1998**. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:275–286.
333. Palma G.A., Argañaraz M.E., Barrera A.D., Rodler D., Mutto A.Á., Sinowatz F. **2012**. Biology and Biotechnology of Follicle Development. *ScientificWorldJournal*. 938138.
334. Pantaleon M., Ryan J.P., Gil M., Kaye P.L. **2001**. An Unusual Subcellular Localization of GLUT1 and Link with Metabolism in Oocytes and Preimplantation Mouse Embryos *Biol Reprod.* Apr;64(4):1247-54.
335. Papadopoulos S., Lonergan P., Gath V., Quinn K. M., Evans A. C. O., O'Callaghan, D., and Bolan, M. P. **2001**. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology* 55 1059-1069.
336. Parrish J.J. **1986**. Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H. and First N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen–thawed semen. *Theriogenology* 25 591–600.
337. Parrish J.J. **2014**. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin *Theriogenology* 81: 67–73
338. Parrott J.A., Skinner M.K. **1999**. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140, 4262– 4271.
339. Pawson A.J. and McNeilly A.S. **2005**. The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science* 88, 75–94.
340. Pedersen P.L. **1994**. ATP synthase: the machine that makes ATP. *Current Biology* 4 1138–1141.
341. Pennetier S., Uzbekova S., Guyader-Joly C., Humblot P., Mermillod P. and Dalbies-Tran R. **2005**. Genes preferentially expressed in bovine oocytes revealed by subtractive and suppressive hybridization. *Biol Reprod* 73 (4), 713-720.
342. Pfaffl M., Schwarz F., Sauerwein H. **1998**. Quantification of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA: modulation of growth intensity by feeding results in inter- and intra-tissue-specific differences of IGF-1 mRNA expression in steers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:514–21.

343. Picard-Hagen N., Gayrard V., Berthelot X. **2008**. La physiologie ovarienne chez la vache : nouveautés et applications. Proc. : Journées Nationales GTV – Nantes 2008. p43-54.
344. Picard-Hagen N., Gayrard V., Berthelot X., Humblot P. **2001**. Physiologie du développement embryonnaire chez les ruminants. Application au diagnostic de mortalité embryonnaire. Proc : A.E.R.A. 6-21
345. Pisani L.F., Antonini S., Pocar P., Ferrari S., Brevini T.A., Rhind S.M. and Gandolfi F. **2008**. Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *Reproduction* 136 303–312.
346. Poll C. **2007**. La mortalité embryonnaire chez les bovins. Thèse de Doctorat Vétérinaire (Lyon). L-2007-077. 104 p.
347. Ponsart C. **2003**. Le cycle fait des vagues. *BTIA*, 23-25.
348. Ponsart C., Le Bourhis D., Knijn H., Fritz S., Guyader-Joly C., Otter T., Lacaze S., Charreaux F., Schibler L., Dupassieux D. and Mullaart E. **2014**. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle *Reproduction, Fertility and Development*. 26: 12–21
349. Ponsart C., Marquant-Leguienne B., Humblot P. **2004**. Les biotechnologies de l’embryon bovin, évolution et perspectives *Renc. Rech. Ruminants*, 11.
350. Ponsart C., Pozzi N. **2013**. Sanitary requirements for bovine gametes and embryos in international trade *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p.283-296.
351. Pontes J.H.F., Silvaa K.C.F., Bassob A.C., Rigob A.G., Ferreirab C.R. , Santosa G.M.G., Sanches B.V, Porcionato J.P.F., Vieira P.H.S., Faifer F.S., Sterzaa F.A.M., Schenk J.L., Seneda M.M. **2010**. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm *Theriogenology* 74: 1349–1355
352. Pontes J.H.F., Melo Sterza F.A, Basso A.C., Ferreira C.R., Sanches B.V., Rubin K.C.P., Seneda M.M. **2011**. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors *Theriogenology* 75: 1640–1646
353. Poretsky L. and Kalin M.F. **1987**. The gonadotropic function of insulin. *Endocrine Review* 8, 132–141.
354. Poretsky L., Smith D., Seibe, M., Pazianos A., Moses A.C., Flier J.S. **1984**. Specific insulin binding sites in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 809–811.
355. Portesky L., Kalin M.F. **1987**. The gonadotropic function of insulin. *Endocrin. Rev.* 8, 132–141.
356. Prata A.B., Surjus R.S., Borsato M., Mattos M.C.C., Basso A., Pontes J.H., Mourão G.B., Sartori R. **2011**. Influência da alta ou baixa ingestão de matéria seca e/ou energia na produção in vitro de embriões bovinos. *Acta Sci Vet*, 39(suppl. 1):338. (abstract).
357. Rabinovici J., Spencer S. and Jaffe R. **1990**. Recombinant human activin-A *Reviews of Reproduction Molecular Endocrinology Eds E Knobil, and Biology of Reproduction* JD Neill. Raven Press Ltd, New York
358. Rehman N., Collins A.R., Suh T.K., Wright Jr R.W. **1994**. Development of IVM-IVF produced 8-cell bovine embryos in simple, serum- free media after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells. *Mol Reprod Dev* 38:251–5.
359. Rhind S.M. et McNeilly A.S. **1998**. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Anim Reprod Sci* 52 (2), 131-138.
360. Rhoads R. P., Kim J. W., Leury B. J., Baumgard L. H., Segole N., Frank S. J., Bauman D. E. and Y. R. Boisclair. **2004**. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *The Journal of nutrition* 134(5): 1020-1027.

361. Richards M. W., Wettemann R. P., Spicer L. J., and Morgan G. L. **1991**. Nutritional anestrus in beef cows: Effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. *Biol. Reprod.* 961–966.
362. Rico C., Drouilhet L., Salvetti P., Dalbiès-Tran R., Jarrier P., Touzé J.L., Pillet E., Ponsart C., Fabre S., Monniaux D. **2012**. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev*, 24:932-944.
363. Rico C., Fabre S., Médigue C., di Clemente N., Clément F., Touze J., Dupont M., Briant E., Remy E., Beckers J.F., Monniaux D. **2009**. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict super-ovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59.
364. Rizos D., Burke L., Duffy P., Wade M., Mee J. F., O'Farrell K. J., MacSiurtain M., Boland M. P., and Lonergan P. **2005**. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology* 63:939–949.
365. Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Pérez-Garnelo S., De La Fuente J., Boland M.P., Lonergan P. **2003**. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, v.68, p.236-243, 2003.
366. Rizos D., Kenny D.A., Griffin W., Quinn K.M., Duffy P., Mulligan F.J., Roche J.F., Boland M.P., Lonergan P. **2008**. The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility *Theriogenology* 69, 688-699.
367. Rizos D., Lonergan P., Boland M.P., Arroyo-García R., Pintado B., de la Fuente J., Gutiérrez-Adán A. **2002b** Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocystis quality. *Biol. Reprod.*, v.66, p.589-595, 2002b.
368. Rizos, D., Ward F., Duffy P., Boland M. P., and Lonergan P. **2002a**. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61:234–248.
369. Roberts A.J., Klindt J., Jenkins T.G. **2005**. Effects of varying energy intake and sire breed on duration of postpartum anestrus, insulin like growth factor-1, and growth hormone in mature crossbred cows. *J Anim Sci* 2005;83:1705–14.
370. Roche J. R., Friggens N. C., Kay J. K., Fisher M. W., Stafford K. J., and Berry D. P. **2009**. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci.* 92:5769-5801.
371. Roche J. R., Dillon P. G., Stockdale C. R., Baumgard L. H. and VanBaale M. J. **2004**. Relationships among international body condition scoring systems. *J. Dairy Sci.* 87:3076–3079.
372. Rodriguez KF, and Farin C.E. **2004**. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *Theriogenology* 61, 1499-1511.
373. Roelofs J.B., van Eerdenburgb F.J.C.M., Soedea N.M., and Kempa B. **2007**. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Therio.* 64: 1690-1703.
374. Roth Z., Inbar G., Arav A. **2008**. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. *Theriogenology* 69: 932–939
375. Roy, S. K., and Greenwald, G. S. **1991**. In vitro effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor and follicle- stimulating hormone

- on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 44, 889–896.
376. Rozner A., Verstegen J. **2012**. Relationship between serum anti- Mullerian hormone (AMH), ovarian reserve, and embryo production in superovulated Holstein cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 304. (304).
377. Saltiel A. R., and Kahn C. R.. **2001**. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.
378. Samoto T., Maruo T., Ladines-Llave C.A., Matsuo H., Deguchi J., Barnea E.R., Mochizuki M. **1993**. Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endocrine Journal* 40, 715– 726.
379. Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R., Wiltbank M.C. **2002**. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17b in dairy cattle. *J.DairySci.* 85,2831–2842
380. Sano H., Nakai M., Kondo T., and Terashima Y. **1991**. Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin in lactating, pregnant, and nonpregnant, nonlactating beef cows. *J. Anim. Sci.* 69:1122-1127.
381. Santos J., Cerri L., and Sartori R. **2008**. Nutritional management of the donor cow *Theriogenology* 69, 88-97
382. Sartori R., Bastos M.R., Baruselli P.S., Gimenes L.U, Ereno R.L., Barros C.M. **2010**. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. In: Lucy MC, Pate JL, Smith MF, Spencer TE (Org.). *Reproduction in Domestic Ruminants VII*. Nottingham, UK: Nottingham University Press. v.1, pp. 357-375.
383. Sauer F.D., Erfle J.D., Fisher L.J. **1973**. Propylene glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: an evaluation of blood metabolite parameters. *Can. J. Anim. Sci.* 53, 265–271.
384. Scaramuzzi R. J., Campbell B. K., Downing J. A., Kendall N. R., Khalid M., Muñoz-Gutiérrez, M., and Somchit, A. **2006**. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 339–354.
385. Scheetz D., Folger J. K. Smith G.W and James J. Ireland. **2012**. Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 327–336
386. Schillo K.K., Hall J.B., Hileman S.M. **1992**. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci* 70:3994–4005.
387. Seidel G.E. Jr. **2014**. Update on sexed semen technology in cattle *Animal*. 8:s1, pp 160–164.
388. Shimizu T., Murayama C., Sudo N., Kawashima C., Tetsuka M. and Miyamoto A. **2008**. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Animal Reproduction Science* 106, 143–152.
389. Shingfield K.J., Jaakkola S., Huhtanen P. **2002**. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on diet digestibility, rumen fermentation, blood metabolite concentrations and nutrient utilisation of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97, 1-21.
390. Shingu H., Hodate K., Kushibiki S., Ueda Y., Watanabe. A., Shinoda M., Matsumoto M. **2002**. Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type). *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 493–504.

391. Silva J.R., Figueiredo J.R., van den H.R. **2009**. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71, 1193–1208.
392. Silva-Santos K.C., Santos G.M.G., Koetz Júnior C., Morotti F., Siloto L.S., Marcantonio T.N., Urbano M.R., Oliveira R.L., Lima D.C.M., Seneda M.M. **2014**. Antral follicle populations and embryo production – in vitro and in vivo – of bos indicus–taurus donors from weaning to yearling ages. *Reproduction in Domestic Animals* 49:228-232
393. Sinclair K.D., Rooke J.A., McEvoy T.G. **2003**. Regulation of nutrient uptake and metabolism in pre-elongation ruminant embryos. *Reprod Suppl* 61, 371-385.
394. Sinclair, K.D., Revilla, R., Roche, J.F., Quintans, G., Sanz, A., Mackey, D.R., Diskin, M.G. **2002**. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. *J. Anim. Sci.* 75, 115–126.
395. Sirard M.A., Dufort I., Coenen K., Tremblay K., Massicotte L., Robert C. **2003**. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl* 61:117-129.
396. Sirard M.A., Richard F., Blondin P., Robert C. **2006**. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65:126-136.
397. Sirard, M. A., and Blondin, P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 417–426.
398. Sirard, M. A. **2001**. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55, 1241-1254.
399. Slobodanka, V., Dražić, M., Pavlović, V., Gvozdić, D., Jovičin, M., Dukić, M., Stepanović, P. **2012**. Propylene glycol energy supplementation during peripartal period in dairy cows and reproduction efficiency parameters. *Acta Veterinaria*, 62 (2-3), pp. 249-260.
400. Smith G., Takayama S. and Swain J. E. **2012**. Rethinking In Vitro Embryo Culture: New Developments in Culture Platforms and Potential to Improve Assisted Reproductive Technologies *Biology of reproduction*. 86(3):62, 1–10
401. Snijders S.E., Dillon P., O’Callaghan D., Boland M.P. **2000**. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53, 981–989.
402. Souza A.L., Galeati G., Almeida A.P., Arruda I.J., Govoni N., Freitas V.J., Rondina D. **2008**. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation *Reproduction Domestic Animals* 43 (2) 218 - 221.
403. Spicer J.L., Echterkamp S.E., Wong E.A., Hammilton D.T. and Vernon R.K. **1995** Serum hormones, follicular fluid steroid, insulin-like growth factors and their binding protein, and ovarian IGF mRNA in sheep with different ovulation rate. *Journal of Animal Science* 73 1152–1163.
404. Spicer L. J., and Echterkamp S. E. **1995**. The ovarian insulin and insulin- like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12:223-245.
405. Spicer L. J., Chamberlain C. S., and Francisco, C. C. **2000a**. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine* 12, 53–59.
406. Spicer L. J., Tucker W.B., and D.Adams G. **1990**. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: Relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *J. Dairy Sci.* 73:929–937.

407. Spicer L.J., Alpizar E. and Echternkamp S.E. **1993**. Effects of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production and(or) IGF-I production in vitro. *Journal of Animal Science* 71 1232–1241
408. Spicer L.J., Alpizar E. and Vernon R.K. **1994**. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effect of follicle size and hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 102, 69–76.
409. Spicer L.J., Alvarez P., Prado T.M., Morgan G.L., Hamilton T.D. **2000b**. Effects of intraovarian infusion of insulin-like growth factor-I on ovarian follicular function in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 18 265–278.
410. Spicer L.J., Chase Jr. C.C., Rutter L.M. **2002**. Relationship between serum insulin-like growth factor-I and genotype during the postpartum interval in beef cows. *J Anim Sci.* 80: 716–22.
411. Spicer L.J., Crowe M.A., Prendiville D.J., Goulding D., Enright W.J. **1992**. Systemic but not intraovarian concentrations of insulin-like growth factor-I are affected by short-term fasting. *Biol Reprod* 46:920–5.
412. Spicer L.J., Enright W.J., Murphy M.G., Roche J.F. **1991**. Effect of dietary intake on concentrations of insulin-like growth factor-I in plasma and follicular fluid, and ovarian function in heifers. *Domest Anim Endocrinol*;8:431–7.
413. Ster C., Loiselle M.-C., and Lacasse P. **2012**. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy Sci.* 95:708–717.
414. Sternbauer K. and J. Luthman Insulin. **2002**. Sensitivity of Heifers on Different Diets *Acta vet. scand.* 43, 107-114
415. Stewart R.E., Spicer L.J., Hamilton T.D. and Keefer B.E. **1995**. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *Journal of Animal Science* 73, 3719–3731.
416. Stewart R.E., Spicer L.J., Hamilton T.D., Keefer B.E., Dawson L.J., Morgan G.L. and Echternkamp S.E. **1996**. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinology* 137 2842–2850.
417. Stroud B. **2012**. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter A Publication of the International Embryo Transfer Society* 30:16–26.
418. Studer V.A., Grummer R.R., Bertics S.J., Reynolds C.K. **1993**. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 2931–2939.
419. Suarez S. **2003**. Transport of spermatozoa in the female genital tract. In: Tulsiani D (ed.), *Introduction to Mammalian Reproduction*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dor- trecht, London, pp. 187–202.
420. Sudo N., Shimizu T., Kawashima C., Kaneko E., Tetsuka M., Miyamoto A. **2007**. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol. Cell. Endocrinol.* 264, 197–203.
421. Suguna K., Mehrotra S., Agarwal S.K., Hoque M., Shanker U., Singh S.K., Varshney V.P. **2009**. Effect of exogenous insulin administration on ovarian function,

- embryo/fetal development during pregnancy in goats. *Animal Reproduction Science*. 111 202-213
422. Sunahara K., Sannomiya K., P., and Martins J. O. **2012**. Briefs on insulin and innate immune response. *Cell. Physiol. Biochem*. 29:1–8.
423. Surjus R.S., Prata A.B., Borsato M., Martins da Silveira M.C., Mattos M.C.C., Mattos F.C.S.Z., Monteiro Jr P.L.G., Mourao G.B., Santos F.A.P., Sartori R. **2012**. Influence of high or low intake of dry matter and energy on in vivo production of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*, 24:227.
424. Suthar V.S. and Shah R. G. **2009**. Bovine In vitro Embryo Production : An Overview *Veterinary World*, Vol.2(12):478-479
425. Sutton-McDowall M.L, Gilchrist R.B., Thompson J.G. **2003**. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 9, 35–48.
426. Sutton-McDowall M.L., Yelland R., MacMillan K.L., Robker R.L., Thompson J.G... **2014**. A study relating the composition of follicular fluid and blood plasma from individual Holstein dairy cows to the in vitro developmental competence of pooled abattoir-derived oocytes. *Theriogenology*. 2014 Jul 1;82(1):95-103
427. Swali A., and Wathes D. C. **2006**. Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. *Theriogenology* 66, 1173–1184.
428. Takedomi T, Kaneko H, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Watanabe G, Taya K. **1997**. Effects of passive immunization against inhibin on ovulation rate and embryo recovery in Holstein heifers. *Theriogenology*; 47:1507–18.
429. Tanaka T., Nagatani S., Bucholtz D.C., Ohkura S., Tsukamura H., Maeda K. and Foster D.L. **2000**. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biology of Reproduction* 62, 1256–1261
430. Taylor V.J., Cheng Z., Pushpakumara P.G., Beever D.E., Wathes D.C.. **2004**. Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-1 in dairy cows and their fertility and milk yield. *Vet Rec*.155:583–8.
431. Taylor V.J.. **2001**. The growth hormone (GH) and insulin like growth factor (IGF) axis in relation to fertility in high yielding dairy cows. PhD thesis. UK: University of London.
432. Tedeschi L. O., Seo S., Fox D. G., and Ruiz R. **2006**. Accounting for energy and protein reserve changes in predicting diet-allowable milk production in cattle. *J. Dairy Sci*. 89:4795–4807.
433. Teixeira J., Maheswaran S., and Donahoe P. K. **2001**. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev*. 22, 657–674.
434. Tesarik J. and Mendoza C. **1997**. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism *Human Reproduction Update*. Vol. 3, No. 2 pp. 95–100
435. Thibault C. **2001**. La fécondation. In *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*, pp. 367-389. Eds C Thibault & MC Levasseur. Paris, France: INRA Editions - Ellipses.
436. Thompson J.G. **2000**. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos a decade of achievement. *Animal Reproduction Science* 60–61, 263–275.
437. Tokuhiko K., Ikawa M., Benham A.M. , Okabe M. **2012**. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility. *PNAS* 109 (10) 3850–3855.

438. Totey S. M., Pawshe C. H., Appa Rao K. B. C. **1996**. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and interaction with gonadotrophins. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 50, 113-119.
439. Touzard E., Reinaud P., Dubois O, Guyader-Joly C., Humblot P., Ponsart C., and Charpigny G. **2013**. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction* 146 347–362.
440. Trabue S., Scoggin K., Tjandrakusuma S., Rasmussen M. A. and Reilly P. J. **2007**. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7043-7051.
441. Umeki A., Tanaka T. and Kamomae H. **2012**. Effects of propylene glycol drenching before and after luteolysis on blood glucose, ovarian steroids and follicular dynamics in heifers *Animal .An International Journal of Animal Bioscience* 6:2, pp 300–304
442. UNCEIA Groupe Fertilité Femelle. **2013**. REPRO Guide. Ed UNCEIA. Paris, France: UNCEIA
443. van den Hurk R., Zhao J. **2005**. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-1751.
444. van Hoeck V., Sturmey R. G., Bermejo-Alvarez P., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Leese H. J., Bols P. E. J., and Leroy J. L. M. R.. **2011**. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS ONE* 6:e23183.
445. van Knegsel A. T. M., van den Brand H., Dijkstra J., Tamminga S., and Kemp B. **2005**. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 665–688.
446. van Rooij I.A., Broekmans F.J., te Velde E.R., Fauser B.C., Bancsi L.F., de Jong F.H., Themmen A.P.N. **2002**. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction* 17 3065–3071.
447. Vandehaar M. J., Sharma B. K., and Fogwell R. L. **1995**. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-I in liver and corpus luteum of heifers. *J. Dairy Sci.* 78:832–841.
448. Vanroose G., Van Soom A., de Kruif A. **2001**. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod Domest Anim* , 36:25-28
449. Velazquez M.A., Haderl K.G., Herrmann D., Kues W.A., Ulbrich S.E., Meyer H.H., Rémy B., Beckers J.F., Sauerwein H., Niemann H. **2011**. In vivo oocyte developmental competence is reduced in lean but not in obese superovulated dairy cows after intraovarian administration of IGF1. *Reproduction* (2011) 142 41–52
450. Velazquez. M. A., Spicer L. J., and Wathes D. C. **2008**. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35:325–342.
451. Villa-Godoy A., Hughes T.L., Emery R.S., Chaplin T.L., and Fogwell R.L. **1988**. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 71(4):1063-72.
452. Vizcarra J. A., Wettemann R. P., Spitzer J. C., and Morrison D. G. **1998**. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* 76:927–936.
453. Wakefield S. L., Lane M., Schulz S. J., Hebart M. L., Thompson J. G., Mitchell, M. **2008**. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294,

454. Walters A.H., Pryor A.W., Bailey T.L., Pearson R.E., Gwazdauskas F.C. **2002**. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. *J Dairy Sci* 85, 824–832.
455. Wang Y., Eleswarapu S., Beal W.E., Swecker W.S. Jr., Akers R.M., Jiang H. **2003**. Reduced serum insulin-like growth factor (IGF) I is associated with reduced liver IGF-I mRNA and liver growth hormone receptor mRNA in food-deprived cattle. *J Nutr* 133, 2555–2560.
456. Warram J.H., Rich S.S., Krolewski A.S. **1995**. Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In *Josh's Diabetes Mellitus*, ed. CR Kahn, GC Weir, pp. 24-56. Philadelphia: Lea & Febiger. 13th ed.
457. Warzych E., Cieslak A., Pawlak P., Renska N., Pers-Kamczyc E., Lechniak D. **2011**. Maternal nutrition affects the composition of follicular fluid and transcript content in gilt oocytes *Veterinarni Medicina*. 56, (4): 156–167
458. Warzych E., Cieslak A., Pawlak P., Renska N., Pers-Kamczyc E., Lechniak D. **2011**. Maternal nutrition affects the composition of follicular fluid and transcript content in gilt oocytes *Veterinarni Medicina*, 56, 4: 156–167
459. Wathes D. C., Cheng Z., Bourne N., Taylor V. J., Coffey M. P. and Brotherstone, S. **2007a**. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the interrelationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 203–225.
460. Wathes D.C., Andrew M. Clempson A and Geoff E. Pollott A. **2013**. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow *Reproduction, Fertility and Development*. 25, 48–61.
461. Wathes D.C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M.A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J.J. **2009**. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol Genomics*, 39:1-13.
462. Wathes, D.C., Bourne, N., Cheng, Z., Mann, G.E., Taylor, V.J., Coffey, M.P. **2007b**. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science* 90(3), 1310-1325.
463. Wattiaux M.A. **1999**. Dairy essentials. Ed M The Babcock Institute for International Dairy Research and Development (The University of Wisconsin. Madison, Wisconsin, USA.
464. Webb R., Nicholas B., Gong J.G., Campbell B.K., Gutierrez C.G., Garverick H.A., Armstrong DG. **2003**. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 61, 71-90.
465. Webb R., Garnsworthy P.C., Campbell B.K., Hunter M.G. **2007**. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology*. 1;68 Suppl 1:S22-9.
466. Webb, R., Garnsworthy, P.C., Gong, J.C., Robinson, R.S., Wathes, D.C. **1999**. Consequences for reproductive function of metabolic adaptation to load. In: *Metabolic Stress in Dairy Cows*. British Society of Animal Science, Occasional Publication No. 24.
467. Wildman E. E., Jones G. M., Wagner P. E., Boman R. L., Troutt Jr H. F. and Lesch T. N. **1982**. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495–501.
468. Willis D., and Franks S. **1995**. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3788–3790.

469. Willis D., Mason H., Gilling-Smith C., Franks S. **1996**. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 302–309.
470. Wiltbank M.C., Sartori R., Sangsritavong S., Lopez H., Haughian J.M., Fricke P.M., Gumen A. **2001**. Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84 (Suppl.), 32 (Abstract).
471. Wiltbank M.C., Gumen A. and Sartori R. **2002**. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57 21-52.
472. Wrenzycki C., De Sousa P., Overström E.W., Duby R.T., Herrmann D., Watson A.J., Niemann H., O'Callaghan D., Boland M.P. **2000**. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v.118, p.69-78,
473. Yambayamba E.S.K., Price M.A., Foxcroft G.R. **1996**. Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *J Anim Sci* 74:57–69.
474. Yelich J.V., Wettemann R.P., Marston T.T., Spicer L.J. **1996**. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domestic Animal Endocrinology* 13 325–338.
475. Ying S., Wang Z., Wang C., Nie H., He D., Jia R., Wu Y., Wan Y., Zhou Z., Yan Y., Zhang Y., Wang F. **2011**. Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase. *Reproduction*. 142(5):699-710
476. Yotov W.V., St-Arnaud R. **1993**. Cloning and functional expression analysis of the alpha subunit of mouse ATP synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191, 142–148.
477. Young, J.W. **1976**. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *Journal of Dairy Science*, 60, 1–15
478. Zamboni L. **1974**. Fine morphology of the follicle cell-oocyte association. *Biology of Reproduction* 10, 125–149.
479. Zaraza J., Oropeza A., Velazquez M.A., Korsawe K., Herrmann D., Carnwath J.W., Niemann H. **2010**. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. *Theriogenology* 74 75–89.
480. Zhao X., McBride B.W., Trouten-Radford L., Lissemore K. **1993**. Decreased insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor sites on circulating mononuclear cells from cows with persistent lymphocytosis. *J Recept Res* 13:1161–72.
481. Zhu L. H., Armentano L. E., Bremmer D. R., Grummer R. R., and Bertics S. J. **2000**. Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. *J. Dairy Sci.* 83:734-740.
482. Zuccotti M., Merico V., Cecconi S., Redi C.A., Garagna S. **2011**. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum Reprod Update* 17, 525–540.
483. Zulu V.C., Sawamukai Y., Nakada K., Kida K. and Moriyoshi M. **2002**. Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 879–885.

**1. Article au titre des collaborations scientifiques**

Ponsart C., **Gamarra G.** Lacaze S., Ponter A.A. 2014. Nutritional status of donor cows: insulin related strategies to enhance embryo development. Anim. Reprod., v.11, n.3, p.195-198.



## Nutritional status of donor cows: insulin related strategies to enhance embryo development

C. Ponsart<sup>1,2,6</sup>, G. Gamarra<sup>1,2</sup>, S. Lacaze<sup>3</sup>, A.A. Ponter<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>ANSES, Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup>UNCEIA, R&D, Paris, France.

<sup>3</sup>MIDATEST, Domaine de Sensacq, Denguin, France.

<sup>4</sup>Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR Maisons-Alfort, France

<sup>5</sup>INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France.

### Abstract

Nutritional and metabolic status of domestic ruminant females is linked with reproductive success. Diet can influence ovarian activity via effects at various levels of the hypothalamus-pituitary-ovarian axis. Changes in the plane of nutrition can affect follicular growth by inducing changes in plasma metabolites and metabolic hormones, such as insulin and IGF1. This paper will review different results from *in vivo* and *in vitro* feeding approaches describing a programmed sequence in circulating insulin concentrations. The stimulatory effect of insulin and IGF1 on follicle growth has been previously demonstrated, especially on small follicle growth prior to superovulation. Thus, *in vivo* feeding strategies have been recently tested to enhance embryo development. It has been shown that the interaction between the gonadotropin content of the superstimulatory preparation with the nutritional program of the donor cow needs to be considered when aiming to optimize the success of ovarian superstimulatory protocols. Moreover, some practical feeding strategies such as short term dietary propylene glycol could improve *in vitro* embryo production in superovulated growth-restricted heifers. To conclude, different diets or dietary supplements may improve fertility and embryo quality by inducing a programmed sequence in circulating insulin concentrations.

**Keywords:** bovine, feeding, *in vitro*, *in vivo*, metabolic status.

### Introduction

It has long been recognized that the nutritional and metabolic status of domestic ruminant females are associated with reproductive success, but the underlying mechanisms remain poorly understood (Gutierrez *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 2002b; Adamiak *et al.*, 2005). Several authors have proposed that metabolic signals, such as circulating concentrations of insulin, growth hormone (GH), leptin and the insulin-like growth factor system (IGF) interact at the central level to modulate the release of gonadotrophins (Garnsworthy *et al.*, 2008). The quality or competence of harvested oocytes appears to be the most important determinant of embryo yields

(Seneda *et al.*, 2001) and this depends on the physiological and reproductive status of the donor animal, which are influenced by age, health and nutrition (Majerus *et al.*, 1999; Armstrong, 2001; Boland *et al.*, 2001). When working with young healthy cattle, the variability in embryo development rates *in vitro* may be influenced by the diet of the donor prior to oocyte recovery (Boland *et al.*, 2001).

### Lessons from *in vitro* approaches

A large number of *in vitro* studies have demonstrated the direct action of metabolic factors on granulosa and theca cells (Webb *et al.*, 1999a, b; Lucy, 2000) and numerous experiments have also studied the direct effects of the diet on follicular variables following spontaneous or superovulation. *In vitro* studies have highlighted the fact that insulin and IGF1 are important mediators of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and embryonic development (Gong *et al.*, 1993).

### *In vivo* feeding strategies to enhance embryo development

Diet can influence ovarian activity via effects at various levels of the hypothalamus-pituitary-ovarian axis. Changes in the plane of nutrition can affect follicular growth (Gutierrez *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 2002a) by inducing changes in plasma metabolites and metabolic hormones, such as insulin and IGF1 (Armstrong *et al.*, 2001) and/or in hormones and growth factors in follicular fluid (Landau *et al.*, 2000; Matoba *et al.*, 2014). Diet can also affect oocyte morphology (O'Callaghan *et al.*, 2000), oocyte developmental capacity and embryo production.

It has been shown that over-feeding can be harmful for the developmental quality of oocytes and embryos produced *in vivo* and *in vitro* (Mantovani *et al.*, 1993; Papadopoulos *et al.*, 2001; Freret *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008).

In addition, restricted feeding can have a positive effect on oocyte quality (Lozano *et al.*, 2003) and the production of blastocysts *in vitro* (Armstrong *et al.*, 2001; Freret *et al.*, 2006). These results have been linked to the level of metabolites and hormones

<sup>6</sup>Corresponding author: claire.ponsart.vet@gmail.com

Received: July 14, 2014

Accepted: July 19, 2014



involved in the regulation of energy metabolism: in particular, an increase in the concentration of insulin and IGF1 is associated with high energy intake in dairy heifers (Freret *et al.*, 2006). Webb *et al.* (2004) reviewed the stimulatory effect of insulin and IGF1 on follicle growth and Freret *et al.* (2006) showed that an increase in insulin concentrations during a short time period has a positive effect on small follicle growth prior to superovulation.

However, in the heifer, it has been shown that feeding regimens which increase insulin (hyperinsulinaemia) negatively influence the quality of oocytes (Adamiak *et al.*, 2005; Freret *et al.*, 2006). These findings support the idea that it may be possible to modulate insulin concentrations transiently to improve reproductive success, i.e. increase insulin during the phase of follicle growth (Scaramuzzi *et al.*, 2006) and then return to pre-stimulated levels just before ovulation so as not to have a negative effect on oocyte quality. To further support this hypothesis, Garnsworthy *et al.* (2009) modified circulating insulin levels (high and low) in dairy cows post-partum via the diet. They showed that a diet causing high insulin concentrations between calving and the first post-partum rise in progesterone followed by a diet causing low insulin until 120 days post-partum improved pregnancy rate compared with the other sequences of dietary treatment to modify insulin (high-high, low-high and low-low). Two experiments were recently performed using a Latin square design with treatments arranged as a 2×2 factorial: feed restriction (FR; 25% reduction in dry matter intake) compared with ad libitum (AL) feeding, combined with high (H) *versus* low (L) LH in the last 4 injections of the superstimulatory protocol (Bender *et al.*, 2014). As expected, FR decreased circulating insulin concentrations (26.7 vs. 46.0 µIU/mL). Fertilization rates were higher for the AL-L (89.4%) and FR-H (80.1%) treatments compared with the AL-H (47.9%) and FR-L (59.9%) treatments. In addition, the number of degenerate embryos was decreased for AL-L (1.3) and FR-H (0.4) treatments compared with the AL-H (2.6) and FR-L (2.3) treatments. Thus, cows with either too low (FR-L) or too high (AL-H) insulin and LH stimulation had lower embryo production after superstimulation because of reduced fertilization rate and increased percentage of degenerate embryos. Therefore, the interaction between the gonadotropin content of the superstimulatory preparation with the nutritional program of the donor cow needs to be considered when aiming to optimize the success of ovarian superstimulatory protocols.

### Insulin related feeding strategies

Exogenous insulin administration increased the recruitment of follicles in response to gonadotropin in gilts (Cox *et al.*, 1987) and also rescues follicles from

atresia and therefore increases the number of ovulatory follicles (Matamoros *et al.*, 1991). The roles of the IGF system and insulin appear particularly critical. Increased energy decreases IGFBP2 and IGFBP4 expression in small follicles. IGFBP2 has been shown to inhibit the actions of IGF in different cell lines and is present at high concentrations during the post-partum period (McGuire *et al.*, 1995). Lowered IGFBP2 may in turn increase the bioavailability of systematically derived IGF1 and locally produced IGF2 in these follicles. On the contrary, in case of strong NEB, Wathes *et al.* (2008) have reported an increased expression of IGFBP2 in the liver whereas transcripts for IGFBP3 to 6 were down regulated. Together with the reduced IGF1 production, these changes are likely to lower IGF1 availability and receptivity for follicular cells leading to impaired follicular growth.

Other methods exist to modulate insulin secretion, for example the administration of dietary supplements which affect metabolism such as, propylene glycol (PG). PG, also known as 1,2-propanediol, is a 3-carbon compound (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) derived from propylene and has been used since the 1950's in the treatment of ketosis in post-partum dairy cattle (Maplesden, 1954). PG increases plasma glucose and insulin and decreases non esterified fatty acids (NEFA) and β-hydroxybutyrate (BHB). The latter two effects are seen in underfed animals (Nielsen and Ingvarsten, 2004). In a recent study on heifers we showed that short term dietary propylene glycol was associated with raised levels of glucose, insulin and stimulated follicle growth, causing an increase in the number of small follicles (diameter 1-4 mm) during the first days of an estrous cycle (Gamarra *et al.*, 2014a). A second experiment aimed to test whether the daily oral administration of propylene glycol could improve *in vitro* embryo production in superovulated growth-restricted heifers (600 g/day) differing in their Anti-Mullerian Hormone (AMH) profiles (Gamarra *et al.*, 2014b). Sixteen Holstein heifers were grouped according to AMH concentrations: low (L = 1-80 pg/mL; n = 7) or high (H: >150 pg/mL; n = 9). Administration of PG significantly increased the number of: small follicles (2-3 mm) and total follicles (2-8 mm) on day 2 of the cycle in all heifers. PG improved *in vitro* embryonic development rate (total number of embryos/number of fertilized oocytes) in all heifers compared to the control.

Taken together, these findings open-up the possibility of improving fertility and embryo quality by using diets or dietary supplements which induce a programmed sequence in circulating insulin concentrations.

### References

Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R, Sinclair KD. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality:



- cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod*, 73:918-926.
- Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ.** 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod*, 64:1624-1632.
- Bender RW, Hackbart KS, Dresch AR, Carvalho PD, Vieira LM, Crump PM, Guenther JN, Fricke PM, Shaver RD, Combs DK, Wiltbank MC.** 2014. Effects of acute feed restriction combined with targeted use of increasing luteinizing hormone content of follicle-stimulating hormone preparations on ovarian superstimulation, fertilization, and embryo quality in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 97:764-778.
- Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D.** 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55:1323-1340.
- Cox NM, Stuart MJ, Althen TG, Bennett WA, Miller HW.** 1987. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *J Anim Sci*, 64:507-516.
- Freret S, Grimard B, Ponter AA, Joly C, Ponsart C, Humblot P.** 2006. Reduction of body weight gain enhances in vitro production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction*, 131:783-794.
- Gamarra G, Ponsart C, Lacaze S, Le Guienne B, Deloche M-C, Monniaux D, Ponter A.** 2014a. Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers. *Livest Sci*, 162:240-251.
- Gamarra G, Ponsart C, Lacaze S, Le Guienne B, Humblot P, Deloche M-C, Monniaux D, Ponter A.** 2014b. Effect of dietary propylene glycol on ovarian follicle growth, the superovulatory response and in vitro embryo production after ovum pick-up in growth-restricted heifers differing in their plasma AMH profiles. *Reprod Fertil Dev.* (accepted for publication).
- Garnsworthy PC, Sinclair KD, Webb R.** 2008. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal*, 2:1144-1152.
- Garnsworthy PC, Fouladi-Nashta AA, Mann GE, Sinclair KD, Webb R.** 2009. Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early post partum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction*, 137:759-768.
- Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R.** 1993. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol*, 139:67-75.
- Gong JG, Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Garnsworthy PC, Webb R.** 2002a. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, 57:1591-1602.
- Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R.** 2002b. The effect of dietary induced increases in circulating insulin concentrations during the early post partum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*, 123:419-427.
- Gutierrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R.** 1997. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J Anim Sci*, 75:1876-1884.
- Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, BorA, Bruckental I.** 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 64:181-197.
- Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D.** 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post - fertilization development. *Reproduction*, 125:543-553.
- Lucy MP.** 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin growth factors in cattle. *J Dairy Sci*, 83:1635-1647.
- Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I.** 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52:1169-1179.
- Mantovani R, Enright WJ, Keane MG, Roche JF, Bolan MP.** 1993. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *In: Proceedings of the 9th AETE Meeting, 1993, Lyon, France. Lyon: AETE. abstr. 234.*
- Maplesden DC.** 1954. Propylene glycol in the treatment of ketosis. *Can J Comp Med Vet Sci*, 1:287-293.
- Matamoros IA, Cox NM, Moore AB.** 1991. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepuberal gilts. *J Anim Sci*, 69:2081-2091.
- Matoba S, Bender K, Fahey AG, Mamo S, Brennan L, Lonergan P, Fair T.** 2014. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Reprod Fertil Dev*, 26:337-345.
- McGuire MA, Dwyer DA, Harrell RJ, Bauman DE.** 1995. Insulin regulates circulating insulin-like growth factors and some of their binding proteins in lactating cows. *Am J Physiol*, 269: E723-E730.
- Nielsen NI, Ingvarsen KL.** 2004. Propylene glycol for dairy cows a review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim Feed Sci Technol*, 115:191-213.
- O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP.** 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil*, 118:303-313.
- Papadopoulos S, Lonergan P, Gath V, Quinn KM, Evans AC, O'Callaghan D, Bolan MP.** 2001. Effect of



- diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology*, 55:1059-1069.
- Santos J, Cerri R, Sartori R.** 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69:88-97.
- Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M, Somchit A.** 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*, 46:339-354.
- Seneda M** Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*, 67:37-43.
- Wathes DC, Fenwick MA, Liewellyn S, Cheng Z, Fitzpatrick R, McCarthy SD, Morris DG, Patton J, Murphy JJ.** 2008. Influence of energy balance on gene expression in the liver and reproductive tract of lactating cows and consequent effects on fertility. In: Szenci O, Bajcsy A (Ed.). Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, 2008, Budapest, Hungary: Factors affecting reproductive performance in the cow. Budapest: WAB. pp. 158-171.
- Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG.** 1999a. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl*, 54:33-48.
- Webb R, Gosden RG, Moor RM.** 1999b. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim Sci*, 68:257-284.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong J-G, Armstrong DG.** 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*, 82:63-74.
-

## 2. Posters

- Poster 1 présenté au congrès de l'ICAR (International Congress on Animal Reproduction) en 2012, illustre les résultats de l'expérimentation 1.
- Poster 2 présenté au congrès de l'AETE (European Embryo Transfer Association) en 2013, illustre une partie de résultats de l'expérimentation 2.
- Poster 3 présenté au congrès de l'AETE (European Embryo Transfer Association) en 2014, illustre les résultats de l'expérimentation 2.
- Poster 4 présenté au congrès de l'IETS (International Embryo Transfer Society) en 2015, illustre les résultats de l'expérimentation 2.
- Poster 5 présenté au congrès de l'IETS (International Embryo Transfer Society) en 2015, illustre les résultats de l'expérimentation 3.

# SHORT TERM DIETARY PROPYLENE GLYCOL SUPPLEMENTATION AFFECTS CIRCULATING METABOLIC HORMONES, PROGESTERONE CONCENTRATIONS AND FOLLICULAR GROWTH

## IN DAIRY HEIFERS

GAMARRA (1,2,4), A. PONTER (2,4), S. LACAZE (3), B. LE GUIENNE (1), C. PONSART (1)

(1)UNCEIA, département R & D, 13 rue Jouët, 94704 Maisons-Alfort cedex, France  
 (2)UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France,  
 (3)MIDATEST, Domaine de Sensacq, 64230 DENGUIN, France  
 (4)ENVA, Maisons-Alfort, France



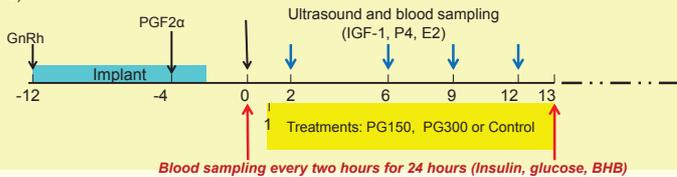
## INTRODUCTION



- Several experiments have shown that feeding strategy may impact the quality of collected oocytes and the embryos which are produced from them. These results were related to the concentrations of metabolites and hormones involved in regulating energy metabolism: in particular, increased levels of insulin and IGF-1 were associated with high energy consumption in dairy heifers (Freret et al. 2006).
- In heifers an increase in insulin concentrations over a short lapse of time has a positive effect on the growth of small follicles prior to superovulatory treatment (Freret et al. 2006).
- Plasma concentrations of glucose, insulin and IGF1 increase in response to propylene glycol in freshly calved cows (Miyoshi et al. 1996).
- This study aimed to assess the effects of a dietary propylene glycol (PG) supplementation on blood metabolites, metabolic and reproductive hormones and follicular growth in 10 dairy heifers (14 ± 1 months-old, weighing 332 ± 26 kg).

## MATERIALS & METHODS

- Experimental work was performed in a donor station of MIDATEST in South - West of France.
- Treatments consisted of (1) 1.1 kg of beet pulp (control), (2) 150 g PG (PG150), and (3) 300 g PG (PG300). Each heifer received all the treatments in different orders (1-3-2, n = 3; 1-2-3, n = 3; and 3-2-1, n = 4).
- A standard hay/concentrate diet formulated to produce a gain of 850 g/d was supplied at 8:00 and treatments were supplied at 16:00 from Days 1 to 13 of the estrous cycle following induced estrus (Day 0).



### Reproductive hormones concentrations

- There were not treatment day or interaction effects on estradiol concentrations ( $P > 0.05$ ; figure 1).
- PG150 treatment resulted in greater ( $P < 0.05$ ) progesterone concentrations on Days 9 and 12.

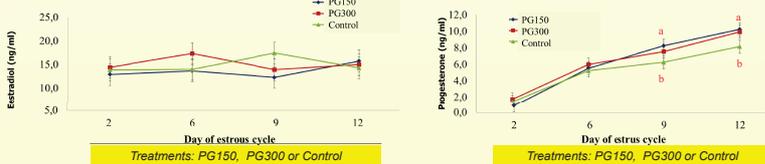


Figure 1 : Treatment effects (PG150 or PG300 or control) on Estradiol and Progesterone concentrations measured on Day 2, 6, 9 and 12 of estrous cycle. a,b ( $P < 0.05$ )

### Follicle characteristics on day 2 of estrous cycle

- PG treatments resulted in greater mean numbers of small follicles on Day 2 compared to control diet ( $P < 0.1$ ; Figure 2)

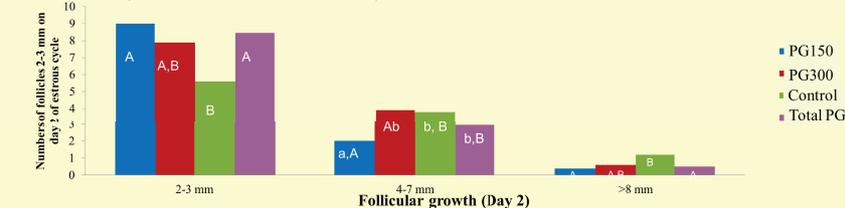


Figure 2 : Treatment effects (PG150 or PG300 or control) on follicular growth (2-3 mm, 4-7 mm et >8 mm) on day 2 of estrous cycle. a,b ( $P < 0.05$ ), A,B trend ( $P < 0.1$ )

## RESULTS

### Metabolites and metabolic hormones concentrations

- No treatment, day or interaction effects on overall mean insulin, glucose, and BHB concentrations measured on Days 0 and 13. (figures 3, 4, 5)
- There were treatment, time, and interaction effects on insulin, glucose and BHB concentrations obtained over 24 h on Day 13 (figures 3, 4, 5)
- increased glucose concentrations and decreased BHB concentrations observed at different time points following PG300, over 24 h on Day 13 (figures 4, 5)
- PG150 treatment resulted in greater ( $P < 0.05$ ) IGF-1 concentration on Day 6 (figure 6)

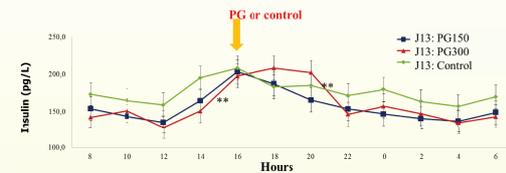


Figure 3: Treatment effects (PG150 or PG300 or control) on insulin concentrations obtained over 24 h on Day 13. \*\* ( $P < 0.01$ ).

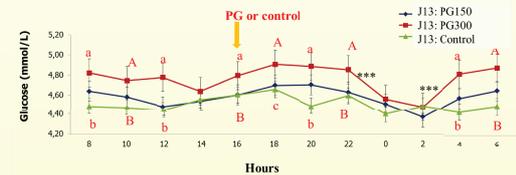


Figure 4: Treatment effects (PG150 or PG300 or control) on glucose concentrations obtained over 24 h on Day 13. a,b ( $P < 0.05$ ), a,c ( $P < 0.01$ ), A,B trend ( $P < 0.1$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ).

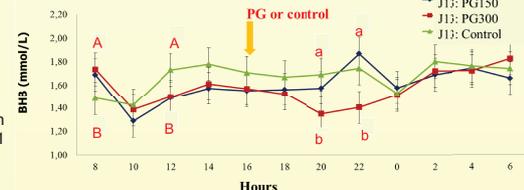


Figure 5: Treatment effects (PG150 or PG300 or control) on β-hydroxy butyrate (BHB) concentrations obtained over 24 h on Day 13. a,b ( $P < 0.05$ ); A,B trend ( $P < 0.1$ ).

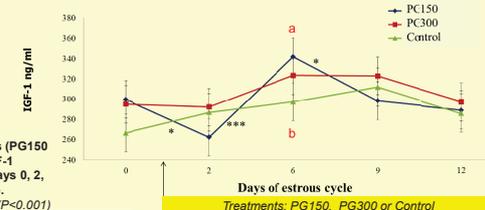


Figure 6: Treatment effects (PG150 or PG300 or control) on IGF-1 concentrations obtained Days 0, 2, 6, 9 and 12 of estrous cycle. a,b ( $P < 0.05$ ), \* ( $P < 0.05$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ )

## CONCLUSION

These results indicate that short-term dietary PG supplementation affects circulating concentrations of metabolites and metabolic hormones, and increases progesterone concentrations and the number of small follicles. Propylene glycol supplementation might be useful when combined with treatments to stimulate follicular growth for superovulation or ovum-pick up.

# Superovulatory response and oocyte recovery after Ovum Pick Up in feed restricted heifers with two profiles of AMH

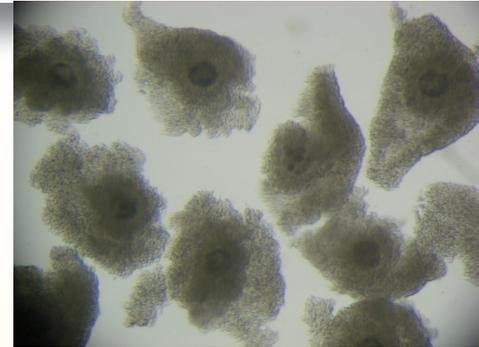
G. GAMARRA (1,4), C. PONSART (1), S. LACAZE (3), B. LE GUIENNE (1),  
D. MONNIAUX (5), A. PONTER (2,4)



- 1) UNCEIA, Département Recherche et Développement, Maisons-Alfort, France,  
2) UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Maisons-Alfort, France,  
3) MIDATEST, Denguin, France, 4) ENVA, Maisons-Alfort, France,  
5) Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 7247 INRA-CNRS-Université de Tours-IFCE, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France.



## INTRODUCTION



- Anti-Müllerian hormone (AMH) was found to be a reliable endocrine marker of the population of small antral gonadotrophin-responsive follicles in the cow.
- The measurement of circulating AMH concentrations can help predict the follicular and ovulatory responses to gonadotrophin treatment in cows (Rico et al., 2009, Rico et al., 2012).
- The aim of this study was to determine the superovulatory response and the number and quality of oocytes recovered by Ovum Pick Up (OPU) in feed restricted heifers (LWG: 600 g/d) with two profiles of AMH.

## MATERIAL & METHODS

### Animals

- Sixteen Holstein heifers (15.8 ± 1.2 months old; LW: 370 ± 41.2 kg) were grouped according to AMH concentrations: low (L = 1-80 pg/mL; n=7) or high (H: >150 pg/mL; n=9). Plasma concentrations of AMH were determined using AMH GENII ELISA kit (Beckman Coulter France, Roissy CDG, France), as described previously (Monniaux et al., 2008).

### Estrus synchronization and OPU

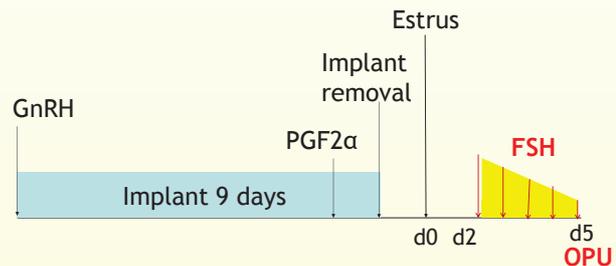
- OPU was performed during two periods (P1 and P2) at an interval of 6 weeks. Two OPU were performed in each period.

### Oocytes selection

- Oocytes were graded for quality as grade 1, 2, 3 and 4, according to Marquant-Le Guienne (1998). Before OPU all follicles (diameter 3-12 mm) were counted.

### Statistical analysis

- The statistical analyses (Student's T test and data correlation) were performed using GraphPad Prism.



## RESULTS

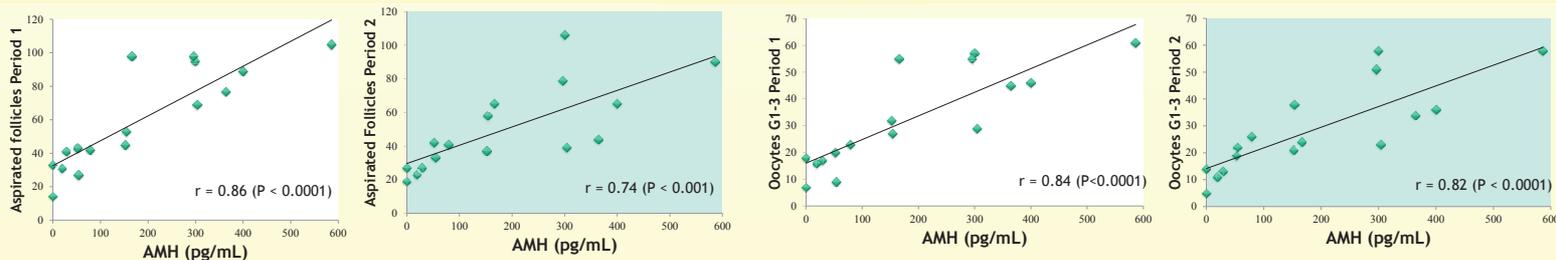
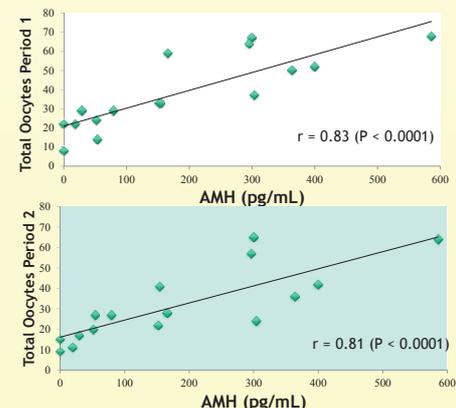


Table 1. Number of aspirated follicles, total number of oocytes collected, number of oocytes and aspiration rate.

| Parameters per heifer | PERIOD 1          |        |                   |        | PERIOD 2          |        |                   |        |
|-----------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
|                       | AMH H             |        | AMH L             |        | AMH H             |        | AMH L             |        |
|                       | Lsmean            | S.E.M. | Lsmean            | S.E.M. | Lsmean            | S.E.M. | Lsmean            | S.E.M. |
| Aspirated follicles   | 40.5 <sup>a</sup> | 3.6    | 16.5 <sup>b</sup> | 2.0    | 32.4 <sup>a</sup> | 3.9    | 15.1 <sup>b</sup> | 1.7    |
| Total Oocytes         | 25.7 <sup>a</sup> | 2.4    | 10.6 <sup>b</sup> | 1.5    | 21.1 <sup>a</sup> | 2.8    | 9.0 <sup>b</sup>  | 1.4    |
| Oocyte G 1-3          | 22.6 <sup>a</sup> | 2.2    | 7.9 <sup>b</sup>  | 1.1    | 19.1 <sup>a</sup> | 2.4    | 7.9 <sup>b</sup>  | 1.3    |
| Oocytes G 1-3 (%)     | 88.3              |        | 74.5              |        | 90.5              |        | 87.7              |        |
| Aspiration rate (%)   | 63.5              |        | 64.1              |        | 65.0              |        | 59.4              |        |

<sup>a,b</sup> P < 0.0001

- Animals with AMH H had higher numbers of aspirated follicles, total oocytes and G 1, 2 and 3 quality oocytes than AMH L animals.
- There was no significant difference between periods.
- In this protocol the number of aspirated oocytes was not altered by repeated stimulations.



## CONCLUSION

- This study shows that oocyte collection by OPU is higher in heifers selected for high circulating AMH concentrations.
- The selection of donors by AMH levels could improve in vitro embryo production.

# Ovum Pick Up and in vitro embryo production following propylene glycol diet in heifers differing in their AMH profiles

Gamarra G. (1,2), Ponsart C.(1), Lacaze S.(2), Le Guienne B. (1) Humblot P (3), Deloche M.- C.(1), Monniaux D. (4), Ponter A.A. (5,6)



1) UNCEIA, Département Recherche et Développement, Maisons-Alfort, France, 2) MIDATEST, Denguin, France, 3) Dpt of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden 4) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France 5) Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Maisons-Alfort, France 6) INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

## INTRODUCTION

- ❖ Short-term dietary PG is associated with raised levels of circulating glucose and insulin and stimulates follicle growth during the first days of an estrous cycle (Gamarra et al. 2014).
- ❖ Anti-Müllerian hormone (AMH) was found to be a reliable endocrine marker of the population of small antral gonadotrophin-responsive follicles in the cow (Rico et al., 2009).
- ❖ The aim of this study was to test whether the daily oral administration of propylene glycol (PG) could improve in vitro embryo production in superovulated growth-restricted heifers (600 g/day) differing in their AMH profiles

## MATERIAL & METHODS

### Animals

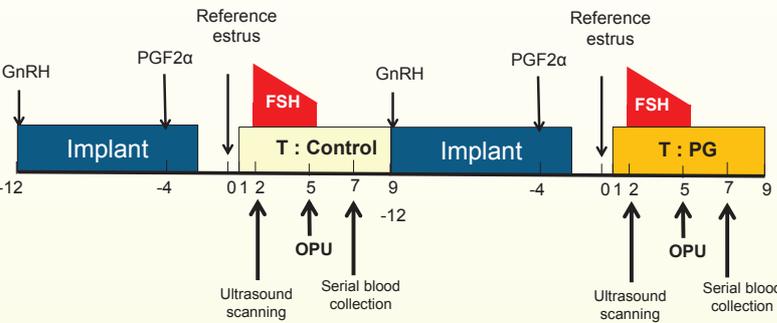
- ❖ Sixteen Holstein heifers (15.8 ± 1.2 months old; BW: 370 ± 41.2 kg) were grouped according to AMH concentrations: low (L = 1-80 pgmL<sup>-1</sup>; n=7) or high (H: >150 pgmL<sup>-1</sup>; n=9). Plasma concentrations of AMH were determined using AMH GENII ELISA kit (Beckman Coulter France, Roissy CDG, France), as described previously (Rico et al., 2013).

### Protocol

- ❖ The experimental protocol is in the Scheme 1. Heifers received a single daily drench of 400 mL of water (Control) from Day 1 to Day 9 of the first synchronized estrous cycle followed by 400 mL of PG from Day 1 to Day 9 of the second synchronized estrous cycle.
- ❖ Ovum Pick-Up (OPU) was performed following superovulation, on Day 5 of the estrous cycle. Before OPU all follicles (diameter 2-12 mm) were counted. Serial blood collection was realized on day 7 to monitor the kinetics of plasma insulin, Glucose and β-hydroxybutyrate (BHB) and on days 0, 2, 5, 7 and 9 of the cycle to measure IGF1.

### Embryo production

- ❖ Cumulus-oocyte complex (COC) were matured and fertilized in vitro. Embryos were cultured in SOF (synthetic oviductal fluid) for 7 days (Gamarra et al., 2014). Grade 1 embryos (blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts), according to IETS classification, were recorded on day 7.



Scheme 1: Experimental scheme and sampling time schedule per period (2 periods were performed with 6 weeks interval)

## RESULTS

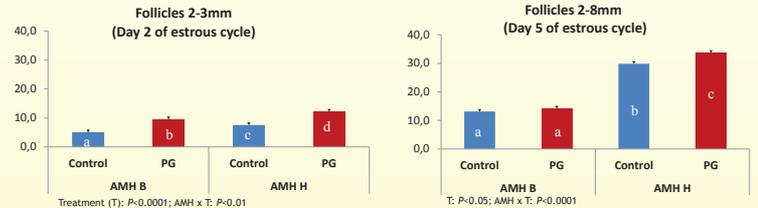
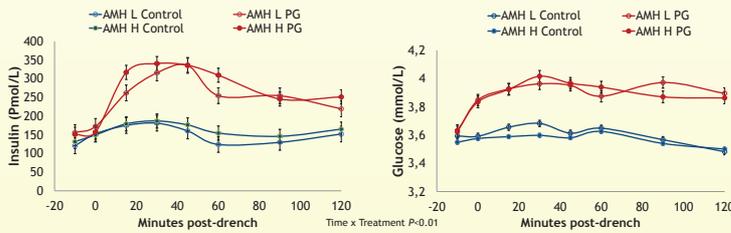
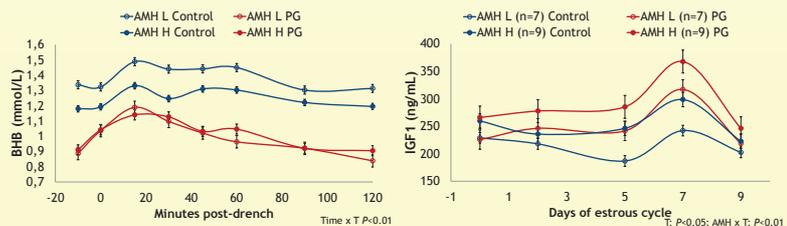


Table 1. Number of oocytes collected and in vitro embryo production

|                           | AMH L (n = 7)     |        |                   |        | AMH H (n=9)       |        |                   |        |
|---------------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
|                           | Control           |        | PG                |        | Control           |        | PG                |        |
|                           | Mean              | S.E.M. | Mean              | S.E.M. | Mean              | S.E.M. | Mean              | S.E.M. |
| Collected oocytes         | 10.5 <sup>a</sup> | 1.7    | 9.1 <sup>a</sup>  | 1.7    | 22.7 <sup>b</sup> | 1.5    | 24.1 <sup>b</sup> | 1.5    |
| Grade 1 - 3 oocytes       | 8.5 <sup>a</sup>  | 1.5    | 7.2 <sup>a</sup>  | 1.5    | 20.1 <sup>b</sup> | 1.4    | 21.6 <sup>b</sup> | 1.4    |
| Grade 1 oocytes           | 2.8 <sup>a</sup>  | 0.5    | 3.2 <sup>a</sup>  | 0.5    | 4.5 <sup>b</sup>  | 0.4    | 6.9 <sup>c</sup>  | 0.4    |
| Fertilized oocytes        | 8.5 <sup>a</sup>  | 2.2    | 7.1 <sup>a</sup>  | 2.2    | 20.0 <sup>b</sup> | 1.9    | 21.6 <sup>b</sup> | 1.9    |
| % Cleaved                 | 92.4 <sup>a</sup> |        | 89.0 <sup>a</sup> |        | 94.2 <sup>a</sup> |        | 93.1 <sup>a</sup> |        |
| Day 7 grade 1 - 3 embryos | 3.2 <sup>a</sup>  | 1.2    | 3.6 <sup>a</sup>  | 1.2    | 7.3 <sup>b</sup>  | 1.1    | 10.4 <sup>c</sup> | 1.1    |
| %                         | 37.8 <sup>a</sup> |        | 50.0 <sup>b</sup> |        | 36.4 <sup>a</sup> |        | 48.3 <sup>b</sup> |        |
| Day 7 grade 1 embryos     | 1.9 <sup>a</sup>  | 1.1    | 3.2 <sup>a</sup>  | 1.1    | 5.2 <sup>b</sup>  | 1.0    | 8.9 <sup>c</sup>  | 1.0    |
| %                         | 22.7 <sup>a</sup> |        | 45.0 <sup>b</sup> |        | 26.1 <sup>a</sup> |        | 41.1 <sup>b</sup> |        |

a vs b P<0.05; a vs c P<0.05; b vs c P<0.05

- ❖ PG increased plasma concentrations of Insulin, glucose and reduced plasma concentrations of BHB in all heifers. PG increased IGF1 concentrations on Days 5 and 7 in AMH L heifers and on Days 2, 5 and 7 in AMH H heifers.
- ❖ PG increased the number of small follicles (2-3 mm) and follicles 2-8 mm on day 2 of the estrous cycle in all heifers and the number of follicles 2-8 mm on day 5 after superovulation only in heifers with AMH H.
- ❖ PG increased the number of Grade 1 oocytes in heifers with AMH H.



- ❖ PG increased the in vitro embryo development rate in heifers with AMH L and AMH H and the number of grade 1 blastocysts on Day 7 in AMH H but not in AMH L heifers.
- ❖ AMH concentration was positively correlated with the number of follicles 2- 3 mm ( $r = 0.64, P<0.0071$ ) on day 2, follicles 2->8mm ( $r = 0.87, P = 0.001$ ) at OPU, oocyte collection ( $r = 0.84, P<0.0001$ ), in vitro grade 1, 2, 3 embryos ( $r = 0.60, P = 0.0133$ ) and in vitro grade 1 embryos ( $r = 0.56, P = 0.0250$ ).

## CONCLUSION

- ❖ Short-term oral PG supplementation affects circulating concentrations of metabolites and metabolic hormones and is effective in improving in vitro embryo production after superovulation and OPU more markedly in heifers with high AMH compared to heifers with low AMH.
- ❖ AMH concentrations in plasma before superovulation could be used as an endocrine marker and a possible predictor of in vitro embryo production in cattle.

# Effects of dietary propylene glycol on follicular fluid and ovum pick up in vitro embryo production in growth restricted heifers with two profiles of AMH

Gamarra G. (1,2), Ponsart C.(1), Lacaze S.(2), Le Guienne B. (1) Humblot P (3), Deloche M.- C.(1), Monniaux D. (4), Ponter A.A. (5,6)



1) UNCEIA, Département Recherche et Développement, Maisons-Alfort, France, 2) MIDATEST, Denguin, France, 3) Dpt of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Agricultural Sciences, SLU, Uppsala, Sweden 4) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France 5) Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Maisons-Alfort, France 6) INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France.



## INTRODUCTION

- ❖ Fertility and embryo quality can be improved in cattle by using diets that induce a programmed modulation of circulating insulin concentrations.
- ❖ Anti-Müllerian hormone (AMH) was found to be a reliable endocrine marker of the population of small antral gonadotrophin-responsive follicles in the cow (Rico et al., 2009).
- ❖ The aim of this study was to test whether the daily oral administration of propylene glycol (PG) could improve in vitro embryo production in superovulated growth-restricted heifers (600 g/day) differing in their AMH profiles

## MATERIAL & METHODS

### Animals

- ❖ Sixteen Holstein heifers (15.8 ± 1.2 months old; BW: 370 ± 41.2 kg) were grouped according to AMH concentrations: low (L = 1-80 pg/mL; n=7) or high (H: >150 pg/mL; n=9). Plasma concentrations of AMH were determined using AMH GENII ELISA kit (Beckman Coulter France, Roissy CDG, France), as described previously (Rico et al., 2013).

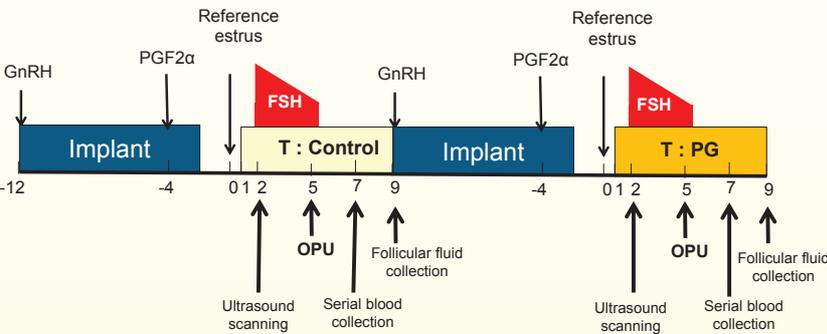
### Protocol

- ❖ The experimental protocol is in the Scheme 1. Heifers received a single daily drench of 400 mL of water (Control) from Day 1 to Day 9 of the first synchronized estrous cycle followed by 400 mL of PG from Day 1 to Day 9 of the second synchronized estrous cycle.

- ❖ Ovum Pick-Up (OPU) was performed following superovulation, on Day 5 of the estrous cycle. Before OPU all follicles (diameter 2-12 mm) were counted. Serial blood collection was realized on day 7 to monitor the kinetics of plasma insulin, Glucose and β-hydroxybutyrate (BHB) and on days 0, 2, 5, 7 and 9 of the cycle to measure IGF1. Follicular fluid was collected on Day 9 to measure insulin and IGF1 concentrations.

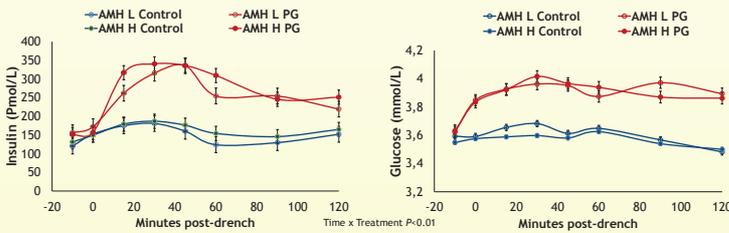
### Embryo production

- ❖ Cumulus-oocyte complex (COC) were matured and fertilized in vitro. Embryos were cultured in SOF (synthetic oviductal fluid) for 7 days (Gamarra et al., 2014). Grade 1 embryos (blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts), according to IETS classification, were recorded on day 7.

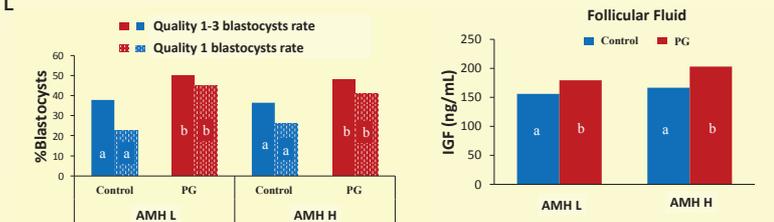
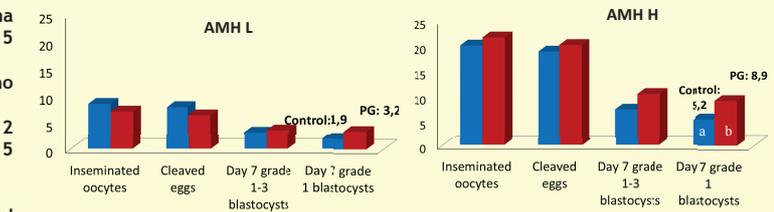
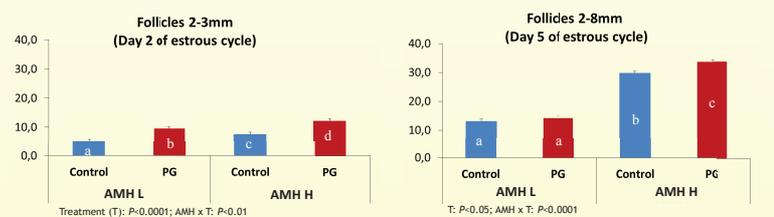
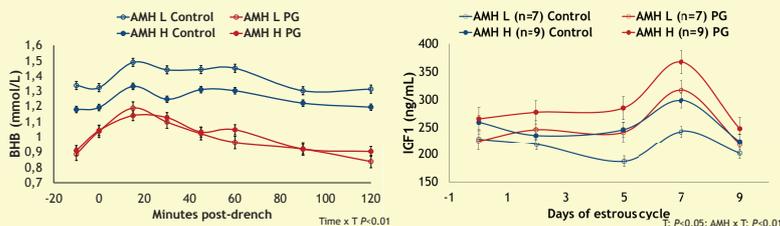


Scheme 1: Experimental scheme and sampling time schedule per period (2 periods were studied with 6 weeks interval)

## RESULTS



- ❖ PG increased plasma concentrations of Insulin, glucose and reduced plasma concentrations of BHB in all heifers. PG increased IGF1 concentrations on Days 5 and 7 in AMH L heifers and on Days 2, 5 and 7 in AMH H heifers.
- ❖ In follicular fluid, PG increased IGF1 concentrations in all heifers, there was no difference in insulin concentrations.
- ❖ PG increased the number of small follicles (2-3 mm) and follicles 2-8 mm on day 2 of the estrous cycle in all heifers and the number of follicles 2-8 mm on day 5 after superovulation only in heifers with AMH H.
- ❖ PG increased the number of Grade 1 oocytes in heifers with AMH H.
- ❖ PG increased the in vitro embryo development rate in heifers with AMH L and AMH H and the number of grade 1 blastocysts on Day 7 in AMH H but not in AMH L heifers.



## CONCLUSION

- ❖ Short-term oral PG supplementation affects circulating concentrations of metabolites and metabolic hormones in blood and IGF1 concentrations in follicular fluid.
- ❖ PG administration is effective in improving in vitro embryo production more markedly in heifers with high AMH compared to low AMH endocrine levels.

# Propylene glycol feeding supplementation modifies IGF system gene expression in COC and the expression of selected candidate genes in embryos produced in vitro in feed-restricted heifers

Gamarra G. (1,2), Ponsart C.(3), Lacaze S.(2), Nuttinck F. (4), P. Mermillod (5),  
Le Guienne B. (1) Monniaux D. (6), Humblot P (7), Pontet A.A. (4,8)

1) UNCEIA, Département Recherche et Développement, Maisons-Alfort, France,  
2) MIDATEST, Denguín, France, 3) ANSES, Animal Health Laboratory, Maisons Alfort, France,  
4) INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France, 5) INRA, UMR7247, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, 6) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, 7) Dpt of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Agricultural Sciences, SLU, Uppsala, Sweden 8) Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Maisons-Alfort, France

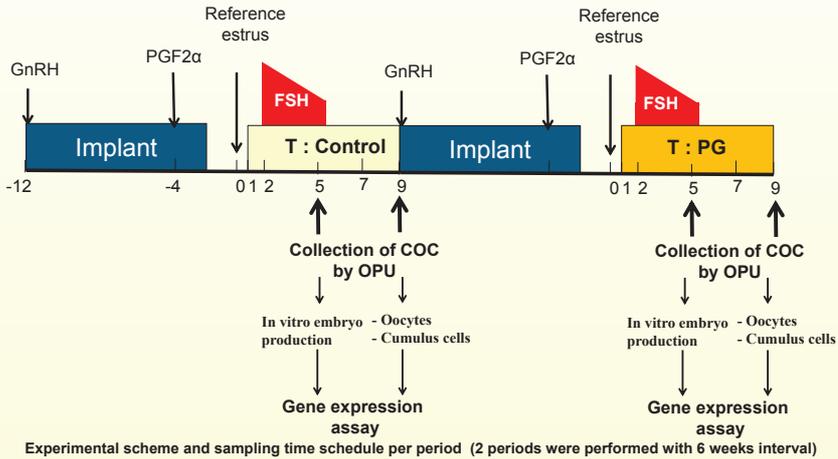


## INTRODUCTION

- ❖ Dietary supplementation with propylene glycol (PG) is associated with raised levels of circulating glucose and insulin, stimulate follicle growth during the first days of an estrous cycle and increases the rate of grade 1 embryos produced from feed restricted females (Gamarra et al., 2014 Reprod. Fertil. Dev.).
- ❖ The aim of this study was to evaluate if a PG feeding supplement could modify the expression profile of selected candidate genes that are important for in vitro embryo development and the gene expression patterns of the IGF system in oocytes and cumulus cells in feed-restricted heifers.

## MATERIAL & METHODS

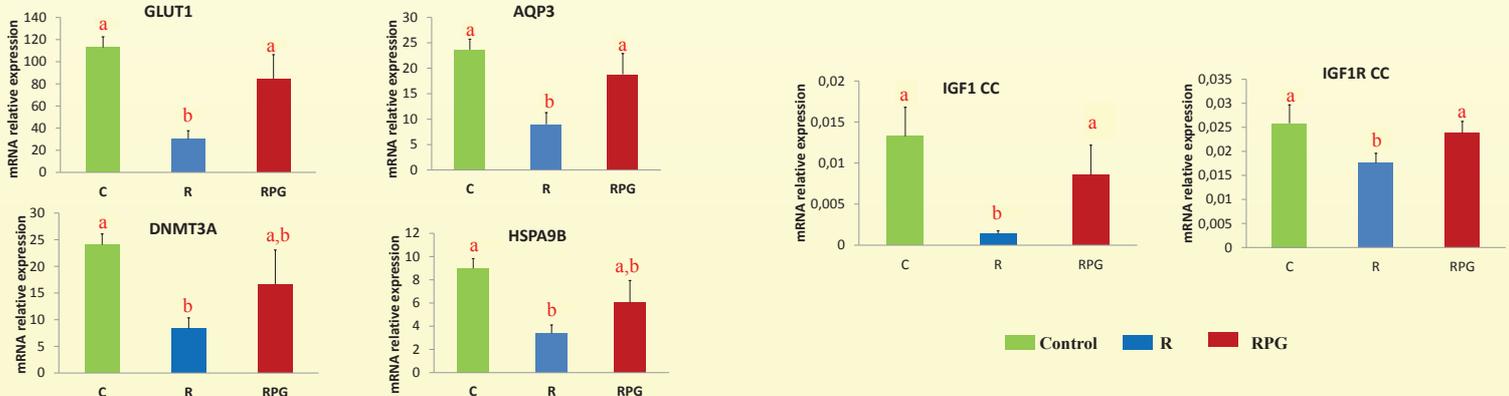
- Animals**
- ❖ Sixteen Holstein feed-restricted heifers (15.8 ± 1.2 months old; BW: 370 ± 41.2 kg, growth rate of 600 g/day) were used.
- Protocol**
- ❖ The experimental protocol is in the Scheme 1. Heifers received a single daily drench of 400 mL of water (group restricted, R) from Day 1 to Day 9 of a first synchronized estrous cycle followed by 400 mL of PG from Day 1 to Day 9 of the second synchronized estrous cycle (group restricted + PG, RPG).
  - ❖ Ovum Pick-Up (OPU) was performed following superovulation, on Day 5 of the estrous cycle to produce embryos in vitro (Gamarra et al., 2014) and on Day 9 without superovulation to obtain oocytes and cumulus cells. The same protocol was used in control animals (n=6, growth rate of 800 g/day).



- Genes analysis Embryos**
- ❖ Grade 1 expanded blastocysts were retrieved on day 7 (post insemination) from each treatment and Real-time PCR (RT-PCR) was used to determine the relative abundance of genes involved in lipid metabolism and storage (PLIN2, SCD), energy metabolism (GLUT1), membrane permeability (AQP3), epigenetic marks (DNMT3A), apoptosis (BAX, TP53), and protein processing (HSPA9B).
  - ❖ Every gene were normalized using the geometric mean of endogenous RPL19 and YWHAZ genes.
  - ❖ RT-PCR experiments were replicated with six separate pools of 5 expanded blastocysts from each treatment and period
- Cumulus cells and oocytes**
- ❖ Quantitative real-time RT-PCR for genes IGF1, IGF1R, IGFBP2, IGFBP4 in cumulus cells (CC), and IGF1R and IGFBP2 in oocytes were analyzed.
  - ❖ The results were normalized using the geometric mean of endogenous RPL19 and beta actin genes. RT-PCR experiments were replicated with 5 to 7 separate pools of 5 CC or 5 Oocytes from each treatment and period.
- Statistic analysis**
- ❖ Mann-Whitney nonparametric tests were performed to analyze gene expression results.

## RESULTS

- ❖ The expression of PLIN2, GLUT1, AQP3, DNMT3a, BAX and HSPA9B were decreased in **embryos** collected from restricted compared to control animals. The expression levels of these genes were restored when females were supplemented with PG. The expression of TP53 and SCD were not affected.
- ❖ In **cumulus cells**, the expression levels of IGF1, IGF1R and IGFBP4 were decreased in restricted compared to control animals. The expression levels of IGF1 and IGF1R were restored with PG supplementation. No differences were observed for the IGFBP2 gene. In the **oocytes**, no differences were observed for the expression levels of IGF1R and IGFBP2 genes.



## CONCLUSION

- ❖ This work shows for the first time that feed restriction and dietary supplementation by PG in heifers produced changes in gene expression in blastocysts and modified the pattern of the IGF system in cumulus cells.
- ❖ These results suggest the existence of an epigenetic regulation induced by PG during follicular growth, which can regulate the level of gene expression up to the blastocyst stage.
- ❖ In general, PG supplementation of feed-restricted donors restored gene expression at the levels observed after normal feeding.

**Modulation des taux plasmatiques d'insuline par l'apport de propylène glycol dans l'alimentation : effet sur la quantité, la qualité des ovocytes et des embryons produits in vitro chez des génisses laitières.**

---

L'Ovum Pick-Up et la production d'embryons in vitro peuvent accélérer le progrès génétique par la voie femelle. La variabilité de qualité des ovocytes et des taux de développement in vitro peuvent être influencés par l'alimentation des donneuses avant collecte et liés aux métabolites et hormones impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. L'administration courte de propylène glycol a augmenté les concentrations d'insuline, glucose et l'IGF1, la croissance des petits follicules avant traitement de superovulation et le taux de blastocyste chez toutes les génisses, la qualité des ovocytes et la production d'embryons chez les génisses avec haut niveaux d'AMH. Ceci pourrait résulter d'une régulation épigénétique du système IGF1 induite par PG lors de la croissance folliculaire qui pourrait moduler l'environnement folliculaire et impacter l'expression des gènes y compris jusqu'au stade blastocyste plus fortement chez les génisses à profil haut d'AMH.

**Mots-clés :** propylene glycol, génisses laitières, superovulation, anti-müllerian hormone, croissance folliculaire, production d'embryons in vitro, ovum pick-up, nutrition, métabolites, hormones.

**Modulation of plasma insulin levels by propylene glycol supplementation: effect on the quantity and quality of oocytes and embryos produced in vitro in dairy heifers.**

---

Ovum pick-up and in vitro embryo production method in heifers can accelerate speed of genetic progress through the female line. The variability in oocytes quality of and embryo development rates in vitro may be influenced by the dietary intake of donor cattle before oocyte recovery and may be related to the concentrations of metabolites and hormones involved in regulating energy metabolism. A short term dietary supplement, propylene glycol, which increased circulating insulin, glucose and IGF1, was able to further increase the growth of small follicles prior to superovulatory treatment and blastocyst rate in heifers with low and high AMH levels. Oocyte quality and embryo production were increased in animals with high AMH levels probably via regulation of IGF1 system during follicular growth. This regulation system may modulate follicular environment and level of gene expression up to the blastocyst stage more markedly in heifers with high compared to low AMH levels.

**Keywords:** propylene glycol, dairy heifers, superovulation, anti-müllerian hormone, follicular growth, in vitro embryo production, ovum pick-up, nutrition, metabolites, hormones.

---