154THV-2

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université "SAAD DAHLAB" BLIDA

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques
Département des Sciences Vétérinaires

PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN MEDECINE VETERINAIRE

Thème

RESULTATS PRELIMINAIRES DE PRODUCTION ET TRANSFERT D'EMBRYONS IN VIVO CHEZ LA BREBIS DE RACE HAMRA (effet d'une dose de 16mg de pFSH)

Réalisé par :

M[r]. BAKLI Adnane

M[r]. FERCHOULI Yacine

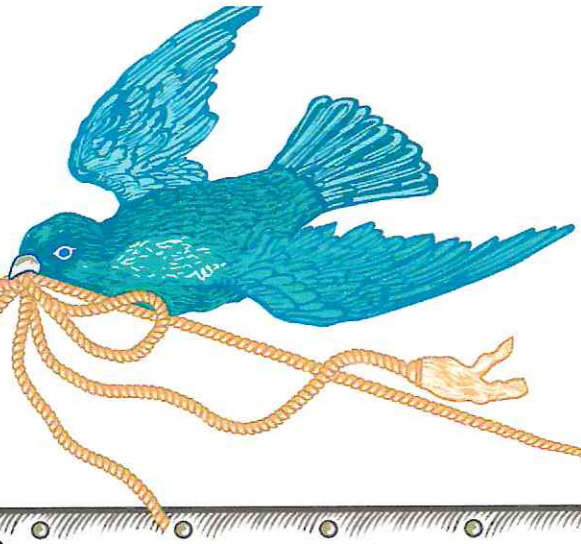
Jury:

M[r]. FERROUK M. Président (C.C) U.S.D.B

M[r]. ADEL D. Examinateur (M.A.T) U.S.D.B

M[lle]. AMOKRANE A. Examinateur (M.A.T) U.S.D.B

M[r]. GHARBI S. Promoteur (C.C) U.S.D.B



Remerciement

Il nous est très agréable d'ouvrir ce mémoire en remerciant toutes les personnes qui nous ont apporté leurs soutiens pour l'élaboration de ce modeste travail, en particulier :

- *Mr GHARBI S.: notre promoteur pour ces conseils, sa disponibilité et pour touts les efforts qu'il a déployé ;*
- *Mr FERROUK M. et Mr ADEL D. pour leur aide à la réalisation de notre partie expérimentale ;*
- *Mr MUSTAPHA N. directeur de la station expérimentale pour sa collaboration ainsi que tout le personnel de la station ;*
- *Nos vifs remerciements vont au président et membres de jury qui ont accepté de juger ce travail ;*
- *Touts nos enseignants qui ont contribué à notre formation ;*
- *Enfin, à tous ceux qui nous ont soutenu de prés ou de loin on leurs dis merci mille fois.*

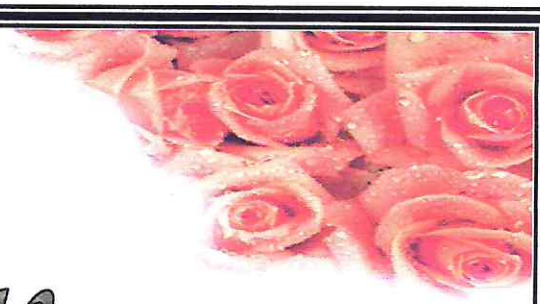
YACINE & ADNANE

Dédicace

Je dédie ce modeste travail en signe de respect et de reconnaissance :

- *A la mémoire de mon grand père ;*
- *A ma grande mère, symbole et source de sagesse que dieu la garde pour nous;*
- *A ma mère qui est un être cher, celle qui ma bercer d'un amour sincère ;*
- *A mon père de qui je tiens ma fierté et ma persévérance ;*
- *A ma petite sœur, AMEL, princesse de lumière;*
- *A mes frères, ma richesse sur cette terre : KARIM et SOFIANE ;*
- *A tous mes amis, sans les citer, je leur dédie ce travail en signe de reconnaissance et de respect;*
- *Enfin, à mes très chers parents, sans eux ce travail n'aurait jamais vu le jour.*

..... FERCHOULI Yacine.....



Dédicace

A chaque fois qu'on achève une étape importante dans notre vie, on fait une pose pour regarder en arrière et se rappeler de toutes ces personnes qui ont partagé avec nous tous les bons moments de notre existence, mais surtout les moments difficiles.

Ces personnes qui nous ont aidé sans le leur dire, soutenus sans réserve, aimé sans compter, ces personnes à qui notre bonheur devient directement le leur, à qui un malheur en nous, en eux se transforme en pleur.

A toutes ces âmes ; sans les citer ; je dédie ce travail en signe de reconnaissance et de respect.

BAKLI Aduane

RESUME

Un essai d'application des techniques de production et de transfert d'embryons in vivo chez la race Hamra a été effectué, dont l'objectif principal est la maîtrise et la mise en œuvre de cette biotechnologie dans notre pays. En effet, Quelle qu'en soit la finalité, la transplantation embryonnaire repose sur la capacité d'obtenir, à partir des donneuses, une récolte suffisante d'embryons utilisables.

Notre expérience a concerné six (06) brebis, dont deux (02) donneuses de race Hamra et quatre (04) receveuses de race mixte.

La superovulation, première étape obligatoire, induite par une dose de 16mg d'un rapport adéquat de pFSH/pLH en doses décroissantes à la fin d'un traitement progestatif, a permet d'obtenir une moyenne de 11,5 corps jaunes.

La saillie des donneuses a été effectuée, par un bélier Hamra sur chaleurs observées. Le taux de fécondité ainsi obtenu est de 71,42%.

Le sixième jour après saillie, une récolte chirurgicale et une évaluation puis une classification des embryons a été réalisée. Les résultats obtenus étaient encourageants avec un taux de récolte de 91,30%, et une moyenne de six (06) embryons transférables.

Enfin, le transfert des embryons sous endoscopie a été pratiqué le même jour sur des receveuses dont les chaleurs ont été préalablement synchronisées avec celles des donneuses. Le résultat de l'examen échographique, réalisé quarante (40) jours après transfert, a montré un taux de gestation de 75%.

Pour une première en Algérie, les résultats satisfaisants de production et de transfert d'embryons in vivo chez la brebis Hamra, ouvrent la voie à d'autres initiatives afin de mieux maîtriser cette biotechnologie en lui promettant un meilleur avenir dans notre pays.

Mots clés : embryon, transplantation embryonnaire, in vivo, pFSH/pLH, brebis, Hamra.

Absrtact:

A test to application the techniques of production and transfer of embryos in vivo at the Hamra ewes has been done, whose principal objective is the control and the implementation of this biotechnology in our country.

The embryonic transplantation is bound on the capacity to get, from the donors, a sufficient harvest of usable embryos.

Our experiment concerned six (06) ewes, including two (02) donors of Hamra ewes and four (04) conductors of mixed race.

Donor ewes were subjected to superovulation using 16mg of an adequate report of pFSH/pLH in decreasing doses at the end of a treatment progestatif, has permitted to get an average of 11,5 corpora lutea.

The fertilization of the donors has been done, by a Hamra ram on observed estrus. The fertilization rate thus gotten is 71,42%.

On day 06, after fertilization, a surgical recovery and an assessment and a classification of the embryos has been achieved. The gotten results were encouraging with 91,30% of recovery rate and an average of six (06) transferable embryos.

Finally, the transfer of the embryos under endoscopy has been practiced the same day on conductors whose estrus have been synchronized previously with those of the donors. The result of the ultrasound exam, achieved forty (40) days after transfer, showed a pregnancy rate of 75%.

For a first in Algeria, the satisfactory results of production and transfer embryos in vivo in the Hamra ewes, open the way to other initiatives in order to master this biotechnology better while promising him a better future in our country.

Key words: embryo, embryonic transplantation, in vivo,pFSH/pLH, Hamra ewes.

الملخص:

تجربة لتطبيق تقنيات إنتاج وتحويل الأجنة طبيعيا لغنم من سلالة الحمراء قد أنجزت لهدف رئيسي ألا وهو التحكم وتحقيق هذه التقنية الحيوية في الجزائر.

ومن ثمة مهما تكن المحصلة فإن تحويل الأجنة تعتمد على قدرة الحصول من خلال الواهبات على أجنة قابلة للاستعمال.

التجربة التي قمنا بها تمحورت حول ستة نعاج، نعجتان واهبتان من سلالة الحمراء وأربع مستقبلات من جنس مختلط.

تكثيف التبييض، أول عملية إلزامية، محفزة بحقن جرعة ذات 16 مغ ونسبة ملائمة من pFSH/pLH ذات تركيز تنازلي وذلك خلال المرحلة النهائية للعلاج البروجستروني ، مما سمح بالحصول على معدل 11.5 جسم اصفر للنعجة.

وطأ الواهبات تم بواسطة كبش من جنس الحمراء، وذلك بعد ملاحظة مظاهر الشبق، نسبة التخصيب المتحصل عليها بلغت 71.42%.

اليوم السادس بعد الوطء تم استخلاص الأجنة بعملية جراحية ثم تقديرهم وتصنيفهم.

النتائج المحصل عليها كانت مشجعة وذلك بنسبة جني مقدرة بـ: 91.30% ومعدل ستة أجنة قابلة للتحويل.

تم تحويل الأجنة تحت المنظار الداخلي (Endoscopie) في نفس اليوم، إلى المستقبلات اللواتي شبقهن كان متوافقا مع نظيراتهن الواهبات.

نتيجة اختبار استعمال تقنية التصوير الفوق الصوتي (Echographie) 40 يوما بعد عملية التحويل أثبتت نسبة حمل: 75%.

وكأول تجربة في الجزائر حول إنتاج وتحويل الأجنة طبيعيا عند النعاج من سلالة الحمراء، فإن النتائج المرضية المتحصل عليها تفتح المجال لدراسات أخرى من أجل تحكم أفضل في هذه التقنية وتسمح لها بمستقبل أفضل في بلادنا.

مفتاح الكلمات: جنين، زرع الأجنة، طبيعيا، pFSH/pLH ,نعاج، الحمراء.

LISTE DES TABLEAUX I
LISTE DES FIGURES.....III
LISTE DES PHOTOS.....V
LISTE DES ABREVIATIONS.....VI
Introduction générale 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
LE RACES OVINES ALGERIENNES ET PRESENTATION DE LA RACE HAMRA

I) Introduction 2
II) Les races ovines algériennes et présentation de la race Hamra 2
II-1) Les races ovines algériennes..... 2
II-1-A) Les races principales 2
a) La race Ouled djellal 2
b) La race Rumbi 2
c) La race Hamra (Beni-Ighil) : 3
c-1) Présentation de la race Hamra 3
c-2) Berceau de la race 3
c- 3) Description physique..... 3
c- 4) Caractéristiques de reproduction 4
c- 5) Caractéristiques de production 4
II-1-B) Les races secondaires 5
a) La race Berbère 5
b) La race Barbarine 5
c) La D'men 5
d) La Targuia-sidaou 5

CHAPITRE II

RAPPELS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES SUR LA REPRODUCTION OVINE

I) Anatomie de l'appareil génital de la brebis 6
I -1) section glandulaire..... 6
a) Les ovaires 6
I-2) Section tubulaire..... 7
a) L'oviducte..... 7
a-1) Le pavillon 7

a-2) L'ampoule....7
a-3) L'isthme....7
b) L'utérus....7
b-1) les cornes....7
b-2) le corps....7
b-3) Le col ou cervix....7
I-3) Sinus urogénital....8
a) Le vagin....8
b) Les organes génitaux externes....8
II) Physiologie de la reproduction ovine....8
II-1) Saisonnalité de l'activité sexuelle....8
II-1-A) Les facteurs déterminants la saisonnalité....8
II-1-B) Mécanisme de régulation de l'activité sexuelle par la photopériode....8
II-2) Aspects morphologiques du développement folliculaire (folliculogenèse)....10
II-2-A) Phase de multiplication....10
II-2-B) Phase de croissance....10
II-2-C) Phase de maturation....12
II-3) Notion de vague de croissance folliculaire....13
II-3-A) Notion de recrutement, sélection et dominance....13
II-4) Le cycle sexuel....14
II-4-A) La phase folliculaire....15
II-4-B) La phase lutéale....15
II-5) Modifications hormonales au cours du cycle....15
II-5-A) Les hormones hypothalamiques....16
II-5-B) Les hormones hypophysaires....16
II-5-B-1) FSH....16
II-5-B-2) LH....17
II-5-B-3) La prolactine ou LTH....17
II-5-C) Les hormones ovariennes....17
II-5-C-1) Les oestrogènes....17
II-5-C-2) La progestérone....17
II-5-C-3) L'inhibine....18

II-5-D) Les facteurs utérins (prostaglandines) 18
II-6) La régulation hormonale de l'activité sexuelle cyclique 18
II-6-1) L'ovulation 19
II-6-2) l'atrésie folliculaire 20
II-7) La détection des chaleurs 20
II-8) Etapes successives du comportement d'oestrus femelle 21
II-9) Accouplement 22
II-10) La fécondation 23
II-11) Physiologie du développement embryonnaire ovin 23
II-11-A) La segmentation de l'embryon 23
II-11-B) La migration de l'embryon 24
II-11-C) L'implantation de l'embryon 25

CHAPITRE III
MAITRISE DE L'ACTIVITE SEXUELLE DE LA BREBIS

I) Introduction: 26
II) Techniques de maîtrise de la reproduction chez l'espèce ovine 26
II-1) Synchronisation des chaleurs 26
II-1-1) Moyens zootechniques 26
A) Effet bélier 26
b) Alimentation (le flushing) 27
c) Photopériode (l'éclairement artificiel) 27
II-1-2) Méthodes hormonales 28
A) Les progestagènes 28
b) Les prostaglandines 29
C)La mélatonine 30
II-2) Production et transfert d'embryons in vivo 31
II-2-1) Superovulation 31
II-2-1-a) Nature des traitements hormonaux 31

1) PMSG 32
2) les extraits hypophysaires 32
3- GnRH 34
II-2-1-b) Conséquences d'un traitement de superovulation 34
A) Sur l'apparition des chaleurs 34
B) Sur les follicules 35
C) Sur le nombre d'ovulation 35
II-2-2) Insémination artificielle (IA) 35
a. Insemination avec sperme frais 36
b. Insémination avec du sperme congelé 36
c.Mise en place de la semence 38
II-2-3 Préparation des animaux aux opération de collecte ou de transfert 37
II-2-4) la récolte des embryons in vivo 37
a) Technique chirurgicale 37
b) Technique laparoscopique 38
II-2-5) Examen et jugement des embryons 39
II-2-6) Conservation des embryons avant transfert 42
II-2-7) Transfert embryonnaire 42
A) Technique chirurgicale 42
B) Technique laparoscopique 43
II-2-8) Devenir des embryons transférés 43
II-2-9) Facteurs de variation de la production in vivo d'embryons 44
A) Les facteurs intrinsèques 45
a) L'individu 45
b) La race 46
c) L'age 46
d) Etat des ovaires 47
B)Les facteurs extrinsèques 47
a) La saison 47
b) Facteurs nutritionnels 47
c) Le choix de l'hormone du traitement 48

d) doses utilisées....48
e) Répartition des doses et rapport FSH/LH....49
f) Utilisation d'un prétraitement....49
g) Le nombre de traitement....49
h) La technique d'insémination utilisée....50
i) La technique de la récolte utilisée....50
II-3) Les autres biotechnologies....50
II-3-1) Production d'embryons in vitro....50
A) Collecte des ovocytes....51
B) Capacitation in vitro des spermatozoïdes....51
C) Fécondation et développement du zygote in vitro....51
III-3-2) sexage des embryons....51
III-3-3) le clonage....52
III-3-4) La transgénèse....52

PARTIE EXPERIMENTALE

Objectifs....54

CHAPITRE I

EVALUATION DE LA REPONSE OVARIENNE AU TRAITEMENT DE SYNCHRONISATION/SUPEROVULATION

I) INTRODUCTION :....55
II) MATERIEL ET METHODES....55
II-1) Matériel....55
II-1-1) Animaux....55
a)les brebis....55
b)les béliers....55
II-1-2) Appareillage, instruments et produits....56
A) Appareillage et instruments....56
B) Produits....57
II-2) Méthodes....57

II-2-1) Examen échographique 57
II-2-2) Protocole de synchronisation/superovulation 58
A) La synchronisation des chaleurs 58
A-1) Mode d'application des éponges 58
B) La superovulation 58
II-2-3) Détection des chaleurs et saillie 59
II-2-4) Examen endoscopique 60
III) PARTIE RESULTATS 62
III-1) Les donneuses 62
III-1-1) L'expression des chaleurs 62
III-1-2) Evaluation de la réponse ovarienne 62
III-2) Les receveuses : 63
III-2-1) L'expression des chaleurs 63
III-2-2) Evaluation de la réponse ovarienne 63

CHAPITRE II

RECOLTE ET TRANSFERT D'EMBRYONS

I) MATERIEL ET METHODES : 65
I-1) Matériel 65
I-1-1) Animaux 65
I-1-2) Instruments et produits préparation du champ opératoire et des soins post opératoires 65
I-1-3) Matériel et produits de manipulation des embryons 65
I-2) Méthodes 66
I-2-1) Préparation des animaux : 66
I-2-2) Collecte d'embryons : 66
I-2-3) Tri et sélection des embryons 67
I-2-4) Transfert des embryons 68
I-2-5) Soins postopératoire : 68

I-2-6) Diagnostic de gestation.....68
II) PARTIE RESULTATS 69
II-1) Dénombrement direct des corps jaunes..... 69
II-2) La collecte 69
A- Taux de récupération : 69
B- Taux moyen des structures récoltées..... 70
C- Taux de fécondité 70
D- Qualité des structures récoltées.....71

II-3) Résultats du transfert:..... 73
A- Détermination du taux de gestation.....73

CHAPITRE III

Discussion.....75

CHAPITRE IV

Conclusion 80

Références bibliographiques

LISTE DES TABLEAUX

Partie bibliographique

Tableau I : Effectif des principales races ovines locales (MAP, 2004). 2
Tableau II : mensuration du corps des brebis et des béliers Hamra (Ferrouk, 2006). 4
Tableau III : durées des phases du cycle folliculaire chez l'animal non gravide.....12
(Alilo H, 1991). 12
Tableau IV : Récapitulatif des donnés bibliographiques sur la durée de l'oestrus et le moment de l'ovulation 19
Tableau V : conduite de la lutte (Ouattara, 2001).....22
Tableau VI : Chronologie du développement de l'embryon ovin (Torrres et Sevellec, 1987). 24

Tableau VII: Traitements hormonaux utilisés pour l'induction de l'œstrus par la technique des éponges vaginales (Cognié et Mauleon, 1983). 28
Tableau VIII : Effet de l'injection de PMSG après traitement progestatif sur l'intervalle fin de traitement-apparition de l'œstrus (heures). 29
Tableau IX: Effets du rapport FSH/LH et le nombre de doses de pFSH sur la réponse ovulatoire et la production d'embryons (D'Alessandro et al, 2005). 33
Tableau X: comparaison de la réponse ovulatoire et du taux de récolte et de fécondation entre deux traitements de superovulation (FSH, eCG/FSH) chez les brebis Sarda (Giovanni et al, 2001). 34
Tableau XI: Effet des traitements de superovulation sur le début et la durée des chaleurs chez la brebis Rambouillet (Naqvi et Gulyani, 1999). 34
Tableau XII: Effet du type du traitement de superovulation sur le nombre d'ovulation. 35
Tableau XIII : moment de l'insémination des brebis en fonction du type d'IA. (Evans et Maxwell, 1987). 37
Tableau XIV: classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCEIA ,1990). 41
Tableau XV : Fertilité après un transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis.....44
(Brebion et al ; 1992). 44
Tableau XVI : Taux de mise bas et de survie embryonnaires après transfert direct ou traditionnel d'embryons vitrifies (Baril et al ,2001) 44

Tableau XVII: effet de la race sur la réponse ovulatoire au traitement de stimulation ovarienne. 46
Tableau XVIII: Variation du taux d'ovulation selon l'âge. 47
Tableau XIX: Effet du type de traitement de stimulation ovarienne sur la réponse et le nombre d'embryons transférables par femelle traitée (Cognie, 1984) 49
Tableau XX: Production d'embryons chez la brebis après un prétraitement avec un antagoniste de GnRH (Antarelix®) de 11 injections (0.5mg/j) et de 3 injections (1.5, 0.5 et 0.5mg) à 5 jours d'intervalle (Cognie et al, 2003). 50
Tableau XXI: Nombre et qualité des embryons produits par les brebis Santa Inês soumises à deux traitements successifs avec pFSH (Cordeiro et al, 2002) 50

Partie expérimentale

Tableau I: Résultats de la détection des chaleurs chez les brebis superovulées. 62
Tableau II: Réponse ovarienne globale chez les brebis superovulées 62
Tableau III: Réponse ovulatoire par ovaire chez les brebis superovulées 63
Tableau IV: Résultats de détection des chaleurs chez les receveuses. 63
Tableau V: Réponse ovulatoire chez les receveuses 64
Tableau VI: taux de récupération 69
Tableau VII : Taux moyen des structures récoltées par brebis. 70
Tableau VIII: Taux moyen des structures récoltées par corne. 70
Tableau IX: taux de fécondité 70
Tableau X: classification des embryons selon leur qualité. 71
Tableau XI : Nombre et taux d'embryons transférables 72
Tableau XII: taux de gestation 73
Tableau XIII : Taux de viabilité des embryons transférés 73

LISTE DES FIGURES

Partie Bibliographique

Figure n°1: Représentation schématique des mécanismes physiologiques de régulation de l'activité sexuelle par la photopériode chez les petits ruminants. SCG : Superior Cervical Ganglion (D'après Senger ,1997). 9

Figure n°2: Représentation schématique de la croissance folliculaire (Secchi, 1975). 11

Figure n°3 : Principaux événement de la folliculogénèse terminale au cours de la phase folliculaire terminale, processus de recrutement, sélection et dominance (Thibault et Levasseur, 2001). 14

Figure n°4 : Présentation schématique du cycle oestral de la brebis (Colin, 2004).....15

Figure n°5: L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien (Hanzen, 2005). 16

Figure n°6 : Comportement sexuel lors de l'œstrus (Florence et al, 2005). 21

Figure n°7 : Chronologie de développement embryonnaire (J0 à J9) chez l'espèce ovine (Torrres et Sevellec, 1987).....25

Figure n°8: Influence de l'administration de PMSG sur le moment d'appariation des chaleurs après un traitement de progestagène chez la brebis en anœstrus saisonnier (Cognié et al, 1970).....29

Figure n°9 : Exemples de protocoles d'utilisation de la méthode mélatonine en combinaison avec la pose d'éponges vaginales (d'après CEVA Santé animale).....31

Figure n°10 : Protocole de synchronisation/superovulation à base de progestagène pendant 12 jours et de PMSG.....32

Figure n°11 : Protocole de synchronisation/superovulation à base de progestagène pendant 12 jours et de pFSH (Giovanni et al, 2001).....33

Figure n°12: Insémination cervicale chez la brebis (Youngquist, 1997).....36

Figure n°13: Insémination intra-utérine par endoscopie chez la brebis (Youngquist, 1997) 36

Figure n°14 : Méthode de collecte chirurgicale des embryons (D'après Vallet et al, 1991).38

Figure n°15 : Collecte par technique laparoscopique avec sonde 3 voies. (D'après Vallet et al, 1991) 39

Figure n°16 : Transfert embryonnaire par méthode laparoscopique(D'après Youngquist, 1997).....44

Figure n°17 : Variabilité de la réponse ovulatoire : distribution des femelles donneuses en fonction du nombre d'ovulation après traitement FSH (Brebion et al ,1992). 45

Figure n°18 : Répartition des femelles en fonction du nombre d'ovulations ; après 20mg de FSH (n =226) (Brebion et al, 1992)……46

Partie experimentale

Figure n°1 : Protocole de synchronisation/superovulation des brebis donneuses et receveuses……59
Figure n°2 : Schéma de montage de deux embryons pour un transfert en frais……67
Figure n°3 : Qualité des embryons des donneuses……71

LISTE DES ABREVIATIONS

CAP : acétate de chlormadinone.

CJ: corps jaune.

E2: œstradiol.

eCG: equine Chorionic Gonadotropin.

FGA : acétate de fluorogestone.

FSH: Follicule Stimulating Hormone.

FVI: La fécondation in vitro.

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone.

hCG : human Chorionic Gonadotropin.

IA : Insémination Artificielle.

IETS: International Embryo Transfer Society.

IM: Intramusculaire.

LH: Luteinizing Hormone.

LTH : la prolactine.

MAP : acétate de medroxyprogestérone.

MGA: acetate de mélengestérone.

MOET: Multiple Ovulation and Embryon Transfer.

oFSH: ovine Follicule Stimulating Hormone.

OPU: Ovum Pick Up.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

pFSH: porcine Follicule Stimulating Hormone.

PGF2α: Prostaglandine F2 Alpha.

pLH :porcine Luteinizing Hormone.

PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotropin.

T.E : transplantation embryonnaire.

ZP : zone pellucide.

Introduction générale :

L'ovin est la plus importante espèce domestiquée en Algérie, elle occupe une place importante dans l'économie rurale, avec un effectif de 18.293.000 têtes (MAP, 2004). Le cheptel ovin local représente la ressource la plus importante en viande rouge, assurée essentiellement par les trois races principales (Ouled Djellal, Hamra et Rumbi).

La race Hamra est considérée comme la meilleure race à viande en Algérie, en raison de sa bonne conformation bouchère (finesse de son ossature et la rondeur de ses lignes), ce qui lui a valu, dans le passé, une grande réputation sur les marchés des pays Nord méditerranéens sous l'appellation du « petit oranais ». Cependant, au cours des quatre dernières décennies des changements notables dans la composition raciale des troupeaux ont été observés, et qui se réalisent au détriment de la race Hamra (Ayachi, 2002).

Afin de préserver cette race, il est alors nécessaire de maîtriser la reproduction pour fournir un plus grand nombre d'agneaux nés par brebis et par an de qualité voulue et au moindre coût.

Les biotechnologies de la reproduction, et en particulier la transplantation embryonnaire, en sont un des moyens. En effet, l'induction d'ovulation multiples et la transplantation embryonnaire (MOET) a toutefois permis une avenue plus pratique pour parvenir à multiplier la descendance des femelles à haut potentiel génétique au delà de leurs possibilités naturelles.

L'induction d'ovulations multiples (superovualtion) nécessite une stimulation hormonale des femelles donneuses. Cependant, plusieurs études ont montré pour les caprins et les ovins, des différences de réponses au traitement de superovulation en fonction de la race (Armstrong et Evans, 1983). Aussi, des études comparatives (Cognié et Baril, 2002) ont montré la supériorité des extraits hypophysaires porcins (pFSH) en termes de production d'embryons aptes au transfert.

En effet, la dose totale efficace pour obtenir une réponse ovulatoire optimale, varie largement selon la préparation hormonale et le génotype de la donneuse, et devrait être déterminée préalablement au moyen d'une courbe dose réponse.

Dans cette optique, Il nous a paru essentiel d'essayer dans un premier temps de maîtriser la technique MOET et de déterminer la dose optimale à utiliser chez les brebis de race Hamra, afin de pouvoir appliquer cette biotechnologie de reproduction comme moyen de préservation des races en voie de disparition.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Les races ovines algériennes et présentation de la race Hamra

I) Introduction :

L'ovin est l'espèce de ruminants la plus répandue dans notre pays vu l'importance de son effectif qui représente 81,6% du troupeau, comparativement aux caprins 11,4%, aux bovins 6,4% et aux camélidés 0,6% (MAP, 1998). L'effectif ovin a été estimé en 2004 à18.293.300 têtes dont prés de 12.314.998 reproductrices (MAP, 2004). Cela est peut être du à la domestication du mouton qui remonte à la plus haute antiquité et aux conditions climatiques qui sont favorables au développement de cette espèce.

La rusticité et l'adaptation des races ovines algériennes au milieu aride steppique et leur mode d'alimentation basé essentiellement sur la végétation naturelle, font que leur concentration est très importante dans les régions steppiques et les hauts plateaux, et à l'apparition d'un type d'élevage basé sur le nomadisme (Chellig, 1992).
Cependant le système d'élevage reste traditionnel avec une productivité limitée, de 0,62 agneaux/brebis/an, liée surtout à son aspect extensif et aux conditions du milieu dans lequel il évolue (Boutonet, 1989).

II) Les races ovines algériennes et présentation de la race Hamra :

II-1) les races ovines algériennes:

Les races ovines algériennes sont réparties en deux classes : races principales et races secondaires (Chellig, 1992)

II-1-A) Les races principales:

Selon Chellig (1992), il y'a trois races : la race **Ouled Djellal**, la race **Rumbi** et la race **Hamra**. La répartition des principales races ovines locales est rapportée dans le tableau I.

Tableau I : Effectif des principales races ovines locales (MAP, 2004).

Race	Femelles	Males	Total
Ouled Djellal	5.337.770	3.050.154	8.387.924
Hamra	3.355.170	1.525.077	4.880.247
Rumbi	2.440.123	915.046	3.355.169
Total	11.133.063	5.490.278	16.623.341

a) La race Ouled Djellal (arabe blanche) : est la plus importante et la plus intéressante, car elle forme presque la moitié de l'effectif total avec plus de 8,3 million de têtes (MAP, 2004). Cette race est introduite en Algérie au XI ème siècle, du Hidjez par les Ben Hillel. Elle est résistante aux zones arides, elle supporte la marche sur de longues distances mais elle craint le froid. Elle-même se devise en plusieurs types, dont on cite le type Hodna (le plus lourd) et le type Ouled Djellal (le type marcheur).

b) La race Rumbi : a les mêmes caractéristiques que la race blanche de Ouled Djellal, avec les membres et la tête fauves. Elle est robuste, les pattes sûres, les sabots durs et les cornes sont énormes chez les béliers. Cette race est adaptée à la marche, également aux sols rocailleux secs et elle supporte mieux le froid.

c) La race Hamra : (Beni-Ighil) :

c-1) Présentation de la race Hamra :

La race Beni-Ighil dite Hamra est une race berbère dont l'aire géographique d'extension va du chott Chergui à la frontière marocaine. Elle couvre également tout le haut Atlas marocain chez la tribu des Béni-Ighil d'ou elle tire son nom.

C'est la meilleure race à viande en raison de la finesse de son ossature et de la rondeur de ses lignes (gigots et côtes). Elle est très demandée par les français sous le nom du « MOUTON ORANAIS ».

Elle est de petite taille à ossature fine et aux formes arrondies. La tête et les pattes sont rouge acajou foncé, la toison est blanche et tassée (Cf. photo n°2).

c-2) Berceau de la race :

Son aire d'expansion est comprise entre le chott chergui à l'Est, l'atlas saharien au Sud- Est et les monts de Tlemcen et de Saida au Nord.

La race Hamra comporte trois types principaux :

- Type **d'El Bayadh** : d'une couleur acajou foncé, localisé dans la daïra de Mechria.
- Type d'**El Aricha** : c'est le plus préféré, de couleur acajou presque noire, situé à la frontière marocaine.
- Type **Malakou** et **Chott Chirgui** : de couleur acajou clair

c- 3) Description physique:

- **Couleur**: la peau est brune, les muqueuses noires, la tête et les pattes sont brunes, rouges foncé, presque noires. La laine est blanche au jarre volant brun roux.
- **Cornes**: Spiralées, moyennes
- **Oreilles**: Moyennes pendantes
- **Profil**: Convexe, busqué
- **Queue** : Fine, longueur moyenne
- **Conformation**: Corps petit mais court trapu et large, gigot court et rond, le squelette est fin.

Photo n°1 : Bélier Hamra (Hamaidi, 2007)

Photo n°2: Brebis Hamra (Hamaidi, 2007)

Les mensurations du corps sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : mensuration du corps des brebis et des béliers Hamra (Ferrouk, 2006).

	Hauteur (m)	**Longueur (m)**	**Profondeur (m)**	**Poids du corps (kg)**
Béliers	0,76	0,71	0,36	71
Brebis	0,67	0,70	0,25	40

c- 4) Caractéristiques de reproduction :(Chellig ,1992).

- L'âge de la brebis au premier œstrus est de 12 mois.
- L'âge de la brebis au premier agnelage est de 18 mois.
- La Fécondité est de 90%.
- La Prolificité varie de 110 à120%.
- La longévité varie de 10 à 12 ans pour les béliers et de 08 à 10 ans pour les brebis.

c- 5) Caractéristiques de production : (Chellig, 1992)

- Le poids à la naissance est de 2,5kg.
- Le poids au sevrage à 4 mois est de 25kg.
- Le poids du broutard (Allouche) à 1an.
- Le poids à l'abattage : 42 à 45kg.
- La croissance moyenne journalière pendant l'engraissement : 150 à 180g.

- **Viande :** c'est un mouton à viande par excellence, chaire fine à saveur appréciée.
- **lait :** la production totale est de 50 à 60kg pendant 4 à 5 mois avec une bonne aptitude à la traite.
- **laine :** le poids de la toison non lavée est de 1,5 à 2kg pour la brebis et 2,5 à 3kg pour le bélier .Cette toison tassée à mèche carrée dont la longueur est de 5 à 7cm et d'une finesse moyenne de 25 à 26 microns.

II-1-B) Les races secondaires :

Les races dites secondaires sont estimées à 1.669.959 têtes. Ce cheptel est inégalement réparti sur le territoire national avec 75% de l'effectif localisé dans la steppe. Elles sont représentées par quatre races : **Berbère, Barbarine, D'men et Targuia-Sidaou** (Chellig ,1992).

a) La race Berbère : à l'aine zou lai (mouton des montagnes du tell) est de petite taille, à l'aine mécheuse blanche brillante. D'un effectif de 1 .000 .000 de têtes, elle est localisée dans la chaîne montagneuse du nord algérien.

b) La race Barbarine : localisée à Oued souf, est à grosse queue, apparentée au mouton tunisien et asiatique avec un effectif approximatif de 50.000 têtes.

c) La D'men : est une race saharienne répandue dans les oasis du Sud-Ouest algérien, à l'aine grossière qui couvre le haut du corps seulement et à queue fine, elle est très prolifique, son effectif est estimé à 30.000 têtes.

d) La Targuia-Sidaou : élevée par les Touaregs, elle est recouverte de poils, n'a pas de laine avec une queue longue et fine. Elle semble qu'elle est d'origine du Soudan, son effectif est de 20.000 têtes.

CHAPITRE II

Rappels anatomiques et physiologiques sur la reproduction ovine

I) Anatomie de l'appareil génital de la brebis :

L'appareil génital de la brebis comporte trois grandes parties (Barone ,1990) (Cf. photo n°3)

- la section glandulaire, constituée par les ovaires.
- la section tubulaire, constituée par les oviductes et l'utérus.
- le sinus urogénital ou section copulatrice, comprenant le vagin et la vulve.

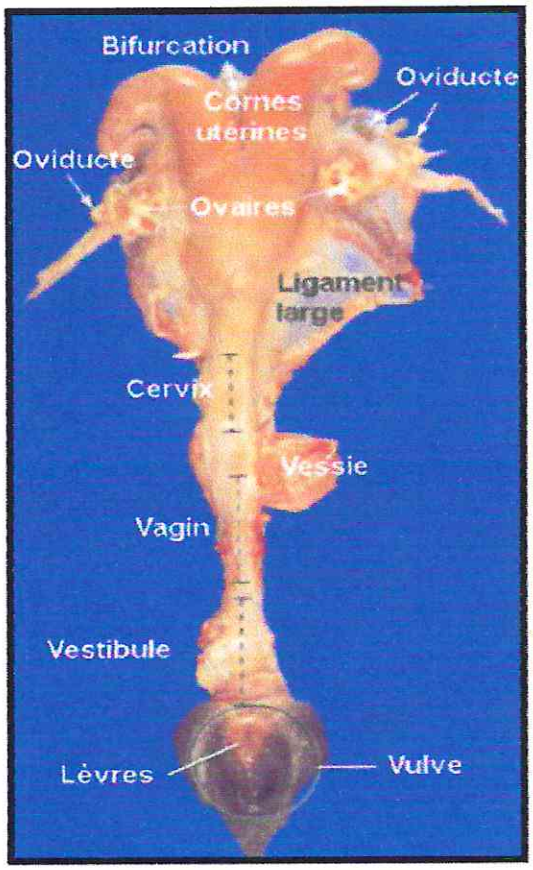


Photo n°3 : Photographie de l'appareil génital de la brebis (Jean-Loup Bister, 2002).

I -1) section glandulaire

a) Les ovaires: Les ovaires, gauche et droit, sont suspendus dans la cavité abdominale par le ligament large (Soltner, 1993). Ils sont aplatis mesurant 1,5cm de longueur et pèse 3 à 10g (Barone, 1990). L'ovaire est composé de deux tissus distincts: la partie médullaire, ou stroma, qui comprend du fibroblaste, des nerfs et des vaisseaux sanguins et, le cortex dans lequel les différents types de follicules se développent. C'est dans ce dernier que se déroule la folliculogénèse. (Boukhliq, 2002)

I-2) Section tubulaire

a) L'oviducte : C'est un organe tubulaire qui va de l'ovaire à la corne utérine correspondante. Tube circonvolutionné de 15 - 19 cm de long, il est constitué, dans l'ordre, du pavillon qui capture l'ovule pondu par l'ovaire lors de l'ovulation, de l'ampoule et de l'isthme qui est relié à la corne utérine (Cf. photo 4). Il est logé dans le ligament large (Barone, 1990).

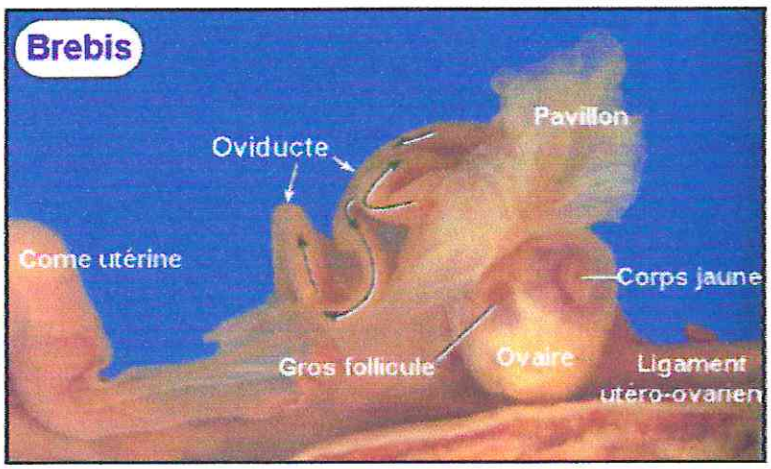


Photo n°4 : Photographie de l'oviducte de brebis (Jean-Loup Bister, 2002)

a-1) Le pavillon en forme d'entonnoir, a une surface d'environ 6 - 10 cm^2 chez la brebis. L'ouverture du pavillon est rattachée en un seul point central à l'ovaire (Vaissaire, 1977).

a-2) L'ampoule est la partie la plus longue et la plus large de l'oviducte où les oeufs sont conservés plusieurs jours après l'ovulation. (Boukhliq, 2002).

a-3) L'isthme est la partie la plus courte et la plus étroite de l'oviducte. Il est directement relié à l'utérus par la jonction utero tubaire. Il joue le rôle de filtre physiologique dans la remontée des spermatozoïdes jusqu'à l'ampoule (Soltner, 1993).

b) L'utérus. Il est constitué de trois parties: les deux cornes utérines (10-15 cm de long), le corps utérin (1-2 cm de long), et le cervix (4-10 cm de long, 2-3 cm de diamètre). L'endomètre et le myomètre composent la paroi utérine. (Boukhliq, 2002).

b-1) les cornes : c'est le lieu où se font la nidation et le développement embryonnaire. Elles sont accolées dans une grande étendue, comme les canons d'un fusil à deux coups. Leur longueur est de 10 à 12cm. (Soltner, 1993)

b-2) le corps : il est compris entre les cornes et le col. Sa longueur est d'environ 2cm (Craplet et Thibier, 1984).

b-3) Le col ou cervix : il forme la troisième partie de l'utérus. Ce sphincter qui se jette dans le vagin possède une paroi musculaire très épaisse. La muqueuse et

l'épithélium présentent une morphologie originale avec de nombreux replis ou cryptes ainsi que des canaux ciliés (Jean-Loup Bister, 2002).

I-3) Sinus urogénital:

a) Le vagin: C'est l'endroit où la semence est déposée lors de la saillie. De 10 à 12cm de long (Craplet et Thibier, 1984).

b) Les organes génitaux externes: Ils sont constitués du **vestibule**, de la **grande lèvre** et de la **petite lèvre** qui possède des glandes sécrétant un liquide visqueux qui facilite la copulation, du **clitoris** qui est un organe érectile et sensible (Soltner, 1993).

II) Physiologie de la reproduction ovine :

L'espèce ovine, comme les espèces caprine et équine, se distingue des autres espèces par le caractère saisonnier de la reproduction.
Chez les ovins, la saison de reproduction, période où l'activité sexuelle est maximale, correspond à la période des jours décroissants ; le reste de l'année où l'activité sexuelle est faible ou nulle (période de jours longs) est qualifiée d'anoestrus saisonnier (Colin, 2004).

II-1) Saisonnalité de l'activité sexuelle :

II-1-A) Les facteurs déterminants la saisonnalité :

L'un des éléments les plus importants de la reproduction chez les ovins est la saisonnalité, ce n'est pas l'exclusivité de cette espèce. La reproduction ovine suit un rythme saisonnier, c'est-à-dire avec une alternance de périodes d'anoestrus et d'activité sexuelle. Dans les régions tempérées, la saisonnalité est sous le control de la photopériode, c'est-à-dire de l'évolution de la durée des jours : les jours courts ont la particularité de stimulé l'activité sexuelle, et les jours longs entraînent les périodes d'anoestrus (Evans, 1987 ; Henderson, 1991).
Chez les races photopériodiques, la mélatonine traduit les effets de la lumière sur la reproduction (Driancourt et al, 1991). Tandis que le photopériodisme est le principal facteur influençant l'activité saisonnière des moutons, d'autres facteurs, tels que la génétique (certaines races sont plus résistantes aux variations lumineuses), les conduites d'élevage (effet male) et les interactions sociales, peuvent modifier le plan de reproduction (Evans, 1987 ; Henderson, 1991).

II-1-B) Mécanisme de régulation de l'activité sexuelle par la photopériode :

Physiologiquement, les animaux à reproduction d'automne sont en anoestrus saisonnier le reste de l'année. Il a été prouvé que, durant cette période, la sécrétion de gonadolibérine (GnRH) par l'hypothalamus est très faible, d'où une très faible sécrétion de FSH et LH par l'hypophyse antérieure et une absence de cyclicité sexuelle. Une neurohormone sécrétée par la glande pinéale, la mélatonine, présente une activité stimulatrice sur l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les petits ruminants. De plus, chez ces espèces, la sécrétion de cette neurohormone est inversement corrélée aux stimulations lumineuses de la rétine (Clément, 2006).

Ainsi, durant les mois où la photopériode est longue, les nerfs rétiniens sont fortement excités et vont inhiber la glande pinéale par le biais du ganglion cervical superficiel. La mélatonine est alors beaucoup moins sécrétée et l'activité de l'axe hypothalamo- hypophysaire fortement déprimée, d'où un anoestrus chez les petits ruminants. Au contraire, quand la photopériode est plus courte, les nerfs rétiniens sont moins excités et la glande pinéale est très peu inhibée. La mélatonine est alors sécrétée beaucoup plus souvent, d'où une stimulation importante de l'hypothalamus qui va produire de la GnRH à une fréquence plus importante. Les hormones gonadotropes (FSH et LH) sont en réaction sécrétées en plus grande concentration et l'activité des glandes sexuelles se met en place (Senger, 1997) **(cf. figure n°1).**

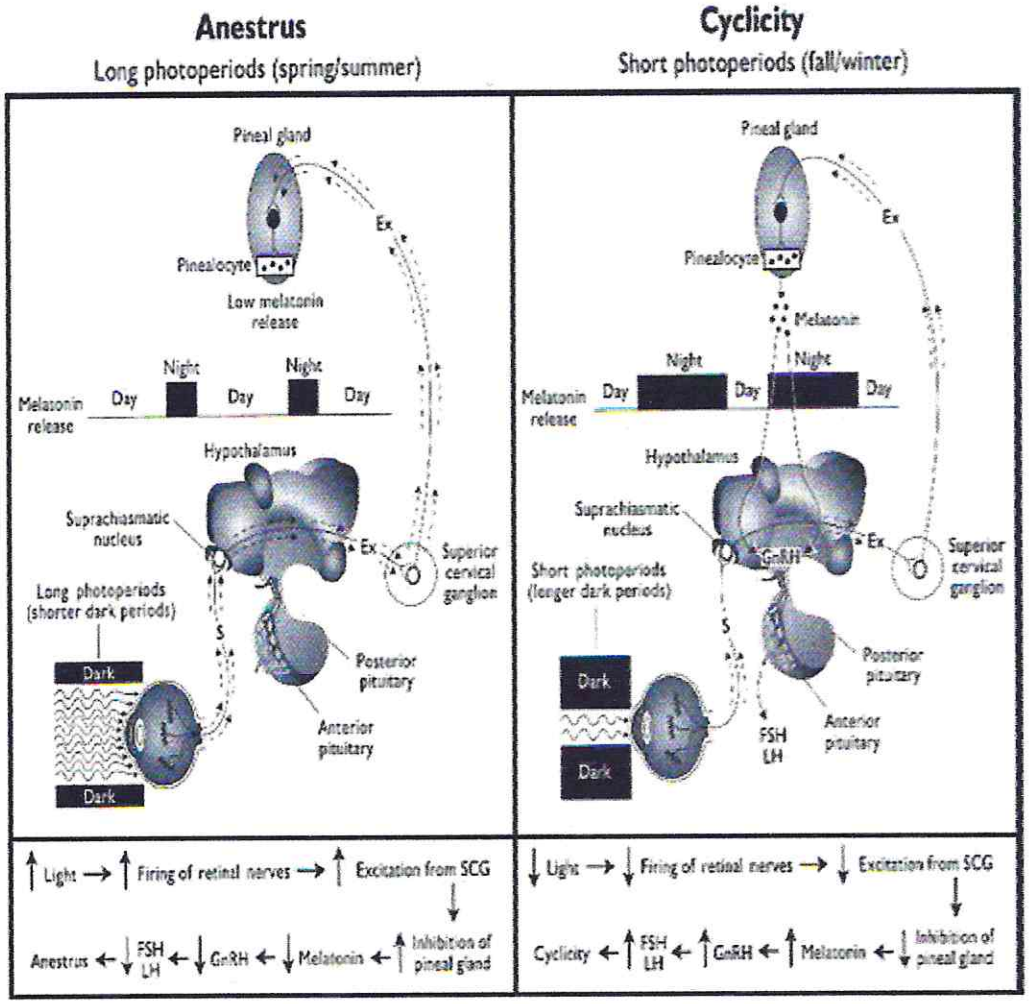


Figure n°1: Représentation schématique des mécanismes physiologiques de régulation de l'activité sexuelle par la photopériode chez les petits ruminants. SCG : Superior Cervical Ganglion (D'après Senger ,1997).

La saisonnalité agit non seulement sur les animaux sexuellement matures mais aussi sur l'apparition de la puberté chez les jeunes.

Cependant, la génétique, ainsi que la date de la naissance, jouent un rôle important sur le moment d'apparition de la puberté; par conséquent le photopériodisme à un effet permissif déterminant l'animal soit à venir en chaleur à un âge précoce, soit à retarder sa puberté de plusieurs mois (Intervet, 1993).

Même si les béliers sont théoriquement capables de saillir toute l'année, une baisse de libido et une diminution de quantité ou de la qualité du sperme en dehors de la saison de reproduction sont responsables d'une diminution des résultats de fécondation à contre saison de reproduction (Henderson, 1991).

II-2) Aspects morphologiques du développement folliculaire (folliculogenèse) :

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis où il sort de la réserve jusqu'à l'ovulation ou plus fréquemment jusqu'à l'atrésie (Green, 1972).

Chez le fœtus ovin, cette folliculogénèse débute à partir du 70ème jour de gestation, c'est-à-dire dès que les premiers follicules primordiaux sont formés. Les agnelles possèdent entre 100.000 et 200.000 follicules à la naissance (Land, 1970).
Les étapes du développement folliculaire (folliculogenése) sont au nombre de trois, la phase de multiplication, la phase de croissance et la phase de maturation.

II-2-A) Phase de multiplication :

Sitôt établie la différentiation sexuelle embryonnaire, les cellules germinales primordiales colonisent la crête génitale et donnent naissance aux ovogonies. Celles-ci se multiplient et seront entourées par quelques cellules endothéliformes et une membrane conjonctive (membrane de Slavjanski) formant ainsi les follicules primordiaux (Hanzen, 2000).

A la naissance, la population des follicules ovariens, principalement formée par les follicules de la réserve ovarienne est d'environ 160.000 chez la brebis (Thibault et al, 1991). Le nombre de follicules en croissance représente toujours une faible proportion de l'effectif folliculaire total (Gougeon, 1996).

II-2-B) Phase de croissance :

Cette phase est caractérisée par les modifications concernant toute à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme (Monniaux et al, 1983).Elle ne concerne que 10% du stock folliculaire. L'ovaire de brebis contient 100 à 400 follicules en croissance parmi lesquels 10 à 40 sont visibles sur l'ovaire (Hanzen, 2000)

La durée de croissance folliculaire depuis la sortie de la réserve folliculaire jusqu'à l'ovulation est estimée à environ 6 mois chez la brebis, soit 130 jours jusqu'à l'apparition de l'antrum, puis environ 45 jours jusqu'à l'ovulation (Cahill et Mauléon, 1980).

Le développement folliculaire est continu et comprend les stades de follicule primordial, primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaire et de De Graaf représentant les follicules antraux (Monniaux et al, 1983) (cf. figure n°2).

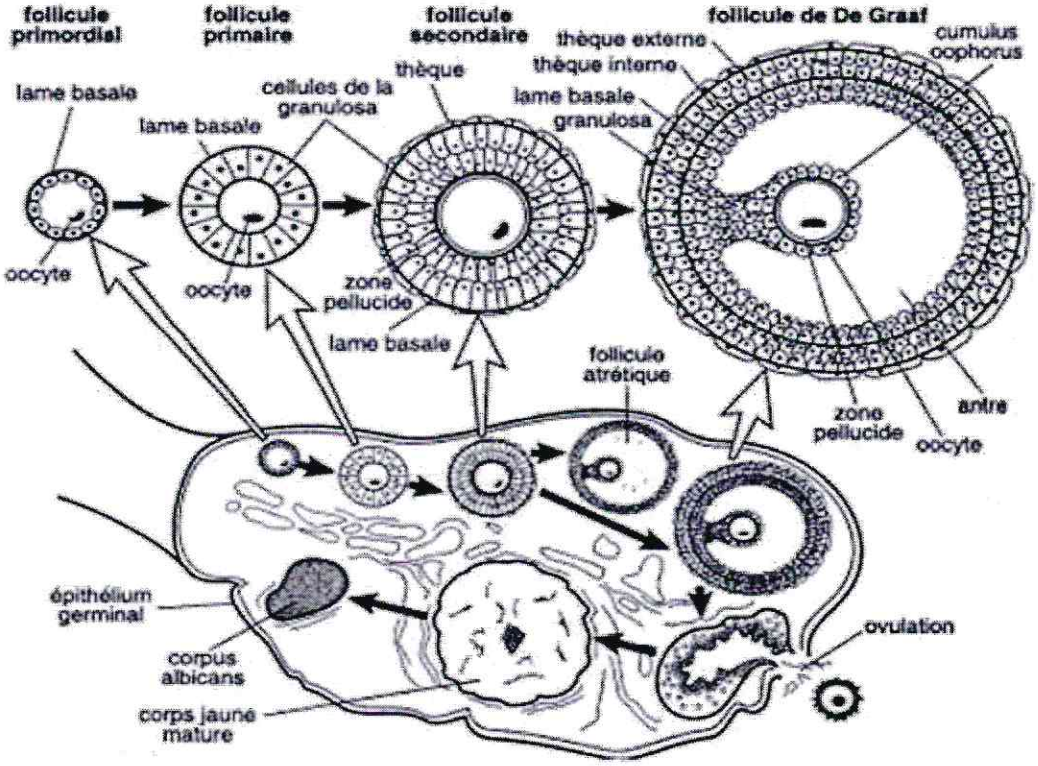


Figure n°2: Représentation schématique de la croissance folliculaire (Secchi, 1975).

Le follicule primordial se caractérise par un ovocyte entouré par une seule couche de cellules épithéliales aplaties : les cellules de la pré-granulosa (Byskov et al, 1979). Il représente le stade folliculaire quiescent. Cette population de follicules, qui est à son maximum pendant la vie fœtale, représente la réserve d'ovocytes pour la vie reproductive (Driancourt et al, 1991).

La transition du follicule primordial au **follicule primaire** qui se caractérise par une croissance de l'ovocyte (Monniaux et al, 1999), par l'agencement à sa surface, d'une couche régulière de cellules cubiques. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse : la zone pellucide (ZP) (Yanagimachi, 1994).

Le passage du stade follicule primaire au **follicule secondaire** est caractérisé par la prolifération des cellules de la granulosa qui s'organisent en une structure pluristratifiée autour de l'ovocyte (Monniaux et al, 1999). Au stade follicule secondaire l'ovocyte a atteint son volume maximal, il s'est entouré d'une zone pellucide bien différenciée, l'ensemble est limité extérieurement par la membrane basale ou membrane de Slavjanski (Hanzen, 2000).

Le **follicule tertiaire** est dit cavitaire ou antral en raison de l'apparition au sein des couches de cellules folliculaires de petites cavités résultant de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de la sécrétion des cellules de la granuleuse et qui finissent par confluer pour former l'antrum (Hanzen, 2000). Le volume de l'ovocyte reste inchangé mais les cellules qui l'entourent se disposent de manière radiée d' où le nom de corona radiata donné à cette couche cellulaire péri ovocytaire. A ce stade et

chez tous les mammifères, le follicule cavitaire s'entoure, en dehors de la membrane de Slavjanski, d'une double enveloppe constituée par la thèque interne, faite de cellules interstitielles riches en ARN et en enzymes nécessaires à la stéroidogenèse,et par la thèque externe formée d'un tassement de tissu conjonctif du stroma ovarien (Hanzen, 2000).

Le **follicule de De Graaf** représente la phase terminale du développement folliculaire, cette phase ne concerne qu'un follicule sur 1000 entrés en croissance (Saumande, 1991).

Le follicule mûr se caractérise par une taille maximale de 10 mm chez la brebis (15 mm chez la vache), un nombre maximal de cellules granuleuses et par une activité mitotique minimale de la granuleuse, gonflé de liquide, le follicule affleure la surface de l'ovaire.

L'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire, le cumulus oophorus. Les thèques interne et externe sont bien différenciées et la membrane basale est bien visible entre les cellules folliculaires et la thèque interne. La thèque interne est une glande à part entière.

La thèque externe est de nature fibreuse. Une fois l'antrum formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et de la membrane basale.
La taille du follicule passe en 45 jours de 0.2-0.4 mm à 6-8 mm chez la brebis (16 mm chez la femme) (Hanzen, 2000).

La durée permettant la réalisation de toutes ces étapes excède de beaucoup la durée du cycle chez toutes les espèces (Monniaux et Monget, 1997) (cf. tableau III).

Tableau III : durées des phases du cycle folliculaire chez l'animal non gravide (Alilo H, 1991).

Espèce	Phase pré-antrale (jours)	Phase antrale (heures)	Phase pré-ovulatoire (heures)	Phase lutéale (jours)
Brebis	inconnue	4-5	22	14-15
Vache	inconnue	10	40	18-19
Jument	inconnue	10	40	15-16

II-2-C) Phase de maturation :

Elle représente l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte de l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, à assurer la formation des pronucléus mâle et femelle et à permettre grâce à ses réserves (ARNm, ribosomes, protéines élaborées pendant la phase de croissance) le début du développement embryonnaire. Elle est induite par le pic

ovulatoire, elle implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte.

Lors du cycle sexuel, la maturation nucléaire ne survient qu'après la décharge ovulante. Elle prend fin juste avant l'ovulation lors de l'émission du premier globule polaire dans l'espace périvetellin ovocytaire (Hanzen, 2000).

II-3) Notion de vague de croissance folliculaire :

Le développement folliculaire apparaît non pas de manière aléatoire mais sous la forme de croissance et régression synchrones de plusieurs follicules, appelées vagues. Une fois recrutés dans la réserve des follicules de diamètre supérieur à 2 mm, le follicule ovulatoire entame sa croissance vers le 1ème jour du cycle c'est-à-dire au moment du début de la lutéolyse. Cette croissance se poursuit ensuite pendent 4 jour au rythme de 1.2 à 1.4 mm/jour. Le rythme de croissance dépend cependant de la race de l'animal (Hanzen, 2000).
Cette phase de croissance est strictement dépendante des gonadotrophines.
De nombreux travaux ont montré que :

- Lorsque les niveaux de FSH diminuent, les autres follicules antraux régressent alors que le follicule dominant continue sa croissance (Ireland et Roche, 1983; Zelenick, 1993).
- Lorsque le follicule dominant acquiert des récepteurs LH en fin de cycle, il devient alors dépendant de la LH plutôt que de la FSH (Savio et al, 1993; Ginther et al, 1996; Roche, 1996). En effet, le follicule dominant semble être sous l'influence de la LH qui stimule la production d'androsténedione par les cellules de la thèque et son aromatisation en œstradiol par les cellules de la granulosa.

Le follicule dominant libère de grandes quantités d'œstradiol (Staigrniller et al, 1982) et d'inhibine (Findlay et al, 1991) qui vont agir au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire pour diminuer la sécrétion de FSH (Findlay et al, 1991 ; Adams et al, 1993; Ginther et al, 1996).

En phase lutéale, le corps jaune secrète de fortes concentrations de progestérone qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la libération de LH. La diminution de LH induit la régression du follicule dominant et permet l'augmentation des niveaux de FSH résultant en l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire (Sirois et Fortune, 1990; Stock et Fortune, 1993; Taylor et Rajamahendran, 1994).

Cependant, en phase folliculaire, alors que les concentrations de la progestérone sont faibles, la pulsatilité de la LH augmente entraînant une augmentation des concentrations d'œstradiol libérées par le follicule dominant et indirectement provoque le pic préovulatoire de LH. Ceci cause l'ovulation du follicule dominant (Lavoir et Fortune, 1990; Taylor et, Rajamahendran 1994). Dés le lendemain de la première ovulation, une nouvelle vague s'amorce (Thibault et Levasseur, 2001).

II-3-A) Notion de recrutement, sélection et dominance :

C'est en 1980 que Di Zerega et Hodgen ont pour les primates proposés les concepts de recrutement, sélection et dominance. Leurs études histologiques in vitro ont par la suite été confirmées in vivo chez la vache par échographie et chez la brebis par marquage à l'encre des follicules (Hanzen, 2000).

Tous les follicules gonadotropes dépendants présents sur les ovaires, entrent alors en croissance terminale (***recrutement***), ils forment alors une « cohorte » (Cf. figure n°3) qui comprend plusieurs follicules de taille et de sensibilité différentes aux gonadotropes. A mi-phase folliculaire, une ***sélection*** se produit et la taille de la cohorte est réduite en nombre d'ovulation caractéristique de la race ou de l'espèce (1 à 2 chez la plupart des races ovines, 15 à 20 chez la truie).
Le (ou les) follicule destiné à ovuler, reconnaissable par la taille, est appelé follicule dominant.

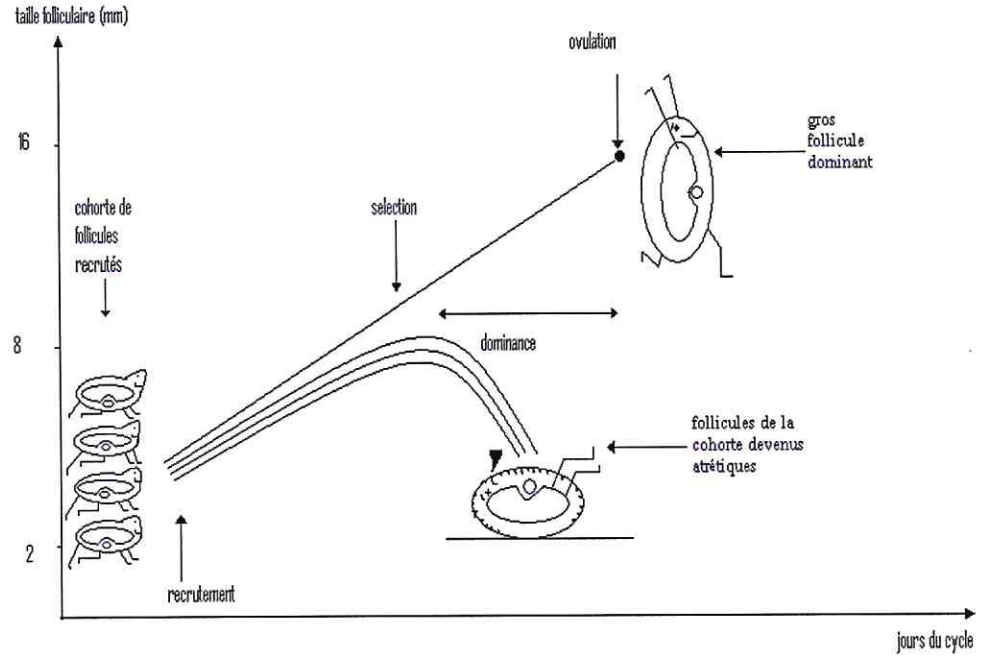


Figure n°3 : Principaux événement de la folliculogénèse terminale au cours de la phase folliculaire terminale, processus de recrutement, sélection et dominance (Thibault et Levasseur, 2001).

Pendant la période de ***dominance*** sont observés (Driancourt, 2001):

- la croissance et la maturation terminale du (ou des) follicule préovulatoires.
- La régression par atrésie des autres follicules de la cohorte.
- Le blocage du recrutement de nouveaux follicules.

II-4) Le cycle sexuel :

Le cycle sexuel est la manifestation de l'activité sexuelle cyclique des femelles, recouvre à la fois le cycle ovarien et le cycle œstral (Legan et al, 1981).
Les cycles sexuels se succèdent à intervalles réguliers pendant toute la saison sexuelle. Leur durée étant en moyenne de 16-17 jours (Colin, 2004) avec une

variabilité de 14 à19 jours (Derivaux et Ectors, 1989). Cependant en période de transition entre l'anoestrus et la saison sexuelle (à la fin de l'été), des cycles courts de moins de 12 jours sont fréquemment observés. Il est courant que les premières ovulations de la saison ne s'accompagnent pas de comportement d'oestrus, on parle alors de « chaleurs silencieuses » (Evans, 1975).
Comme chez les autres espèces, on divise le cycle oestral en deux phases (Cf. figure n°4):

II-4-A) La phase folliculaire :

Elle correspond à la période de la croissance folliculaire jusqu'à l'ovulation, d'une durée de 2 jours en moyenne avec des écarts allant de 2 à 3 jours (Driancourt et al, 1991). Les hormones gonadotropes (FSH et LH) produites par l'hypophyse vont provoquer dans l'ovaire le déclenchement des dernières étapes du développement d'un ou plusieurs follicules. Ces follicules produisent des œstrogènes qui vont entraîner l'apparition des chaleurs. La fin de la phase folliculaire est marquée par l'éclatement du follicule qui libère alors l'ovule: c'est l'ovulation, environ 30 heures après le début des chaleurs (Boukhliq, 2002). Soit 23-25 heures après la décharge ovulatoire (Chaffin, 1999).

II-4-B) La phase lutéale :

Qui prépare l'utérus pour l'implantation de l'embryon. Si la brebis n'a pas été fécondée, la phase lutéale est interrompue au bout de 13 à 14 jours et laisse place à une nouvelle phase folliculaire et donc à un nouveau cycle sexuel (Khiati, 1999). Après l'ovulation, le follicule se transforme en Corps jaune qui va produire de la progestérone tout au long de la phase lutéale, bloquant ainsi la libération d'hormones gonadotropes par l'hypophyse. L'absence d'embryon dans l'utérus entraîne, 13 à 14 jours après l'ovulation, la production de Prostaglandines $F_{2\alpha}$ par l'utérus, l'arrêt de la production de progestérone et la destruction du corps jaune; la libération des hormones gonadotropes par l'hypophyse peut alors reprendre (Boukhliq, 2002)

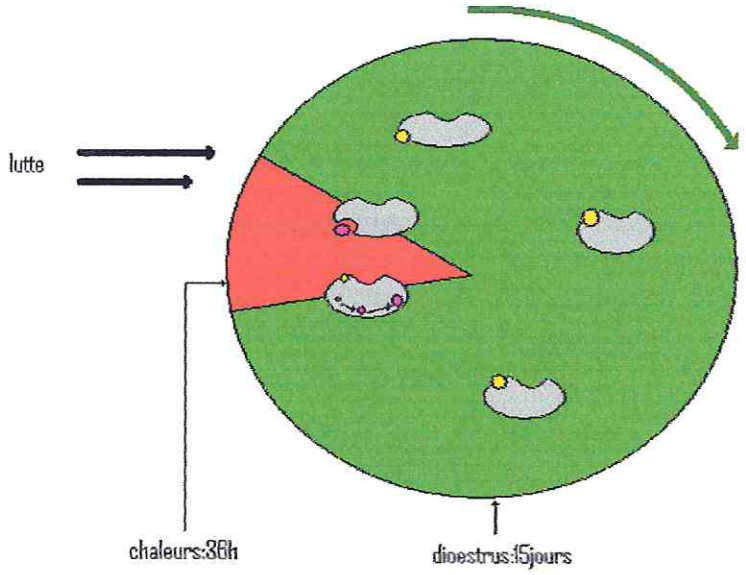


Figure n°4 : présentation schématique du cycle oestral de la brebis (Colin, 2004)

II-5-B-1) FSH

C'est une glycoprotéine, responsable de la croissance des follicules ovariens (Ruck, 1981). Elle stimule aussi les cellules de la granulosa, elle ne peut exercer pleinement son action pour la maturation folliculaire et l'ovulation qu'en liaison avec la LH (Schaetz, 1977). La sécrétion de FSH existe sous deux formes, une sécrétion basale continue tout au long du cycle et une sécrétion cyclique caractérisée par les pics au moment des chaleurs et l'ovulation (Dupouy et al, 1992).

II-5-B-2) LH

Hormone glycoprotéine formée de deux sous unités α et β (Combanous, 1991). La LH est une hormone lutéinisante, qui provoque l'ovulation. Elle est responsable de la transformation du follicule mûr en corps jaune et stimule la sécrétion de progestérone à partir de cholestérol au niveau des cellules (Martal, 1985). La mesure de LH plasmatique dans la circulation générale indique un mode de sécrétion presque exclusivement pulsatile ; l'augmentation rapide au niveau hormonale pendant 5 à 10mn et suivie d'une diminution progressive en fonction de demi vie d'hormone, les concentrations de LH sont situés dans l'échelle de ng/ml (Caldani et al, 1991). Pour ce qui concerne le mode de sécrétion, une sécrétion tonique continue tout le long du cycle sexuel et une sécrétion cyclique (pic de LH) qui vient à la fin de chaque cycle oestral pour induire l'ovulation et la lutéinisation (Dupouy et al, 1992). Le pic de LH apparaît entre 3 et 17 heures après le début de l'oestrus et la durée du pic est de 1 à 10 heures, ce pic correspond à une décharge brutale préovulatoire qui intervient par rétrocontrôle positif des oestrogènes (200ng/ml) (Craplet et Thibier, 1984)

II-5-B-3) La prolactine ou LTH :

Elle n'est pas considérée comme une hormone gonadotrope. Son rôle principal est la stimulation lactée. Cependant elle joue un rôle important dans la reproduction des animaux domestiques. Elle est responsable de la sécrétion de progestérone par le corps jaune et son maintien lors de la gestation. Le pic de LTH dans le sang précède celui de LH et se prolonge plus longtemps (Derivaux et al, 1976).

II-5-C) Les hormones ovariennes :

II-5-C-1) Les oestrogènes :

L'oestradiol (oestrogène est synthétisé et libéré surtout au cours de la phase folliculaire du cycle alors que la progestérone est libérée par le corps jaune au cours de la phase lutéale.

La synthèse des oestrogènes nécessite chez la plupart des espèces, la présence simultanée de la thèque interne de la granulosa des follicules. Sous l'effet de LH, les cellules de thèques synthétisent des androgènes à partir du cholestérol. Ces androgènes sont ensuite aromatisés en oestradiol par les cellules de granulosa sous le contrôle des hormones gonadotropes.

La secrétions d'œstrogène, surtout l'oestradiol 17β, varie au cours du cycle sexuel de la brebis de 1 à 3pg/mg pour le taux de base et atteint 25pg/ml au pic oestral (Derivaux et Ectors, 1989).

II-5-C-2) La progestérone :

La progestérone est secrétée essentiellement au niveau des ovaires par les cellules lutéales mais elle peut être secrétée en faibles quantités par les cellules granuleuses des follicules ovariens (Lennoz, 1987). La progestérone va assurer le début et le maintien de la gestation et sa diminution aboutit à l'avortement ou à l'accouchement (Roux, 1986).

Le jour de l'oestrus, le taux de progestérone est très faible de 0,2 à 0,3ng/ml, il augmente rapidement du 3ème au 14ème jour du cycle sexuel pour atteindre un pic de 2ng/ml. La régression survient 48 à 60 heures avant l'oestrus (Derivaux et Ectors, 1976). Pendant la cycle sexuel de la brebis, le taux de sécrétion de progestérone durant la phase lutéale est de 3ng/ml alors qu'il est de 0,5ng/ml pendant la phase oestrale. Les niveaux les plus élevés de la progestérone pendant la phase lutéale sont associés à un taux d'ovulation plus élevé (Cahill et al, 1981).

II-5-C-3) L'inhibine:

C'est une hormone non stéroïdienne, d'origine gonadique, de nature glycoprotéine.

Chez la femelle l'inhibine est synthétisée par les cellules de granulosa, une partie s'accumule dans le liquide folliculaire, l'autre est secrétée dans le plasma (Rotten, 1991).

L'action de l'inhibine semble se dérouler à différents niveaux : hypophyse, hypothalamus et gonades (Souilem et al, 1992). L'inhibine avec l'oestradiol est l'un des facteurs importants régulant de façon négative à la sécrétion de FSH chez la femelle (Humbbot, 1990).

II-5-D) Les facteurs utérins (prostaglandines) :

La prostaglandine (PGF2α) est synthétisée à partir de l'acide arachidonique, au niveau de nombreuses cellules sécrétrices. La libération est contrôlée par l'ocytocine d'origine lutéale. En effet l'ocytocine favorise la production de PGF2α (Nisurcuder et Nett, 1988).

La PGF2α par sa double action lutéolytique (lyse du corps jaune) et musculotrope, permet le contrôle du cycle (maîtrise), de la gestation (avortement) et de la parturition (induction) (Fontaine et Cadore, 1995)

II-6) La régulation hormonale de l'activité sexuelle cyclique :

Les hormones hypophysaires et ovariennes interagissent les unes avec les autres sous le contrôle de l'hypothalamus, assurant ainsi la régulation du cycle sexuel.

En prenant comme point de départ le début de la phase lutéale, les principales étapes du cycle jusqu'à la fin de la phase folliculaire sont les suivants:

Juste après l'ovulation, le taux de FSH augmente et stimule l'apparition d'une nouvelle vague folliculaire. Trois vagues folliculaires peuvent ainsi se développer pendant la phase lutéale.

Sous l'action de la LH, le corps jaune se forme, après lutéinisation des cellules de la granulosa, qui secrètent ainsi de la progestérone. La progestérone exerce sur le complexe hypothalamo-hypophysaire un rétro contrôle négatif, bloquant toute production de GnRH, et maintenant à un niveau minimum la sécrétion de FSH et de LH. La faible pulsatilité de LH induit l'atrésie des follicules dominants sélectionnés dans les deux premières vagues folliculaires.

La progestérone prépare également l'utérus à une éventuelle gestation en agissant à deux niveaux : elle inhibe les contractions du myomètre (calme utérin) et stimule le développement et la vascularisation de l'endomètre (Florence et al, 2005).

En l'absence de fécondation et de signal embryonnaire, l'utérus produit de la prostaglandine PGF2α sous l'action de l'ocytocine sécrétée au niveau de la posthypophyse qui provoque la lutéolyse du corps jaune et la chute du taux de progestérone. La sécrétion de prostaglandine devient plus importante en fin de phase lutéale, sa pulsatilité augmente (3 à 4 pulses de forte amplitude par 24h) ; il faut un minimum de 5 pulses successifs pour induire la lutéolyse complète. Il y a alors levée du rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. La sécrétion de FSH augmente progressivement et stimule le développement du follicule dominant de la dernière vague folliculaire. Il en résulte une production d'œstrogène en quantité croissante (Hanzen 2000).

Les œstrogènes permettent l'apparition du comportement d'oestrus. En outre, ils exercent un rétrocontrôle positif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. L'autosensibilisation de l'hypothalamus à des quantités d'oestrogènes permet une production massive de GnRH (Florence et al, 2005).

Sous l'action de la GnRH, l'hypophyse réagit par une production massive de FSH et LH. La production combinée d'œstradiol et d'inhibine par le follicule mature est responsable de la chute de FSH observé au cours de la phase folliculaire, le pic ovulatoire de gonadotrophine qui induit l'ovulation 24 – 28 heures plus tard (Driancourt et al, 1991).

Les stimuli externes, tels que la variation de la durée du jour ou la photopériode, agissent sur l'hypothalamus et provoquent ainsi des perturbations du mécanisme normal de régulation (Florence et al, 2005).

II-6-1) L'ovulation :

Vaissaire en 1977 a défini l'ovulation comme étant la libération d'un ou plusieurs gamètes femelle (ovocyte ou ovule) prêt à être fécondés, après rupture du follicule de De Graaf à la surface de l'ovaire. On parle également de ponte ovarique ou ponte ovulaire. La ponte survient chez la brebis 20 à 30 heures après le début des chaleurs (Fontaine et Cadoré, 1995). Les résultats donnés par les différents auteurs sur le moment de l'ovulation sont rapportés dans le tableau IV.

Tableau IV : Récapitulatif des donnés bibliographiques sur la durée de l'oestrus et le moment de l'ovulation

Auteurs	Année	Durée de l'oestrus (heures)	Moment d'ovulation (heures après le début de l'oestrus)
DERIVAUX	1971	30-36	24
CRAPLET et THIBIER	1984	24-72	20-40
SOLTNER	1993	48-72	30
THIBAULT et LEVASSEUR	1991	24	18-36

Elle est plus fréquente au niveau de l'ovaire droit que de l'ovaire gauche, l'ovule libéré serait fertilisable pendant 24 heures (Derivaux et Ectors, 1980).

II-6-2) l'atrésie folliculaire:

L'atrésie se définit comme étant la régression du follicule jusqu'à sa disparition dans le stroma ovarien (Thibault et Levasseur, 2001). Le follicule peut régresser à n'importe quel stade de son développement. Néanmoins, la transition entre le stade préantral et le stade du début d'antrum chez les rongeurs est la période la plus sensible (Jolly et al, 1997). L'atrésie folliculaire est le processus normal qui permet d'éliminer les cellules inutiles, qui ne se sont pas développées correctement et/ou qui sont endommagées (Guthrie et la, 1995). Pour définir l'atrésie folliculaire, deux types de critères sont généralement utilisés :

1. Les critères morphologiques tels que la taille du follicule, le nombre et l'aspect des cellules de la granulosa, le nombre de pycnoses (point noir de nécrose).
2. Les critères fonctionnels tels que la production d'œstrogène, d'androgène et de progestérone, et liaison de LH et FSH sur les récepteurs.

Le mécanisme le plus probable par lequel s'opère l'atrésie est l'apoptose (Hirshfield, 1991; Tilly, 1996). Environ 55% des follicules antraux iront vers la dégénérescence de façon normale, alors que 15% des follicules survivront exceptionnellement lors des 3 jours précédant l'œstrus (Guthrie et Garett, 2001). L'atrésie folliculaire qui se produit au cours de ces 3 jours a été associée à la baisse de 60 à 70% du taux de sécrétion de FSH (Guthrie et Garett, 2001). L'atrésie se termine par l'écrasement du follicule et l'invasion de l'antrum par des fibres conjonctives (Thibault et Levasseur, 2001).

II-7) La détection des chaleurs :

Les chaleurs correspondent à la période durant laquelle la brebis extériorise son activité sexuelle. Cette période se définit par l'acceptation du mal par la femelle. Par conséquent, les chaleurs sont caractérisées par un certain nombre de signes, le seul signe fiable étant l'immobilité au chevauchement (Evans, 1987) (cf. figure n°6).

La détection des chaleurs par simple observation est difficile, car la brebis n'en manifeste les signes qu'en présence d'un bélier. La difficulté de cette détection

posera peu de problèmes en monte naturelle mais beaucoup plus s'il s'agit de détecter pour pratiquer une insémination artificielle (Colin, 2004).

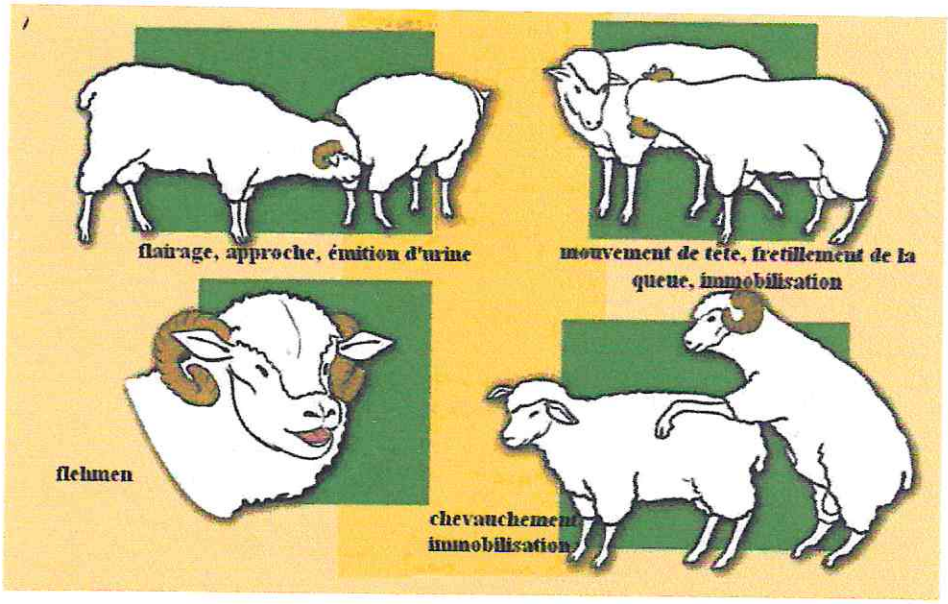


Figure n°6 : comportement sexuel lors de l'œstrus (Florence et al, 2005).

II-8) Etapes successives du comportement d'oestrus femelle.

Le comportement sexuel présente un intérêt évident de ce point de vue. Les performances d'un élevage dépendent de la reproduction et la reproduction dépend de la volonté et de la capacité des animaux à s'engager dans un comportement sexuel et à se féconder au bon moment. Ceci est vrai même quand l'élevage implique insémination artificielle, fécondation in vitro ou transfert d'embryon (Fabre, 2000)

Comparée aux autres ruminants, la brebis extériorise moins ses chaleurs. En présence d'un bélier, les brebis en chaleurs cherchent le contact, si le bélier cherche à les saillir, elles restent immobiles au chevauchement (Evans et Maxwell, 1987; Henderson, 1991).

Outre la recherche active du mâle, les brebis manifestent d'autres signes externes qui sont plus ou moins perceptibles, selon les races ou les individus, au moment de l'oestrus. Il s'agit de l'agitation de la queue, la tête tournée vers le mâle, souvent complètement, si celui ci se trouve derrière elle, des bêlements, plus fréquents si le mâle est absent. Ces signes apparaissent et disparaissent progressivement avec le début et la fin du comportement d'oestrus. Ces événements sont responsables des modifications des comportements alimentaires et de repos chez la femelle. Ces perturbations sont susceptibles de diminuer la productivité des femelles, quelle que soit la méthode de lutte (IA ou saillie naturelle). La présence des mâles et les accouplements répétés sont capables de réduire la durée de l'oestrus. (Boukhliq, 2002).

Etant donné que les brebis sont conduites en troupeaux, la pratique la plus souvent mise en œuvre consiste en l'utilisation de béliers équipés de harnais marqueurs (Evans, 1987). On peut également utiliser des béliers vasectomisés ou munis d'un tablier empêchant la saillie (Colin, 2004).

II-9) Accouplement :

Dans l'espèce ovine, la période des accouplements est appelée « lutte », en moyenne, deux cycles (environ 40 jours) suffisent pour que les brebis soient plaines. La brebis mise à la reproduction doit avoir un état d'embonpoint suffisant comme la plupart des autres espèces (Colin, 2004).

Cependant les béliers comme les brebis sont des reproducteurs soumis au facteur saison (Henderson, 1991)

Dans l'espèce ovine, la lutte est le mode de mise en place de la semence le plus utilisé ; on distingue différentes modes d'organisation de celle-ci (Florence et al, 2005) comme le démontre le tableau ci-dessous.

Tableau V : conduite de la lutte (Ouattara, 2001)

TYPE DE LUTTE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
Lutte libre : béliers en permanences dans le troupeau	Simple, assez bonne prolificité et fertilité.	Agnelages étalés Risque de combat entre les brebis. Impossibilité de contrôler la paternité Fertilité réduite si bélier stérile
Lutte par lot : repartir le troupeau en lot de brebis; (1 bélier/lot) (lutte de 6 à 8 semaines) En saison sexuelle: 40-50 brebis/bélier adulte. En contre saison : 30-35 brebis par bélier adulte.	Contrôle de la paternité. Gestion des périodes d'agnelage.	Fertilité moindre qu'en lutte libre
Lutte avec monte en main est utilisée seulement après synchronisation des chaleurs de façon à s'assurer que chaque brebis a été effectivement saillie; chaque brebis est saillie 2 fois (48h et 60h) après le retrait des éponges En saison sexuelle: 10 brebis/bélier/jour puis repos 3-4 jours En contre saison: 5 brebis/bélier/jour puis repos de 7 jours.	Sélection généalogique précise	Très coûteuse

II-10) La fécondation :

La fécondation c'est la formation, à partir d'un spermatozoïde et d'un ovocyte, d'une cellule souche diploïde et totipotente (zygote) (Thibault et Levasseur, 2001). La fusion a normalement lieu dans l'ampoule de l'oviducte que l'ovocyte atteint quelques heures après l'ovulation. Sa mise en place nécessite :

- la mise en place des gamètes males dans l'appareil génital femelle par saillie ou IA ;
- la rencontre de gamètes de bonne qualité : ovocytes aptes à être fécondé, spermatozoïdes dont le pouvoir fécondant est intact, ce qui suppose un déplacement des spermatozoïdes du lieu de pose au lieu de fécondation réalisé dans des délais compatibles avec le maintien de leur pouvoir fécondant (Florence et al, 2005).

Lors de la saillie, le bélier dépose, en moyenne, 3 à 4 milliards de spermatozoïdes au fond du vagin de la brebis (400 millions dans le cas de l'insémination artificielle). Quelques dizaines seulement pourront remonter jusqu'au lieu de la fécondation; un seul d'entre eux assurera la fécondation en pénétrant dans l'ovule. Huit heures sont nécessaires pour ce trajet, alors qu'il suffit de 3 heures à l'ovule pour parcourir le chemin qui conduit de l'ovaire à ce même lieu de fécondation. L'ovulation se produisant vers la fin des chaleurs, c'est pendant la deuxième moitié des chaleurs que la saillie sera la plus efficace (Boukhliq, 2002).

II-11) Physiologie du développement embryonnaire ovin :

II-11-A) La segmentation de l'embryon :

D'un point de vue morphologique, suite à la fusion des 2 gamètes et de leurs matériels génétiques, le point de départ est une cellule diploïde de volume important, le zygote. Cet embryon est entouré d'une zone pellucide assurant sa protection. La cellule unique qui le forme subit alors des mitoses successives mais sans augmentation du volume cytoplasmique. On passe d'un stade 1 cellule à 2 puis 4, 8, 16 cellules à chaque fois de plus en plus petites. Chaque cellule composant l'embryon est appelée blastomère. À partir du stade 16 blastomères, on appelle alors l'embryon « morula » par sa ressemblance avec la mûre qui apparaît comme un amas de cellules sphériques. Les divisions ne se font pas forcément de manière synchrone, ce qui fait que l'on peut observer un embryon ne comptant que 3 cellules à un instant donné par exemple. La morula continue de se diviser à l'intérieur de la zone pellucide et l'on assiste à une compaction de l'ensemble de ses cellules. Il y a formation de jonctions serrées entre elles. Les cellules des couches les plus externes de cette morula s'aplatissent et forment un épithélium que l'on nomme par la suite trophoblaste.

Quelques cellules les plus internes de la morula conservent une forme sphérique et vont former le bouton embryonnaire ou embryoblaste. On se trouve alors au stade « blastocyste », défini par l'apparition d'une cavité, le blastocoele, délimité par le trophoblaste et contenant de façon focale le bouton embryonnaire (Campus Virtuel Suisse, 2005).les différentes étapes de développement embryonnaire sont reportées dans le tableau VI ci-dessous.

Par la suite, le bouton embryonnaire donnera l'embryon à proprement parler, et le trophoblaste donnera les annexes placentaires. La suite du développement

embryonnaire consiste essentiellement en un accroissement du volume de la cavité blastocoelique, qui repousse ainsi le trophoblaste vers la zone pellucide. Cette étape où l'embryon prend le maximum de place à l'intérieur de sa membrane protectrice est appelée « blastocyste épanoui ». Elle précède juste l'éclosion de l'embryon au travers de la zone pellucide qui s'est affinée (Campus Virtuel Suisse, 2005).

II-11-B) La migration de l'embryon :

La progression de l'œuf dans les trompes utérines est en général discontinue. L'œuf est retenu dans la jonction isthme-ampoule pendant 2 à 3 jours, avant de franchir rapidement l'isthme et la jonction utéro-tubaire, sous l'action de forte contractions péristaltiques se propageant de la jonction isthme-ampoule vers l'utérus (Thibault et Levasseur, 2001).

L'entrée de l'embryon dans l'utérus se fait 84 heures (3,5 jours) post ovulation, ce qui signifie que les stades 2, 4 et 8 cellules se déroulent intégralement dans l'oviducte. Tout embryon retrouvé dans l'utérus devrait compter au minimum 16 cellules (Hafez , 1962) (Cf. tableau VI et figure n°7).

Tableau VI : Chronologie du développement de l'embryon ovin (Torrres et Sevellec, 1987).

Localisation	Différentes étapes avant et après l'ovulation	Temps en heures après le début de l'oestrus	Jours
	Début des chaleurs	0	J0
	Pic de LH	Début de l'oestrus	
Œufs dans L'oviducte	IA ou accouplement	0 - 12	
	Ovulation	24 - 30	J1
	Fécondation	25 - 31	
	Stade 2 blastomères (1ére division)	56	J2
	Stade 4 blastomères	60	J2
	Stade 8 blastomères	72	J3
	16 cellules : morula	96	J4
Embryons libres dans l'utérus	48 cellules (16-76 cellules) : morula		J5
	100 cellules (44-150) : jeune blastocyste		J6
	200 cellules (138-308) : blastocyste		J7
	400 cellules (150-650) : blastocyste sortant de la zone pellucide (Z.P)		J8
	400 cellules (250-550) : blastocyste sans zone pellucide		J9
	700 cellules (230-1620) : blastocyste en expansion		J10
Implantation	Les premiers contacts entre les cellules de trophoblaste et l'épithélium de l'endomètre qui marquent le début de l'implantation		J14

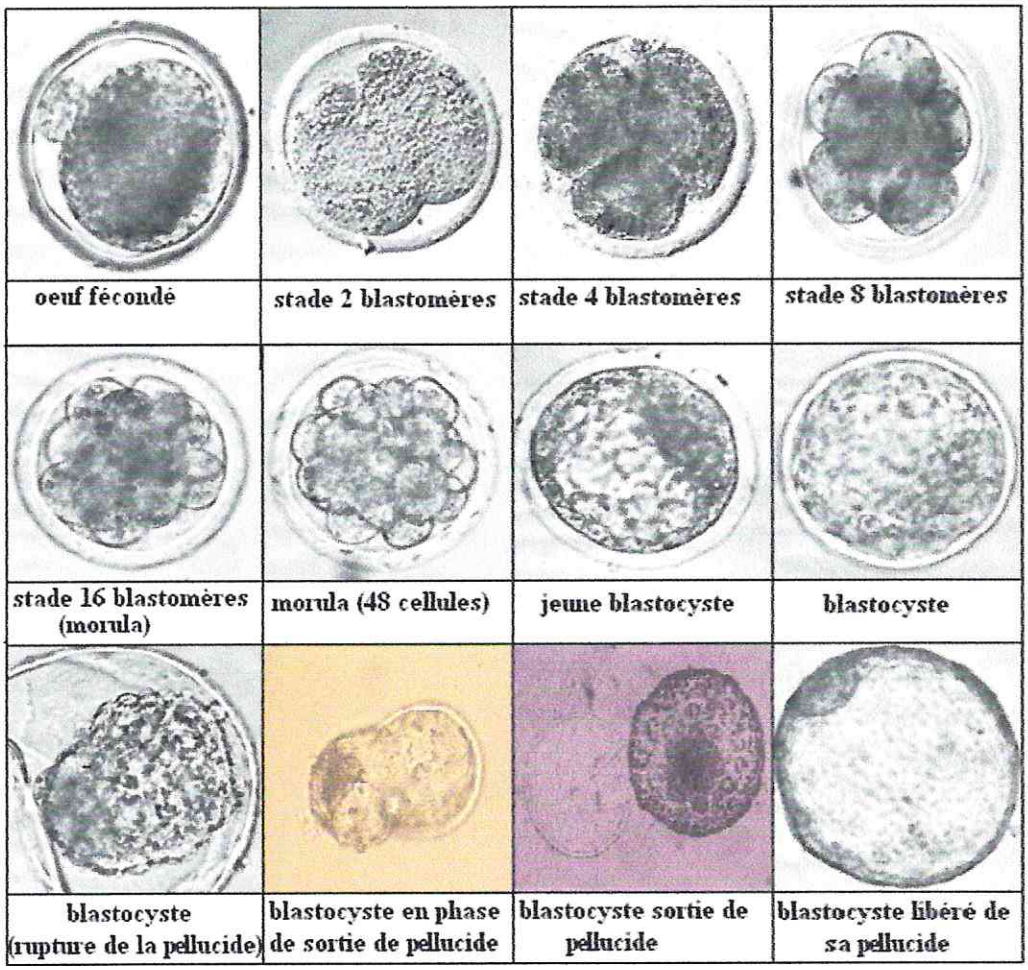


Figure n°7 : Chronologie de développement embryonnaire (J0 à J9) chez l'espèce ovine (Torrres et Sevellec, 1987)

II-11-C) L'implantation de l'embryon :

L'implantation se déroule selon une succession d'étapes caractérisées par le degré de contact entre les cellules épithéliales utérine et trophoblastiques.

Arrivé dans l'utérus le blastocyste se positionne par les contractions du myomètre et par une action locale du blastocyste (Wimsatt, 1975). L'implantation chez la brebis est dite centrale. Une fois le blastocyste sorti de sa ZP après rupture partielle et éclosion de celle-ci, cela permet un contact direct des cellules du trophoblaste et de l'épithélium utérin. Les contacts cellulaires, de plus en plus étroits, sont assurés par l'interdigitation des microvillosités apicales et/ou l'apposition des membranes plasmiques des deux épithéliums.

La pénétration du trophoblaste est plus au moins profonde dans l'endomètre selon les espèces, chez les ruminants cette invasion est ponctuelle et limitée à la migration de cellules binucléées du trophoblaste puis à leur fusion avec une partie des cellules épithéliales utérines, aboutissant à la formation d'un syncytium d'où un placenta synépithéliochorial des ruminants (Thibault et Levasseur, 2001).

Peu de recherches ont été publiées sur le sujet, on sait cependant que l'implantation dans l'espèce ovine a lieu au 15ème jour (Moore. B et al, 2006).

CHAPITRE III

Maîtrise de l'activité sexuelle de la brebis

I) Introduction:

Les quatre dernières décennies ont été les témoins de l'industrialisation de quatre générations de biotechnologies de la reproduction. La première a été l'insémination artificielle, puis un second niveau a été franchi avec les collectes et les transferts d'embryons produits *in vivo*. Avec la troisième génération, nous avons connu les embryons fécondés *in vitro*, le sexage de la semence, le prélèvement d'ovocytes *in vivo* par ponction folliculaire (OPU) et le clonage. Au stade actuel, il est devenu possible de supprimer ou d'ajouter certains gènes fonctionnels spécifiques dans le génome de la descendance, en recourant à la transgénèse combinée aux puissantes techniques de biologie moléculaire (Mackenzie, 2005).

Récemment, des combinaisons transgéniques ont été propagées par des techniques de transfert nucléaire somatique, faisant encore franchir une étape supplémentaire aux biotechnologies de la reproduction. La première considération est la technologie des transferts d'embryons qui reste la clé de voûte de toutes les biotechnologies de reproduction assistée. Même si l'embryon est produit *in vitro* et manipulé ou cloné, il doit néanmoins être transféré à une receveuse pour donner naissance à un nouvel animal (MacKenzie, 2005).

Les progrès récents des techniques de transfert et de congélation des embryons devraient permettre dans le futur une plus grande utilisation du transfert embryonnaire dans les programmes d'éradication d'épizooties et d'amélioration génétique des petits ruminants. (Cognie et Baril, 2002).

L'induction d'ovulations multiples et la transplantation embryonnaire (MOET) nécessitent la stimulation hormonale des femelles donneuses pour produire des embryons *in vivo* et la synchronisation donneuses receveuses pour permettre le transfert.

II) Techniques de maîtrise de la reproduction chez l'espèce ovine :

II-1) Synchronisation des chaleurs :

Chez les ovins, la présence d'une période de repos sexuel constitue une contrainte à la conduite de la reproduction (Florence et al, 2005).

La synchronisation des chaleurs consiste à avoir un certain nombre de femelles en oestrus durant une période très courte (Hunter, 1980).

Toutefois, la synchronisation n'est pas applicable qu'à des animaux en état de se reproduire (Chupin et al, 1974).

Classiquement les méthodes de contrôle de la reproduction ovine et caprine se répartissent en deux catégories, les unes dites zootechniques (effet mâle, alimentation et contrôle du photopériodisme) les autres hormonales (progestagènes, prostaglandines et mélatonine) (Hanzen, 2000).

II-1-1) Moyens zootechniques :

a) Effet bélier :

Les béliers à travers l'émission des phéromones, sont à l'origine d'une stimulation des gonadotrophines et de l'ovulation chez les brebis en anoestrus (Henderson, 1991)

Après une période d'isolement sensoriel complet, l'introduction des mâles dans un troupeau de femelle provoque immédiatement une brusque augmentation de la fréquence et de l'amplitude des pics de LH (Hanzen, 2000).

La perception du mâle se fait essentiellement par voie olfactive, cependant, les stimuli tactiles (activité du mâle, poursuite sexuelle) peuvent également jouer un rôle (Hanzen, 2000). La majorité des brebis ovulent dans les 6 jours qui suivent l'introduction des mâles, mais la première ovulation est souvent silencieuse (Evans, 1987).Les oestrus se manifestent en moyenne 18 à 25 jours après l'introduction des béliers.

En fin, l'effet bélier est un moyen efficace et peu onéreux dans la conduite de la reproduction ovine, mais il présente des limites car les capacités de la réponse des femelles varient avec la race, la saison et leur état nutritionnel (Courot et Nail, 1991).

b) Photopériode (l'éclairement artificiel) :

Ce traitement repose sur une alternance de jours longs et de jours courts, puisqu'il n'existe aucune photopériode constante qui permet le maintien de l'activité sexuelle de la brebis (Chemineau et al, 1996).Le protocole du traitement consiste donc à faire alterner :

- Une période de jours longs (stimulés de 16h) par éclairage artificiel de la bergerie d'une durée de 75 jours. L'éclairement est apporté par des tubes fluorescents fournissant 200 Lux au niveau des yeux des animaux.

- Une période de jours courts qui varie de 35 à 75 jours. (Florence et al 2005). Un jour court est reproduit par placement des animaux à l'obscurité (éclairement de 8 à 12h après l'aube) (Ortavant et al, 1988).

Cette méthode ne peut être utilisée que dans les grandes unités d'élevage à cause des difficultés d'application sur le terrain, spécialement du fait que l'induction d'une obscurité artificielle est une procédure très coûteuse et nécessite des locaux très spéciaux (Denis, 1984)

II-1-2) Méthodes hormonales :

a) les progestagènes :

Ces méthodes sont fondées sur l'utilisation de la progestérone ou de ses analogues de synthèse (qui sont 10 à 20 fois plus activent que la progestérone) (Cognie ,1981).

Leur action consiste à supprimer le follicule dominant (Woodruf et al, 1990) en inhibant le pic préovulatoire des gonadotropines hypophysaires, par conséquent les croissances folliculaires et les ovulations (Intervet, 1993).

Chez les brebis cyclées, l'emploi d'un progestagène à pour but de maîtriser la durée de la phase lutéale et de contrôler le moment de la décharge préovulatioire de LH, aussi le traitement doit il avoir une durée approximativement égale à la durée de la phase lutéale pour permettre de contrôler le moment de l'oestrus et de l'ovulation chez un ensemble de femelles dont les stades du cycle sont inconnus (Hanzen, 2000).

Chez les brebis non cyclées : en raison de la faible décharge des hormones hypophysaire en doit associer un facteur de stimulation folliculaire (PMSG) (Florence et al. 2005).

Les progestagènes peuvent être administré grâce à différents supports (éponges, implants), par différentes voies (vaginale, IM, SC) et à différentes posologies.

La méthode des éponges est de loin la plus utilisée de part sa facilité d'utilisation et les résultats fiables qu'elle apporte (Intervet, 1993).

Les progestagènes utilisées pour l'imprégnation des éponges sont représentées le plus souvent par le FGA et le MAP et plus rarement par le CAP et le MGA. Toutefois les doses et la durée dépendent du progestagène utilisé et de la saison du traitement (Cf. Tableau VII) (Bouzebda, 1985).

Tableau VII: Traitements hormonaux utilisés pour l'induction de l'œstrus par la technique des éponges vaginales (Cognié et Mauleon, 1983).

Etat physiologique	Saison sexuelle			Anœstrus saisonnier		
	Pose de progestagène FGA (mg)	Durée du traitement	PMSG (UI)	Pose de progestagène FGA (mg)	Durée du traitement	PMSG (UI)
Brebis sèche	40	12-14 j	400	30	12 jours	500-600
Brebis allaitantes	40	12-14 j	500	30	12 jours	600-700
Agnelle (8 à 12mois)	40	12-14 j	400	40	12-14 j	500

Toutefois, le traitement progestatif seul est insuffisant pour provoquer l'apparition de l'œstrus chez la totalité des animaux traités pendant la période d'anœstrus. L'injection intramusculaire de la gonadotropine « PMSG » à la fin du traitement progestatif augmente le pourcentage des femelles en œstrus (Cognie et al. 1970). (Cf. figure n°8)

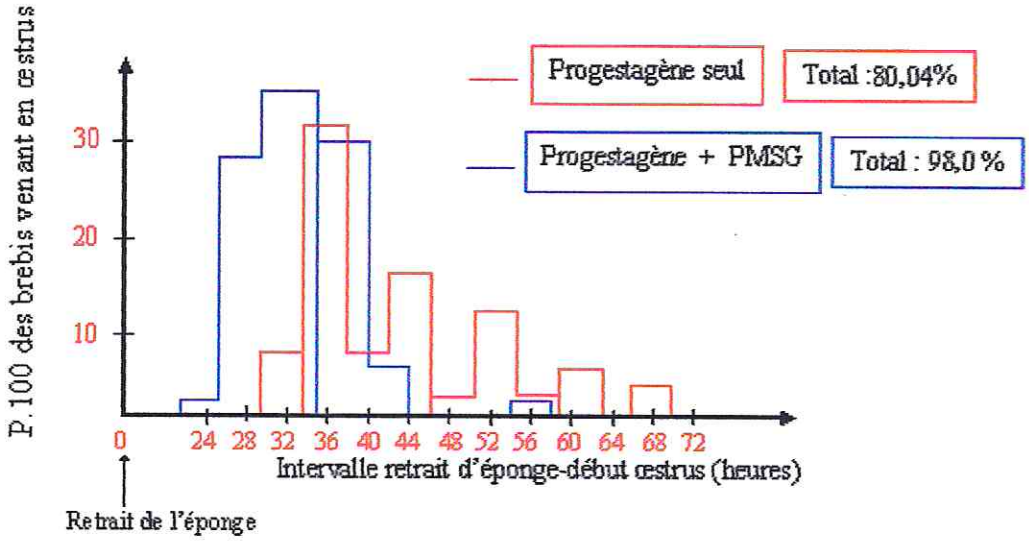


Figure n°8: Influence de l'administration de PMSG sur le moment d'appariation des chaleurs après un traitement de progestagène chez la brebis en anœstrus saisonnier (Cognié et al, 1970).

Une proportion élevée de brebis vient en œstrus durant un intervalle de temps entre 24-72 heures après l'arrêt du traitement progestatif (Cognié et al, 1970 ; Mauer et al 1972 ; Cognié et Pelletier, 1976) (Cf. figure n°8).

Tableau VIII : Effet de l'injection de PMSG après traitement progestatif sur l'intervalle fin de traitement-apparition de l'œstrus (heures).

Dose PMSG (UI)	Arrêt traitement-apparition de l'œstrus (heure)		Références
	Saison sexuelle	Anœstrus saisonnier	
0	56,0	44,7	EVANS et ROBINSON (1980)
200	40,0	48,0	
400	37,0	43,2	
800	35,6	38,4	
1600	31,4	41,2	
0	35	41	MAUER et al (1972)
500	40	/	
400-800	37,7	42,7	COGNIE et al (1970)
	30	32,7	

b) Les prostaglandines :

Les prostaglandines ont été observées grâce a Galloway et al, en 1987, dans du sperme humain. Ces substances sont synthétisées au niveau de plusieurs tissus, et plus particulièrement par l'endomètre utérin où la prostaglandine spécifique est la PGF2α (Hanzen, 1986).

La prostaglandine F2 et ses analogues peuvent être utilisées pour synchroniser les chaleurs des brebis cyclées. Les propriétés lutéolytiques de ces molécules permettent une régression du corps jaune et une chute des taux de progestérone plasmatique (Intervet, 1993). La PGF2α et ses analogues ont un effet nul durant les quatre premiers jours de l'oestrus, le traitement doit s'effectuer donc, chez les brebis n'ayant pas manifesté de comportement oestral depuis 4 à5 jours (Thimonier, 1969).

Etant donné que le corps jaune n'est sensible aux prostaglandines qu'entre le 5ème et le 14ème jour du cycle, deux injections à 11-14 jours d'intervalle sont nécessaires pour obtenir une bonne synchronisation.

L'importante variabilité des réponses et la nécessité de ne traiter que les brebis cyclées, expliquent l'utilisation très limitée de cette méthode sur le terrain (Evans, 1987, Henderson, 1991).

c) la mélatonine :

La mélatonine est une hormone synthétisée par la glande pinéale durant la nuit, à partir du tryptophane et de la sérotonine, elle est l'unique médiateur endogène du photopériodisme sur la reproduction (Chemineau et Malpaux, 1998).

Dans l'espèce ovine, une distribution quotidienne de mélatonine est indispensable pour induire une avance de l'activité ovulatoire. Dans ce contexte, les implants offrent un

avantage certain par rapport à la distribution orale (2 à 3mg par jours en fin d'après midi). Le retrait de l'implant n'est nécessaire puisque ce dernier est biodégradable (Hanzen, 2000)

Des taux importants de mélatonine sont nécessaires pendant au moins 5 semaines pour avancer la saison sexuelle. Il existe certaines preuves montrant que ce traitement augmenterait le taux d'ovulation (Symons, 1988, Henderson, 1991)

La différence de fécondité et de prolificité entre les femelles traitées à la mélatonine et les femelles témoins est très hautement significative (Zaien et al. 2000). L'accroissement des résultats de la fécondité est la conséquence de l'augmentation du taux d'ovulation (Chemineau et al. 1991).

La réponse à ce traitement semble dépendre du niveau endogène de mélatonine propre à chaque brebis (Hanzen et Castaigne, 2001). Afin de synchroniser les chaleurs, la mélatonine doit être associée à d'autres méthodes telles que l'effet mâle ou les éponges vaginales (cf. figure n°9) (Intervet, 1993).

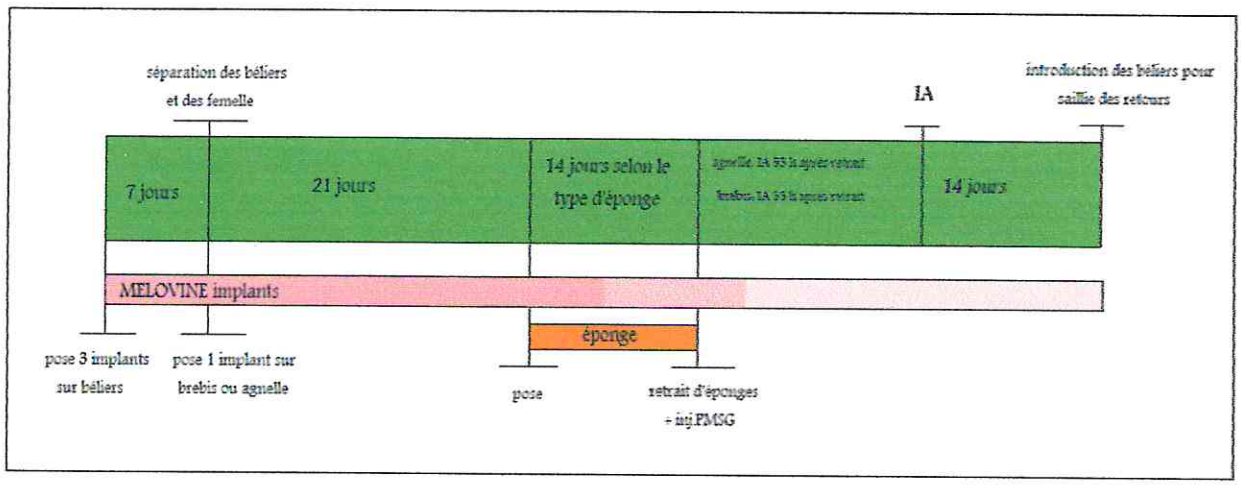


Figure n°9 : Exemples de protocoles d'utilisation de la méthode mélatonine en combinaison avec la pose d'éponges vaginales (d'après CEVA Santé animale).

II-2) Production et transfert d'embryons in vivo:

Chez la plupart des espèces domestiques, la finalité première de l'utilisation de la transplantation embryonnaire (T.E) est de parvenir à multiplier la descendance des femelles à haut potentiel génétique au-delà de leurs possibilités naturelles (Vallet et al, 1991).

La transplantation embryonnaire est une méthode de reproduction artificielle qui consiste à placer un tout jeune embryon d'une origine génétique donnée dans l'utérus d'une autre femelle appelée porteuse ou receveuse. Celle-ci assurera la gestation jusqu'à son terme (Florence et al. 2005). La production d'un nombre important d'embryons suppose que les étapes successives de la stimulation ovarienne, de la fécondation, de la collecte de ces embryons et la possibilité de répéter plusieurs fois ces opérations chez la même donneuse soient maîtrisées (Cognié et Baril, 2002).

II-2-1) Superovulation :

On définit le phénomène de superovulation comme une réaction ovarienne produisant un nombre d'ovulation au-delà du standard moyen de l'espèce (Nibart, 1991 ; Saumande, 1995). L'augmentation du nombre de follicules pré ovulatoires est obtenue par l'injection d'hormones gonadotropes, chez la brebis et la chèvre à la fin d'un traitement progestatif (Thibault et Levasseur, 2001).

II-2-1-a) Nature des traitements hormonaux :

L'administration de progestagène à l'aide d'éponge vaginale doit précéder la stimulation ovarienne par les gonadotrophines, d'une part, parce que la brebis et la chèvre ne présentent pas de cycle sexuel tout au long de l'année, d'autre part, parce que cela permet de synchroniser l'état physiologique des donneuses et des receveuses d'embryons. Avec ce type de traitement, la production d'embryons est possible aussi bien en saison sexuelle que hors saison (Cognie et Baril, 2002).

1) PMSG :

La PMSG est extraite du sérum de jument gravide entre le 42ème et le 100ème jour de gestation, elle possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange de 2/3 de FSH et 1/3 de LH. Ce rapport dépend du stade de gestation de la jument, la concentration de la PMSG est maximale dans l'organisme 15 à 32 heures après son injection, elle est douée d'une double activité à la fois de type FSH et LH avec un rapport constant de 0,2 (Hanzen, 2000).

C'est la première gonadotrophine utilisée pour obtenir une superovulation, administrée par voie IM en une seule injection de 1000 à 2000 UI, un ou deux jours avant le retrait de l'éponge (Cf. figure n°10). Cependant, cette gonadotrophine présente deux inconvénients :

- une activation prématurée de la méiose ovocytaire due à la forte activité LH de PMSG.
- Une modification des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales, due à l'action prolongée de PMSG due à sa longue demi-vie (plusieurs jours) (Cognie et Baril, 2002).

En plus de l'utilisation répétée de PMSG qui entraîne l'apparition des anticorps anti-PMSG (Saumande et al. 1984), ces effets conjugués peuvent expliquer les faibles performances obtenus avec la PMSG (2 à 3 embryons transférables en moyenne par donneuse) et son abondant au profit de FSH (Cognie et Baril, 2002).

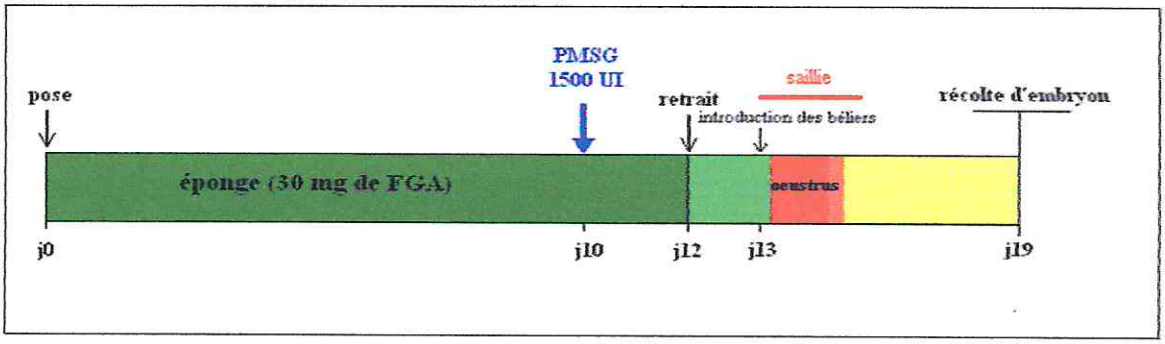


Figure n°10: Protocole de synchronisation/superovulation à base de progestagène pendant 12 jours et de PMSG (Mossa et al, 2006).

Le traitement avec eCG est économiquement moins cher, et avec sa longue demi-vie, il peut être administré en une seule injection ; cependant, quand il est administré à fortes doses, l'eCG est préjudiciable au profil hormonal, ovulation, fécondation, récupération des embryons et leur taux de viabilité (Shelton and Moore, 1967; Evans and Robinson, 1980; Bindon and Piper, 1982).

2) les extraits hypophysaires :

Des protocoles à base d'extraits hypophysaires contenant de la FSH ont été développés par la suite. Il existe sur le marché deux types d'extraits hypophysaires, un premier type provient de l'espèce porcine (pFSH), le second de l'espèce ovine (oFSH). Ces molécules, à demi-vies courtes, nécessitent des injections répétées toutes les 12 heures durant les 3 ou 4 derniers jours précédant l'apparition de l'oestrus (Cognie, 1999). Leur concentration atteint une valeur maximal 3 heures après leur injection, et ne sont plus décelables 12 heures après l'injection (Hanzen, 2000). Le plus souvent les injections se font à dose décroissante (Cf. figure n°11) mais il faut suivre les recommandations de la notice du produit (Chemineau et al. 1999)

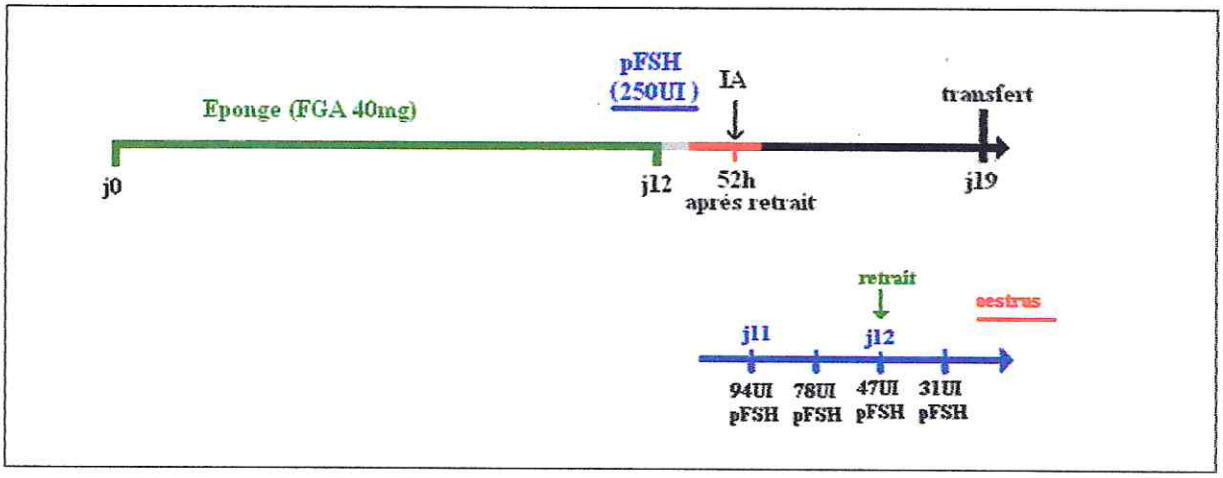


Figure n°11 : Protocole de synchronisation/superovulation à base de progestagène pendant 12jours et de pFSH (Giovanni et al, 2001)

Certains travaux ont montrés que l'utilisation de la pFSH à des doses décroissantes et enrichie en pLH (FSH /LH de 0,3 à 0,4) lors des deux dernières injections réalisées à l'arrêt

du traitement permettait d'obtenir une meilleure stimulation ovarienne qu'avec des rapports constants (Cf. Tableau IX) (Baril et al, 1988 ; Cognie et al, 1986).

Tableau IX: Effets du rapport FSH/LH et le nombre de doses de pFSH sur la réponse ovulatoire et la production d'embryons (D'Alessandro et al, 2005).

	Traitement en 4 doses		Traitement en 8 doses	
	FSH/LH constant	FSH/LH décroissant	FSH/LH constant	FSH/LH décroissant
	Groupe A	Groupe B	Groupe C	Groupe D
Brebis traitées	10	10	10	10
Brebis super- ovulées (%)	90	100	90	100
Taux d'ovulation	9.9 ± 1.5	11.9 ± 1.6	10.4 ±1.5	14.9 ± 1.5
Taux de récolte (%)	69.3 ± 8.5	73.1 ± 9.0	87.5 ± 8.5	77.5 ± 8.5
Taux de fécondation	94,4 ± 11,5	73,2 ± 11,5	76,9 ± 10,9	55,8 ± 10,9
Embryons transférables (%)	89.0 ± 7.5	97.9 ± 7.9	85.5 ± 7.1	29.7 ± 9.2

Un traitement cocktail, associant en une seule injection la FSH avec une dose modérée de eCG (400 à 800 UI), a été décrit par plusieurs auteurs (Ware, 1985, Moore, 1974) (Cf. tableau X), et a été utilisé avec succès chez la brebis Mérinos australienne afin d'éviter les désavantages liés à la durée d'activité biologique de chacune des gonadotrophines (Ryan et al, 1991).

Tableau X: comparaison de la réponse ovulatoire et du taux de récolte et de fécondation entre deux traitements de superovulation (FSH, eCG/FSH) chez les brebis Sarda (Giovanni et al, 2001).

Traitement	**Nombre de brebis**	**Nombre. moyen de CJ/brebis**	**récolte (%)**	**Fécondation (%)**
FSH	21	8,05±3,8	126 (74,6)	103 (81,7)
eCG/FSH	23	11,8± 4,0	178 (59,9)	146 (82,0)

3- GnRH :

La GnRH s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation. Cependant elle peut être utilisée en association à d'autres schémas de superovulation. En effet, certains échecs d'ovulation et de fécondation chez les animaux donneurs d'embryons ont été imputés à une absence de libération ou à une libération anormale de l'hormone LH (Greve et al, 1984).

L'indication majeure de l'administration pulsatile de la GnRH est l'anovulation par hypogonadisme hypo gonadotrope d'origine hypothalamique ou l'anovulation par hypopulsatilité (Briger et al, 1985).

Les résultats obtenus après injection de la GnRH en phase oestrale ou 48 à 52 heurs après injection d'une prostaglandine sont contradictoires. Alors certains auteurs observent l'effet bénéfique de son injection après un traitement de superovulation à base de PMSG ou

de pFSH, d'autres, au contraire, remettent en question l'opportunité d'un tel traitement, constatant même dans certains cas un effet moins de la GnRH sur le pourcentage d'ovocytes fécondés et d'embryons transférable (Nwcomb ,1980 ; Prudo Delgado et al, 1989).

II-2-1-b) Conséquences d'un traitement de superovulation :

A) Sur l'apparition des chaleurs :

La synchronisation des donneuses est essentielle pour que la collecte se fasse au moment idéal (6 à 7 jours après la fécondation). De plus, l'administration d'hormones gonadotropes (pFSH ou eCG) peut influencer le moment d'apparition de l'œstrus et le taux de synchronisation (Armstrong, 1983) (Cf. tableau XI).

Tableau XI: Effet des traitements de superovulation sur le début et la durée des chaleurs chez la brebis Rambouillet (Naqvi et Gulyani, 1999)

	Traitement de superovulation		
	PMSG+ GnRH	PMSG + FSH	pFSH
Nombre de brebis	7	8	8
Nombre et (%) de brebis qui ont ovulé	5 (71.40%)	8 (100%)	6 (75%)
Fin de traitement - début d'oestrus (h)	45,00 ± 5,32	34,90 ± 1,88	45,40 ± 4,03
Durée des chaleurs	28,70 ± 4,76	32,60 ± 3,4	37,90 ± 1,79

L'intervalle arrêt du traitement-apparition des chaleurs est plus court pendant la saison sexuelle que pendant l'anœstrus, lorsque les brebis reçoivent ou non une injection de PMSG (Cognié et al, 1970). Par contre, Evans et Robinson (1980) notent que l'arrêt du traitement se traduit par l'apparition de l'œstrus plus tôt chez les brebis traitées pendant l'anœstrus que chez celle traitées pendant la saison sexuelle, l'injection de la PMSG inverse la situation.

B) Sur les follicules :

L'effet des traitements de superovulation sur la morphologie et la physiologie hormonale des follicules a fait l'objet de plusieurs recherches dans l'espèce ovine. Ainsi, chez certaines brebis connues pour leur prolificité (Boroola, Romanov et Finn), l'augmentation du taux d'ovulation est habituellement associée à des altérations morphologiques et fonctionnelles des follicules ovulatoires, la taille des follicules est diminuée de 20 à 50%, le nombre de cellules de la granuleuse est réduit de 30%, la concentration en oestrogènes et en inhibine des follicules est réduite respectivement de 30 et 50%. De même, l'administration de PMSG ou de pFSH induit une réduction de la taille des follicules ovulatoires (Hanzen, 2000).

C) Sur le nombre d'ovulation :

L'apport de gonadotropines exogènes permet de déborder les mécanismes du control naturel du taux d'ovulation, il est ainsi possible d'observer des taux d'ovulation variable chez la brebis (Cf. tableau XII).

Tableau XII: Effet du type du traitement de superovulation sur le nombre d'ovulation.

Traitement	Nombre de brebis	Nombre de CJ (moyenne)	Auteurs
PMSG+GnRH	5	4,4 ± 1,5	Naqvi et Gulyani, 1999
eCG+FSH	23	11,8 ± 4,0	Giovanni et al, 2001.
FSH	21	8,5 ± 3,8	
FSH/LH	10	14,9 ± 1,5	D'Alessandro et al, 2005.

II-2-2) Insémination artificielle (IA) :

L'intensification de la conduite des élevages, l'augmentation de la fertilité, la lutte contre les maladies transmissibles au moment de la monte, ainsi que l'emploi optimum des reproducteurs sélectionnés pour améliorer la conformation des races locales et augmenter les productions, ont contribués notablement au développement de l'insémination artificielle (Varadin et al, 1977.)

Les troupeaux ovins peuvent bénéficier des avantages bien connus de l'IA. Quoiqu'il en soit, l'IA chez les ovins présente certaines caractéristiques qui ne correspondent pas à ce qui est couramment admis. (Boukhliq, 2002).

A cause de ses caractéristiques anatomiques, le col utérin de la brebis ne peut pas être franchi à l'aide du pistolet d'insémination. Il est donc nécessaire de déposer la semence à l'entrée du col **(insémination cervicale),** ou au fond du vagin **(insémination vaginale).** Une solution alternative existe avec **l'insémination intra-utérine**, ce type d'insémination est réalisé à l'aide d'un endoscope. Des faibles quantités de sperme sont mises en place directement dans chaque corne utérine à l'aide d'un matériel spécifique. Cela nécessite la mise en œuvre d'une technique de type chirurgicale avec le matériel adéquat ; les animaux doivent êtres mis à la diète en moins douze heures avant l'IA (Evans, 1987).

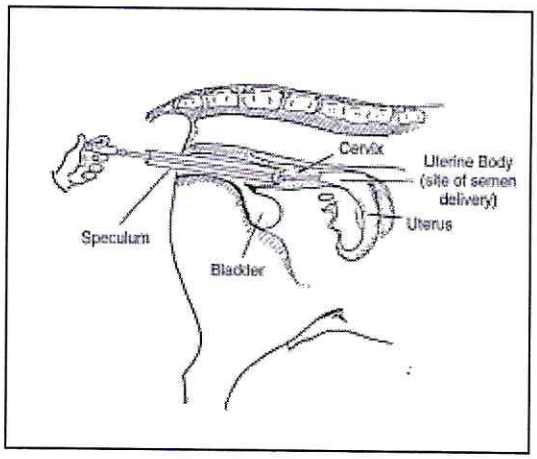


Figure n°12: Insémination cervicale chez la brebis (Youngquist, 1997)

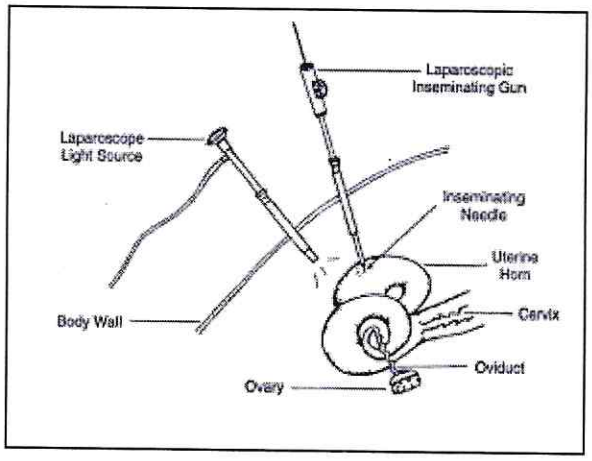


Figure n°13: Insémination intra-utérine par endoscopie chez la brebis (Youngquist, 1997)

a. Insémination avec du sperme frais

Le sperme est diluer avec un dilueur à base de lait écrémé additionné de sulfamides (la concentration finale doit être de 1.6 milliards de spermatozoïdes par ml), il sera par la suite conservé dans une bouteille isotherme à 15°C pendant 10 heures (Roques, 1989).

b. Insémination avec du sperme congelé

Au moment de la collecte, la séparation du plasma séminal et des spermatozoïdes est réalisée en diluant le sperme dans une solution physiologique Krebs-Ringer-Glucose (Corteel 1974). Les spermatozoïdes sont ensuite dilués, à une concentration de 1 milliard par ml, dans une solution à base de lait écrémé puis refroidis à + 4 C°. Une fois cette température atteinte, une seconde dilution est opérée avec le dilueur au lait contenant du glycérol (7 %), pour obtenir une concentration finale de 500 millions de spermatozoïdes par ml. Après cette opération, la semence est conditionnée en paillettes de 0,2 ml contenant chacune 100 millions de spermatozoïdes. La congélation des paillettes est réalisée par abaissement progressif de la température de + 4 °C à -196 °C, en 5 minutes, en les plaçant dans des vapeurs d'azote liquide, avant de les immerger dans celles-ci (Leboeuf et al, 1998).

c. Mise en place de la semence

Pour la semence fraîche, le délai maximum entre la récolte et l'insémination est de 10 h. Sur chaleurs naturelles, on pratique 2 inséminations artificielles à 12 h d'intervalle (Boukhliq, 2002)

Sur chaleurs induites avec des éponges vaginales, on pratique une seule insémination artificielle en moyenne 55 h après le retrait de l'éponge chez les brebis et 50 h chez les agnelles (Fieni et al, 1991) (Cf. tableau XIII).

Tableau XIII : moment de l'insémination des brebis en fonction du type d'IA. (Evans et Maxwell, 1987).

Type d'oestrus	**Type d'IA**	**Moment optimal d'IA**
naturel	Cervicale ou vaginale	12-18 heures après le début des chaleurs
synchronisé	Cervicale ou vaginale	Simple : 55h Double : 48h-50h et 58h-60h après retrait
	Intra-utérine	60-66h après retrait
	Intra-utérine après superovulation	36-48(ou mieux 44-48) après retrait

II-2-3) Préparation des animaux aux opérations de collecte ou de transfert :

Dans les techniques laparoscopique et chirurgicale, les opérations de collecte ou de transfert sont conduites sous anesthésie générale, les animaux ayant été préalablement soumis à une diète hydrique et alimentaire au cours des 24 heures qui précèdent les opérations.

Divers produits peuvent être utilisé, leur choix dépendra essentiellement de la disponibilité du praticien en matériel pour conduire ou non une anesthésie volatile. Sans elle, la xylazine 2% est le produit le plus couramment utilisé (Vallet et al, 1991).

L'animal une fois tranquillisé est tondu au niveau de la paroi abdominale ventrale, crânialement à la mamelle, ensuite placé en décubitus dorsal en l'inclinant la tête en bas avec un angle de 30- 40° afin de dégager l'accès à l'appareil génital, avant de la préparer de façon aseptique (Youngquist, 1997).

II-2-4) la récolte des embryons in vivo:

Le but de l'opération est de récolter l'ensemble des embryons produits par la brebis de la façon la plus efficace et la moins traumatisante possible.

Six à huit jours après le début de l'oestrus, les embryons sont collectés dans un tampon phosphate P.B.S. (Vallet et al, 1991). Actuellement la plupart des équipes de transfert d'embryon dans les espèces caprine et ovine préfèrent travailler entre J6 et J8, période correspondant au stade de développement embryonnaire morula ou blastocyste et à localisation utérine (Vallet et al, 1991, Cognié et al, 1999, Chemineau et al, 1999).

Il existe 3 techniques différentes de récolte des embryons chez les caprins et les ovins: trans-cervicale, chirurgicale, laparoscopique. Si la collecte doit se faire à un stade où l'embryon se trouve encore dans l'oviducte (<J4), il faut exclure la technique trans-cervicale qui ne permet de récupérer que le contenu de l'utérus. Pour le choix entre la technique chirurgicale ou laparoscopique, il faut considérer le devenir de la femelle donneuse car il est rarement possible de collecter plus de 3 fois une même brebis par technique chirurgicale. Avec la technique laparoscopique, jusqu'à 7 collectes sur une même donneuse ont été rapportées (Vallet et al, 1991). De plus, le choix de la technique dépendra du matériel dont dispose l'équipe de transfert embryonnaire et de ses habitudes (Youngquist , 1997).

A) Technique chirurgicale (Vallet et al, 1991, Youngquist, 1997) :

La technique chirurgicale permet de collecter selon son adaptation aussi bien les oviductes que les cornes utérines. La collecte se faisant le plus souvent entre J6 et J8, c'est la technique permettant de flusher les cornes utérines qui sera présentée ici : l'incision de laparotomie se fait au niveau de la ligne blanche juste en avant de la mamelle. Cette incision doit être d'une longueur suffisante pour extérioriser les 2 cornes utérines. Après vérification des ovaires (présence de multiples corps jaunes), une corne utérine est ponctionnée juste après la bifurcation et on y introduit une sonde de Foley pédiatrique. Le ballonnet de cette sonde est gonflé à l'aide d'une faible quantité de milieu de collecte à 37°C afin d'obstruer l'ensemble de la base de cette corne. Puis à l'aide d'un cathéter introduit au niveau de la jonction utéro-tubaire, on injecte 30 à 50 ml de milieu de collecte à 37°C que l'on récupère par la sonde de Foley. On renouvelle ensuite l'opération sur l'autre corne utérine. Il arrive par cette technique que la muqueuse utérine ressorte par l'incision faite pour placer la sonde de Foley. Dans ce cas, il est nécessaire de refermer la brèche avec un point simple. Après suture en deux plans par des points simples de la ligne blanche et de la peau, une antibioprophylaxie est mise en place.

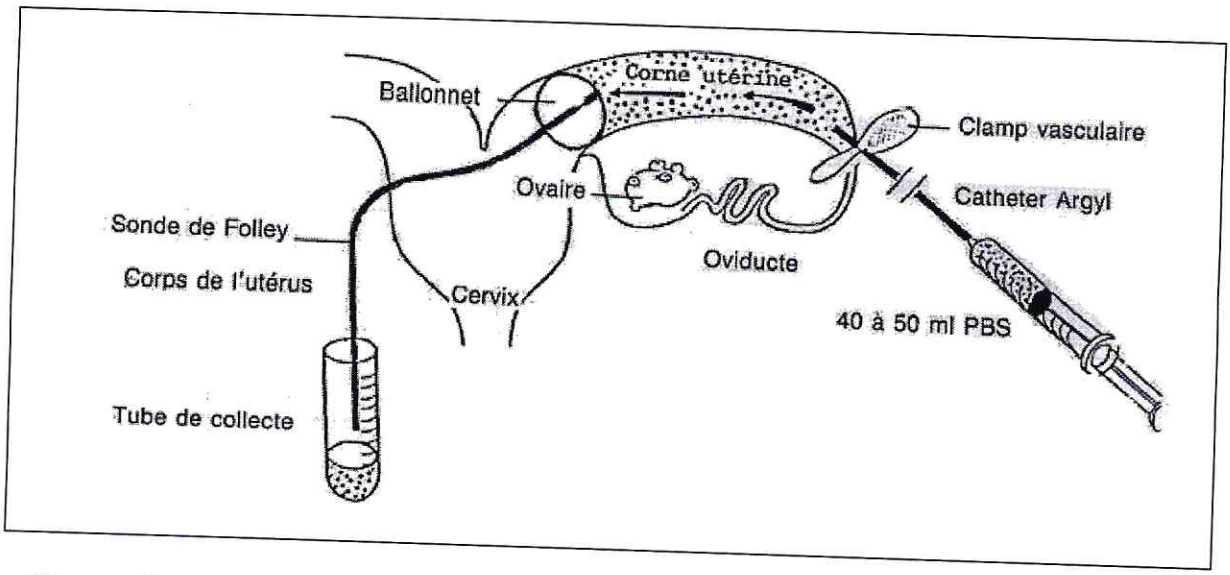


Figure n°14 : Méthode de collecte chirurgicale des embryons (D'après Vallet et al, 1991)

B) Technique laparoscopique (Vallet et al, 1991) :

Une canule de 7 mm de diamètre est introduite 8 à 10cm cranialement à la mamelle et 2 à 3 cm à la gauche ligne blanche afin de recevoir l'optique et de créer un pneumopéritoine en insufflant du CO_2. Une première canule de 5 mm est introduite à la même hauteur à droite de la ligne blanche, afin d'y introduire une pince atraumatique permettant de manipuler l'utérus et de vérifier la bonne réponse des ovaires au traitement de synchronisation/superovulation. Enfin, une seconde canule de 5 mm est mise en place sur la ligne blanche 2 cm plus cranialement que les 2 autres, on y passera d'abord une aiguille de 25 cm de long afin de ponctionner la paroi utérine juste en avant de la bifurcation, puis une sonde 3 voies (du même type que celle utilisée en collecte d'embryons chez la vache). Le ballonnet est alors gonflé, le cathéter flexible de la seconde voie est poussé jusqu'au tiers supérieur de la corne. On injecte 40 à 50 ml de milieu de collecte dans la corne avant de les récupérer via la 3ème voie de la sonde. Afin d'éviter la remontée du milieu de collecte vers l'oviducte, on placera par précaution la pince atraumatique juste au niveau de la jonction utéro-tubaire avant de flusher. Si on ne dispose pas d'une sonde 3 voies, on peut utiliser une sonde de Foley pédiatrique, mais une canule supplémentaire est nécessaire afin d'introduire un cathéter 18 gauges de 3,5 pouces (9 cm) de long. On introduit ce cathéter au niveau de la jonction utéro-tubaire et on le bloque à l'aide de la pince atraumatique. Il est alors possible d'injecter le milieu de collecte qui sera récupéré via la sonde de Foley placée à la place de la sonde 3 voies (Cf. figure n°15) (Youngquist, 1997).

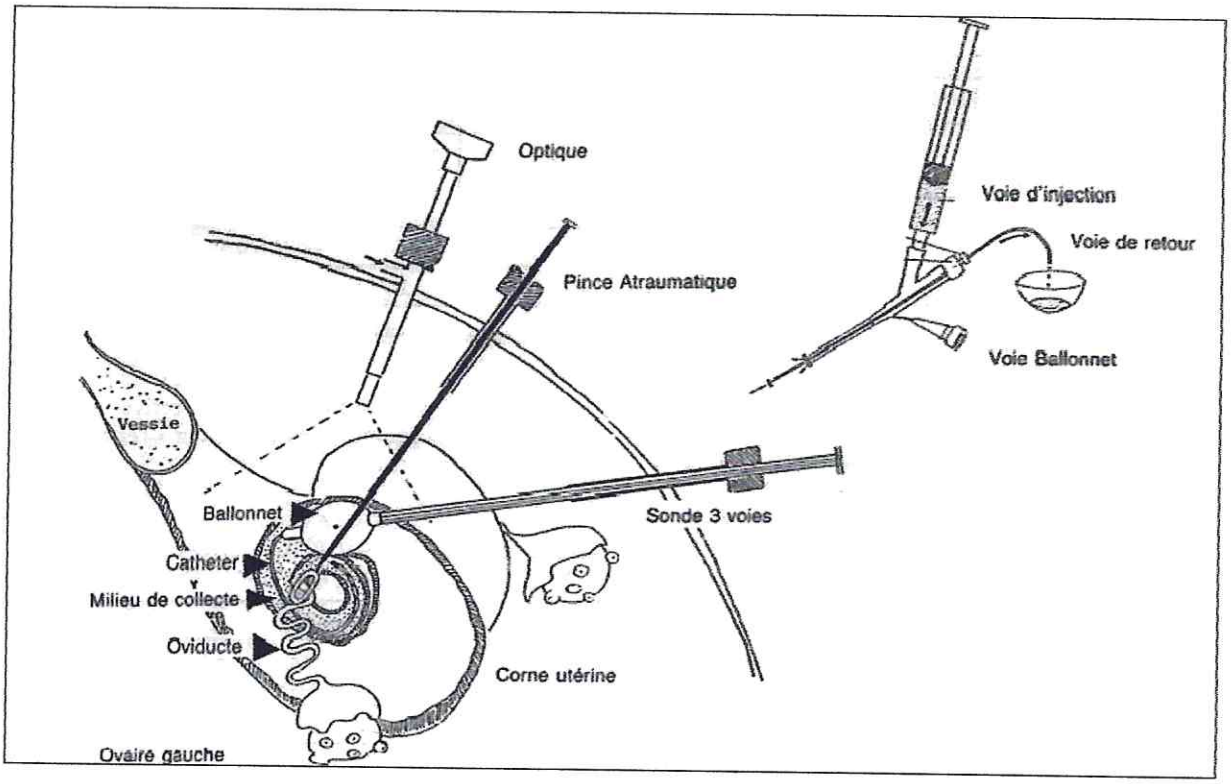


Figure n°15 : Collecte par technique laparoscopique avec sonde 3 voies. (D'après Vallet et al, 1991)

II-2-5) Examen et jugement des embryons :

Les embryons récoltés après superovulation ou fécondation in vitro se présentant sous des aspects morphologiques divers, il est important d'en apprécier la qualité avant leur transfert ou autre manipulation biotechnologiques éventuelles (Hanzen, 2000).

Les milieux de collecte sont maintenus à une température de +25° à +27°C, les embryons sont recherchés sous loupe binoculaire (x 10-60) puis jugés (Cf. photo n°5) (Vallet et al, 1991).

La connaissance de la chronologie du développement embryonnaire ovin fournit les points de repères nécessaires pour estimer si le stade embryonnaire observé est en rapport avec la date de récolte ou si l'embryon a stoppé son développement. (Lindner et al, 1983; Sakkas et al 1989).

Photo n°5 : Recherche d'embryon sous une loupe binoculaire (Doliguez et Bersinger, 2006)

L'IETS (International Embryo Transfer Society) fournit sur ses formulaires une codification pour le stade de développement entre J6 et J7 (date de récolte les plus courantes chez la brebis) les stades rencontrés sont Morula (stade 4), jeune blastocyste (stade 5), blastocyste (stade 6) et blastocyste épanoui (stade 7).

Une fois le stade de développement identifié, il faut estimer la qualité de cet embryon. Ceci permet de fournir un pronostic sur sa viabilité. La qualité est estimée en observant la forme globale de l'embryon (sphérique), s'il est symétrique, si l'ensemble des cellules le composant sont de taille uniforme, la couleur de l'embryon, et finalement sa texture (Lindner et Wright, 1983). Quatre 4 niveaux de qualité sont donnés par l'INRA-UNCEIA (Cf. tableau XIV) et L'IETS :

Tableau XIV: classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCEIA ,1990)

Classification	Qualité	Description
1	**Excellent**	-embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable. -blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact.
	Bon	- embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, - ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique, - ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace périvitèllin.
2	**Moyen**	- Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomères sphériques au stade morula) ou des défaut bien précis comme : -nombreuses cellules échappés dans l'espace périvitèllin, des vésicules, des cellules dégénérées, blastomères de taille variable. -aspect plus clair ou plus sombre que normal.
3	**Médiocre**	- nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes des vésicules grosses et nombreuses - mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable
4	**Mort ou dégénérés**	- arrêt de développement à un stade précoce - cellules dégénérées.

Selon l'IETS (1998) la classification des embryons se fait de la manière suivante :

- **Qualité 1** : **Excellent ou bon**. L'embryon est symétrique et sphérique, ses blastomères sont uniformes en taille, couleur et densité. Le stade de développement est en adéquation avec la date de récolte. Au moins 85% des cellules le composant doivent être intactes, et rattachées à la masse cellulaire (on estime le nombre de cellules extrudées dans l'espace périvitellin). La zone pellucide doit être lisse et sphérique.

- **Qualité 2** : **Satisfaisant**. Irrégularités modérées concernant la forme globale de l'embryon, ou la taille, couleur ou densité de ses cellules. Au moins 50% de sa masse cellulaire doit être intacte.
- **Qualité 3** : **Insuffisant**. Irrégularités majeures concernant la forme de l'embryon, ou la taille, couleur ou densité de ses cellules. Au moins 25% de sa masse cellulaire doit être intacte.
- **Qualité 4** : **Mort ou dégénéré**. Embryon dégénéré (développement arrêté), ovocytes non fécondés ou embryon non segmenté.

Seuls les embryons de qualité 1 devraient être utilisés dans les échanges commerciaux sauf si l'acheteur est au courant. S'il s'agit du domaine de la monte privée (à l'intérieur d'une même exploitation), les embryons de qualité 2 peuvent être transférés (Clément, 2006).

II-2-6) Conservation des embryons avant transfert :

La conservation des embryons récoltés sur un animal donneur ou obtenus par fécondation in vitro constitue une étape essentielle du transfert d'embryons (Hanzen, 2000).

Dans les conditions optimum, les embryons demeurent dans le milieu de perfusion in vitro de 1 à 2 heures ; pour les temps plus longs (6 à 12 heures) les conditions doivent être optimisées (vrais milieux de culture, co-culture avec tapis cellulaire).Quand un délai plus long est imposé entre collecte et transfert (24 à 48 heures), on peut recourir à la conservation entre 0 et +4°C (Charles et Levasseur, 2001).

Pour une conservation prolongée, il est indispensable d'arrêter le métabolisme, ce qui ne peut être obtenu qu'à très basse température (azote liquide : - 196°C) après congélation classique (déshydratation des cellules en présence d'un cryoprotecteur avec une phase de refroidissement lente jusqu'à -7°C et un palier à -35°C) (Mermillod et al, 2000).

Récemment est apparue la méthode de congélation rapide (la vitrification) où les embryons sont immergés directement dans l'azote liquide après avoir été déposés dans une solution contenant 25% de glycérol et 25% d'éthylène glycol (Baril et al, 2001).

Ces techniques permettent la survie de 85 à 95% des embryons, et le taux de succès après transfert est équivalent à celui des embryons frais (50 à 60%) (Charles et Levasseur, 2001).

II-2-7) Transfert embryonnaire :

Le transfert des embryons au stade morula ou blastocyste est effectué dans l'utérus d'une femelle receveuse dont l'oestrus a été préalablement synchronisé par traitement hormonal avec celui de la donneuse (Baril et al 1993).

Les opérations de transfert doivent être effectuées le plus rapidement possible, après collecte ou décongélation. Deux ou trois embryons sont placés dans un cathéter ou une pipette de verre contenant 5 à 20 µl de P.B.S. et sont transférés : soit chirurgicalement, soit sous control laparoscopique, dans le dernier tiers de la corne utérine ipsilatéralement à l'ovaire présentant au moins un corps jaune fonctionnel (Vallet et al, 1991). Chez la brebis, la voie

cervicale ne peut être utilisée à cause de la forme du canal cervical (Charles et Levasseur, 2001).

A) Technique chirurgicale :

L'abord utérin se fait par une laparotomie au niveau de la ligne blanche. Une fois repéré, l'utérus est manipulé de sorte à pouvoir observer les 2 ovaires et déterminer celui qui porte un corps jaune fonctionnel (Youngquist, 1997).

On placera les embryons dans le dernier tiers supérieur de la corne ipsilatérale au corps jaune en la ponctionnant à l'aide d'une aiguille ronde, un cathéter ou une pipette de verre. Les embryons sont contenus dans un cathéter ou une pipette de verre contenant 5 à 20 µl de PBS connecté(e) à une seringue à insuline (Vallet et al, 1991).

Une fois les embryons transférés, l'utérus est remis en position physiologique et la paroi abdominale est suturée. Cette technique fut celle de référence jusqu'au début des années 90 à partir desquelles la technique laparoscopique s'est propagée (Vallet et al, 1991).

B) Technique laparoscopique: (Youngquist, 1997)

Une fois l'animal en décubitus dorsal avec la tête placée vers le bas, un pneumopéritoine est créé en insufflant du CO_2. Puis deux incisions sont effectuées 2 à 3 cm de part et d'autre de la ligne blanche cranialement à la mamelle. Une incision servira à l'introduction de l'optique et l'autre pour une pince atraumatique qui permet de saisir la corne ipsilatérale au corps jaune fonctionnel repéré. Pour ponctionner la paroi utérine, une aiguille de 14 gauges est insérée à travers la paroi abdominale juste cranialement à la pince atraumatique et va traverser la paroi utérine dans le dernier tiers de la corne. Un cathéter de type Tomcat de 16 gauges contenant les embryons est passé à l'intérieur de l'aiguille de ponction. Ce cathéter, relié à une seringue à insuline est alors inséré dans la lumière utérine et les embryons sont déposés. Les instruments sont ensuite retirés et les 2 incisions de la paroi abdominale suturées. (Cf. figure n°16)

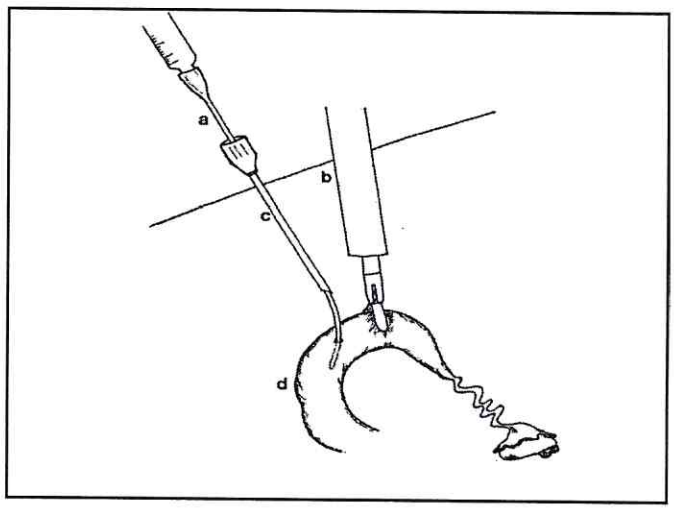


Figure n°16 : Transfert embryonnaire par méthode laparoscopique. a : cathéter Tomcat de 16 gauges ; b : pince atraumatique ; c : aiguille de 14G servant de canule pour le cathéter ; d : corne utérine. (D'après Youngquist, 1997).

II-2-8) Devenir des embryons transférés :

A la suite au transfert de deux embryons frais par receveuse synchronisée, la fertilité est comprise entre 70 et 80% (Cf. tableau XV); la survie des embryons chez les receveuses fertiles peut atteindre 80%, en moyenne la survie de l'embryon frais transféré est de 65%. Pour un embryon décongelé et jugé viable, la survie globale est de 50-55% (Brebion et al, 1992).

Tableau XV : Fertilité après un transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis (Brebion et al ; 1992).

Technique de transfert	Embryons frais	Embryons congelés
Laparoscopique	80%	90%
Chirurgical	88%	45%

Chez les ovins, lorsque les embryons (2 par paillette) sont transférés directement dans une corne utérine de la receveuse, les résultats sont identiques à ceux obtenus après transfert traditionnel. Le transfert direct, en évitant l'évaluation morphologique et l'élimination de 15 à 20 % des embryons après décongélation permet un gain potentiel de 7 à 8 % en termes d'agneaux nés (Cf. tableau XVI), tout en simplifiant l'opération de mise en place des embryons (Cognié et Baril, 2002).

Tableau XVI : Taux de mise bas et de survie embryonnaires après transfert direct ou traditionnel d'embryons vitrifies **(Baril et al ,2001)**

Transfert	traditionnel	direct
Nombre de receveuses	43	36
Mise bas %	67	75
Survie embryonnaire %	49	53

Ces différents résultats montrent que le transfert d'embryons est désormais une technique utilisable pour des objectifs génétiques, sanitaires, zootechniques ou commerciaux (Vallet et al, 1991).

II-2-9) Facteurs de variation de la production in vivo d'embryons:

La grande variabilité dans la réponse aux traitements de superovulation continue à être le principal facteur limitant dans les programmes de transfert embryonnaire chez les ovins. La variabilité de la réponse ovulatoire des donneuses rend difficile la planification rigoureuse du nombre de femelles receveuses et limite le développement du transfert embryonnaire. En effet, 20% des brebis Lacaune et 10 % des chèvres Alpine et Saanen ont moins de 5 ovulations après le traitement pFSH (Cf. figure n°17) et par conséquent sont éliminées de la collecte d'embryons tandis que 17 à 20 % des femelles traitées ont plus de 20 ovulations (Brebion et al 1992).

Cette variabilité est liée à des facteurs intrinsèques de l'animal donneur tels que la race, l'âge, statut reproducteur, aussi bien qu'extrinsèque comme la nature des gonadotropines, leur pureté et leur programme d'utilisation (Baril et al, 1993). Pour Cognie (1999) cette variabilité est expliquée d'une part par des différences entre animaux (stock

folliculaire, sensibilité) et d'autre part par des différences d'activité des préparations hormonales.

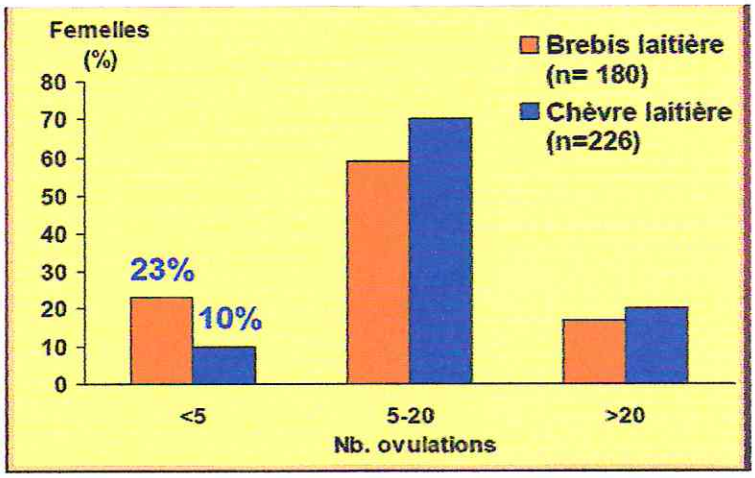


Figure n°17 : Variabilité de la réponse ovulatoire : distribution des femelles donneuses en fonction du nombre d'ovulation après traitement FSH **(Brebion et al ,1992).**

A) Les facteurs intrinsèques :

a) L'individu :

La distribution des donneuses en fonction du nombre d'ovulation montre une importante variabilité de la réponse au traitement selon les individus (Cf. figure n°18) (Brebion et al, 1992).

Des travaux réalisés chez les ovins (Driancourt, 1987) ont mis en évidence une étroite relation entre l'état ovarien avant traitement et la réponse à l'induction de la superovulation.

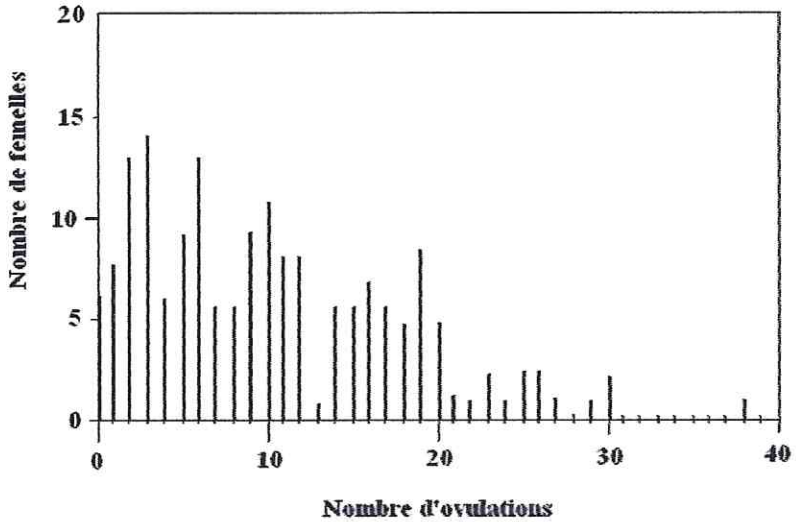


Figure n°18 : Répartition des femelles en fonction du nombre d'ovulations ; après 20mg de FSH (n =226) (Brebion et al, 1992)

b) La race :

Plusieurs études ont montré pour les caprins et les ovins, des différences de réponses au traitement de superovulation en fonction de la race (Cf. Tableau XVII). Les données disponibles sur le taux d'ovulation montrent que ce caractère est variable selon les races (Gouhis, 1989). Pour la brebis Romney Marsh, Armstrong et Evans (1983) constatent une plus faible réponse au traitement pFSH que pour la brebis Mérinos. Suite à l'administration de 16 mg de FSH porcine, la réponse ovulatoire des brebis de race Lacaune est inférieure à celle des brebis prolifiques Romanov x Préalpes (Cf. Tableau XVIII) (Torres et al, 1984).

Tableau XVII: effet de la race sur la réponse ovulatoire au traitement de stimulation ovarienne.

Race	Traitement	No. d'ovulations	No. d'embryons	Références
Sarda	FSH	8.05 ± 3.8	4,9 ± 1,03	Giovanni et al, 2001
Santa Inês	pFSH	10.6 ± 1.0	5,2 ± 0,8	Cordeiro et al, 2002
Rambouillet	pFSH	9.4 ± 2.4	5	Nakvi et gulyani, 1999
Merino Espagnol	pFSH	9.5 ± 0.6	/	Gonzalez et al, 2000
Manchega	FSH	11.1 ± 1.1	4,3 ± 1,4	Gonzalez et al, 2003
Corriedale	oFSH	6.2 ± 1.1	1,4 ± 0,4	Simonetti et al, 2007
Romney Marsh	pFSH	8.2 ± 2,0	/	ARMSTRONG et EVANS (1983)
Mérinos		16,6 ± 3,7		
Lacaune	pFSH (16 mg)	12 ± 1,5	/	TORRES et al, 1984
Romanov x Préalpes	pFSH	19,5 ± 2,6	/	TORRES et al, 1984

c) L'age :

L'age de l'animal peut également constituer un facteur limitant compte tenu du fait que le nombre de follicules qui quittent la réserve diminue avec celui-ci (Cf. Tableau **XVIII**) (Hanzen, 2000).

Tableau XVIII: Variation du taux d'ovulation selon l'âge.

Race	Age	Traitement	No. d'ovulations	No. d'embryons	Références
Corriedale	3 à 6 ans	pFSH	6,20 ± 1,10	1,40 ± 0,40	Simonetti et al, 2007
Sarda	2 à 6 ans	FSH	8,05 ± 3,80	4,90± 1,03	Giovanni et al, 2001
Santa Inês	2 à 4 ans	oFSH	10,60 ± 1	5,20 ± 0,80	Cordeiro et al, 2002

d) Etat des ovaires:

Chez la brebis, le problème majeur en ce qui concerne la superovulation est l'extrême variabilité de la réponse ovulatoire, qui est évidente au sein d'animaux tous traités par les mêmes produits (Brebion et al, 1992). Mais une part importante de la variabilité individuelle à la réponse ovulatoire après traitement gonadotrope est attribuable à l'état ovarien au début du traitement à la FSH (Baril et al, 1993) ; donc la qualité de la réponse va dépendre de l'importance de la réserve des follicules préantraux (Hanzen, 2000).

Driancourt (1987) a montré qu'il existe une étroite corrélation, avec un coefficient de l'ordre de (+0,7), entre le nombre de follicules (de 0,8 à 2 mm de diamètre) présent le premier jour du traitement et le taux d'ovulation, ceci suggérant que les follicules recrutés par les hormones gonadotropes appartiennent à cette classe. Il est donc intéressant de tenter d'enrichir cette classe de follicules cibles préalablement à la stimulation.

Il est à noter que la présence d'un follicule dominant, par ses sécrétions d'œstradiol et d'inhibin A, est délétère pour le recrutement d'un nombre conséquent d'autres follicules (Rubianes et Menchaca, 2003).

Le seul moment du cycle ovarien où il n'existe pas de follicule dominant correspond aux 24 heures suivant l'ovulation, d'où l'idée d'une équipe Uruguayenne du « Day 0 protocol». Dans ce protocole, la première administration des hormones gonadotropes se fait juste après l'ovulation déterminée par échographie, soit environ 36 heures après le début des chaleurs. Les résultats sont encourageants puisque le rendement d'ovulation est de 13,6 ± 1,9 avec le « Day 0 protocol », contre 10,4 ± 1,9 avec un protocole commencé plus tard lors du cycle (Rubianes et Menchaca, 2003).

B) Les facteurs extrinsèques :

a) La saison :

Chez les brebis laitieres de race lacaune traitées avec pFSH en période d'anoestrus saisonnier, le nombre moyen d'ovulation par femelle est inférieur à celui obtenu pendant la saison de reproduction (8 ,4 ± 1,3 vs 11,2 ± 1,4 ; Torres et al, 1984).

b) Facteurs nutritionnels :

Il est connu que l'incidence des ovulations multiples et des naissances multiples chez les ovins pourrait être augmentée par l'amélioration du niveau nutritionnel avant et durant la lutte ; ceci constitue le flushing. Deux effets indépendants sont impliqués. Premièrement, l'incidence des ovulations multiples est positivement associée au poids vif à la lutte. C'est « l'effet statique » du poids vif. Deuxièmement, cette incidence est améliorée par l'augmentation du poids vif avant la lutte. C'est « l'effet dynamique » du poids vif (Coop, 1966 ; Khaldi, 1984).

Il a été démontré aussi que la supplémentation énergétique et protéique des brebis en bonne conditions corporelles et/ou bien alimentées n'a pas d'effet sur le taux d'ovulation (Morlev et al, 1978)

L'augmentation du taux est variable au cours de l'année. Les valeurs les plus faibles sont observées au printemps, et les plus élevées vers le milieu de la saison sexuelle (Khaldi, 1984).

L'administration d'un traitement de superovulation à des brebis recevant une ration alimentaire insuffisante peut conduire à la lutéolyse prématurée des corps jaunes chez prés de la moitié des animaux (Jabbour et al, 1991) et la production d'embryons dans ce cas est très faible.

Bien que ce phénomène soit plus fréquemment observé chez les caprins, il est décrit pour plusieurs races ovines, tant durant la saison qu'en dehors de la saison de reproduction (Baril et al, 1989).

Toutefois, ce phénomène n'est sans doute pas seulement assimilable à une mauvaise alimentation, la régression prématurée des corps jaunes implique sans doute une sécrétion prématurée de PGF2α.

c) Le choix de l'hormone du traitement:

Selon les études d'Armstrong et al (1983) ou de Tsunoda et Sugie (1989), le choix de l'hormone gonadotrope pour le protocole de superovulation est essentiel. Les résultats obtenus avec la pFSH sont supérieurs à ceux obtenus avec l'eCG (Cf. tableau XIX). Le rendement d'ovulation est de 16 corps jaunes par donneuse avec la pFSH contre 10 corps jaunes par donneuse pour l'eCG.

Des études comparatives ont montré la supériorité de ces extraits hypophysaires porcins (pFSH) ou ovins (oFSH) en termes de production d'embryons aptes au transfert (Cognié et Baril, 2002).

Tableau XIX: Effet du type de traitement de stimulation ovarienne sur la réponse et le nombre d'embryons transférables par femelle traitée (Cognié, 1984)

Espèce	Traitements	Corps jaunes	Embryons transférables
Ovins	pFSH (constant)	13,2	6,5
	pFSH (décroissant)	18,5	7,5
	PMSG (1200 UI)	9,3	1,9
	PMSG (3000 UI)	10,7	1,1

d) doses utilisées :

Les quantités de FSH à administrer pour obtenir la superovulation sont souvent exprimés en mg du standard Armour. La dose totale efficace varie largement selon la préparation hormonale et le génotype de la donneuse, et devrait être déterminée probablement au moyen d'une courbe dose réponse. Selon Smith et al, 1984 la dose optimum de FSHp à recommander est 22 mg Armour, dose pour laquelle le nombre le plus élevé d'embryon est atteint.

Les doses totales de FSHp les plus souvent préconisées chez la brebis sont comprises entre 16 et 21 mg Armour (Brebion et al, 1992 ; Tervit et al ,1984), mais ces doses peuvent s'avérer soit insuffisantes, soit au contraire excessives pour certains génotypes particuliers.

e) Répartition des doses et rapport FSH/LH :

Les protocoles à dose décroissante ont prouvé leur supériorité en termes d'ovulations produites, ceci pouvant s'expliquer par la similitude avec la physiologie endocrinienne durant la phase folliculaire où la sécrétion de FSH est réduite suite à l'augmentation de la concentration en œstradiol et inhibin A (Gonzales et al, 2004).

Un excès comme une insuffisance de LH diminuent la stimulation ovarienne. La mise au point d'une préparation hormonale extraite d'hypophyses de porcins, présentant FSH et LH en conditionnement séparé est devenue encore plus intéressant depuis qu'il a été montré qu'il été possible d'améliorer l'efficacité des traitements chez la brebis et la chèvre en administrant de façon séquentielle FSH en doses décroissantes et LH en doses croissantes (Thibault et Levasseur, 2001).

f) Utilisation d'un prétraitement:

Le niveau de la réponse ovarienne est lié au nombre et à la taille respective des follicules présents sur l'ovaire au moment de la stimulation, la présence d'un ou deux gros follicules (6mm) est préjudiciable. Chez la brebis, l'administration d'un agoniste de la GNRH pendant 14 jours ou d'un antagoniste pendant 10 jours, élimine tous ces gros follicules permettant une réponse accrue et une variabilité réduite (Cognie, 1999) (Cf. tableau XX).

Après ce traitement, le nombre de follicules dans la classe 1-2 mm est doublé, le taux d'atrésie folliculaire est significativement diminué et la réponse au traitement de superovulation est augmentée de 50% (Brebion et al, 1992).

Tableau XX: Production d'embryons chez la brebis après un prétraitement avec un antagoniste de GnRH (Antarelix®) de 11 injections (0.5mg/j) et de 3 injections (1,5 , 0,5 et 0,5mg) à 5 jours d'intervalle (Cognie et al, 2003).

Nombre d'injection d'Antarelix®	11	3
Nombre de brebis	22	23
Nombre de CJ/ donneuses	20.6 ± 10.2	18.4 ± 9.5
Œufs fécondés/œufs récoltés	309/344 (90%)	250/286 (87%)
Embryons transférables/brebis	12.0 ± 7.8	8.3 ± 5.6

g) Le nombre de traitement :

Les premières études qui impliquent des traitements répétés de superovulation ont montré que, bien que les réponses moyennes totales fusent satisfaisantes, il y avait une réduction progressive dans la proportion des brebis superovulées et une baisse considérable dans la moyenne du taux d'ovulation, surtout entre le premier et le deuxième traitement (Al Kamali et al, 1985; Fuki et al, 1985; McKelvey et al, 1986) (Cf. tableau XXI).

Tableau XXI: Nombre et qualité des embryons produits par les brebis Santa Inês soumises à deux traitements successifs avec pFSH (Cordeiro et al, 2002)

Traitement	Embryons récoltés	Qualité des embryons (%)			
		1	2	3	4
Premier	46	15 (32.6)	16 (34.8)	6 (13.0)	9 (19.6)
Second	33	6 (18.2)	13 (39.4)	3 (9.1)	11 (33.3)
Total	79	21 (26.6)	29 (36.7)	9 (11.4)	20 (25.3)

h) La technique d'insémination utilisée :

La technique d'insémination, naturelle ou artificielle, joue un rôle important sur le taux de fécondation des ovocytes et donc sur le rendement d'embryons transférables. La saillie naturelle apporte les meilleurs résultats, avec 75% de taux de fécondation, contre 55 à 60% pour l'insémination artificielle cervicale ou intra-utérine.

Dans le cas d'une insémination artificielle programmée à un moment déterminé après l'arrêt du traitement, le succès de la fécondation des ovocytes est en partie limité par la variabilité du moment de l'ovulation par rapport à l'insémination artificielle (Cognié et Baril, 2002).

Le passage des spermatozoïdes à travers le cervix est perturbé chez la brebis superovulée (Evans et Armstrong, 1984) et le taux de fécondation après une insémination artificielle cervicale est corrélé négativement au taux d'ovulation. Cependant, le dépôt de la semence 48-50 heures après le retrait de l'éponge, directement dans les cornes utérines ($80x10^6$ spermatozoïdes) sous contrôle laparoscopique, permet des taux de fécondation élevés chez les donneuses ayant moins de 30 ovulations (Cognié et Baril, 2002).

h) La technique de la récolte utilisée :

Les deux méthodes de collecte, chirurgicale, laparoscopique ont été comparées dans différentes études. La première comparaison se fit entre la technique chirurgicale et la technique laparoscopique par Baril et al dans les années 80. Ainsi le taux de récupération des embryons par laparoscopie atteint 62% contre 85% par technique chirurgicale, mais la formation d'adhérences est bien plus importante lors d'une laparotomie que par laparoscopie (Baril et al, 1987).

II-3) Les autres biotechnologies :

II-3-1) Production d'embryons in vitro :

La réserve ovocytaire est estimée chez la brebis à 160.000 ovocytes. Chez un animal soumis à des traitements de superovulation et récolte d'embryons, cette réserve ne conduit à la production moyenne que d'une centaine d'embryons sur toute la vie, il existe donc un gaspillage énorme du potentiel génétique femelle susceptible d'être mis au profit pour la production d'embryons.
C'est pourquoi furent mises au point des techniques de récupération d'ovocytes et des méthodes de fécondation in vitro (Hanzen, 2000)

A) Collecte des ovocytes :

La collecte en abattoir permet la production en laboratoire d'embryons de faible valeur génétique, mais en grand nombre pour des opérations de transgenèse, de clonage somatique ou de sexage d'embryon (Chemineau et al, 1999 ; Cognié 1999).
S'il s'agit d'une femelle de très haute valeur génétique, le prélèvement des ovocytes se fait sur animal vivant par ponction sous contrôle laparoscopique, technique appelée OPU (Ovum Pick Up) (Charles et Levasseur, 2001).

Cette technique peut être réalisée de façon répétitive chaque semaine sans perturber ni le fonctionnement ovarien, ni la fertilité. Contrairement à l'espèce bovine, seules quelques équipes dans le monde emploient cette méthode chez les ovins et caprins (Cognié et Baril, 2002).

B) capacitation in vitro des spermatozoïdes :

La capacitation des spermatozoïdes, après décongélation et centrifugation, est induite par l'incubation pendant une heure (1h) dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum de brebis en chaleur.

L'héparine qui est un activateur puissant de la capacitation du sperme de taureau, n'agit efficacement sur le sperme de bélier qu'en présence de sérum (Cognié et Baril, 2002).
Diverses substances sont connues pour augmenter la mobilité du sperme telles que la caféine et la théophylline, l'addition d'un mélange penicillamine, hypotaurine, et épinephrine (PHE) est connue également pour augmenter la mobilité du sperme et la pénétration de l'ovocyte (Hanzen, 2000).

C) fécondation et développement du zygote in vitro :

La fécondation in vitro (FVI) est réalisée dans une goutte de 50 à 100 microlitres sous huile de paraffine pour éviter toute évaporation (Hanzen, 2000).

Les ovocytes sont mis en contact pendant 17 heures avec les spermatozoïdes dans le milieu SOF (fluide d'oviducte synthétique) sous huile minérale dans une atmosphère à 5% de CO2 maintenue à 38,5°C (Cognié et Baril, 2002).

Les œufs sont cultivés à 38,5°C dans des microgouttes de SOF pendant 7 jours dans une atmosphère contenant 5% CO2, 5% O2 et 90% N2 (Charles et Levasseur, 2001).
Après FIV et culture, 30 à 40% des ovocytes forment des blastocystes, qui transplantés dans des femelles receveuses conduisent en moyenne à 50% de mise bas (Hasler, 2000).

III-3-2) sexage des embryons :

La détermination du sexe des embryons n'est envisageable qu'à l'age où s'effectue habituellement le transfert embryonnaire (Salas-Cortes, 2006). Afin de déterminer le sexe d'un embryon, plusieurs techniques ont été décrites (Hanzen, 2000)

- **Technique immunologique :** détection immunologique d'une mollécule de membrane, l'antigène *H-Y* considerée comme spécifique des cellules mâles.

- **Technique biochimique :** recherche de certaines enzymes spécifiques codées par des gènes localisés sur le chromosome X (le niveau d'expression de ces enzymes est double chez la femelle que chez le mâle).
- **Technique cytogénétique :** se base sur la taille du chromosome X qui est nettement plus grand que l'Y.
- **Technique d'hybridation in situ :** par microchirurgie, quelques cellules trophoblastiques sont prélevées, déposées sur une lame et traitées par hybridation in situ. Les cellules embryonnaires porteuses du chromosome Y détectées par présence au niveau de leur noyau d'un précipité de couleur noir.
- **Technique de PCR (plymérase chaine réaction) :** procédure d'amplification génique.
- **Technique de la cytomètrie en flux :** les spermatzoides mâles (chromosome Y) possèdent moins d'ADN que les spermatzoides femelles (chromosome X). c'est la technique la plus utilisée.

Pour répondre aux exigences de l'industrie du transfert d'embryon, la méthode de sexage doit être totalement fiable, rapide, efficace sur un grand nombre et ne pas entraîner d'effets préjudiciables sur la survie embryonnaire (Hanzen, 2000).

III-3-3) le clonage :

Cloner signifie reproduire à l'identique, en plusieurs exemplaires. C'est, en biologie, le contraire de la reproduction sexuée qui permet la naissance d'organismes génétiquement différents (Hanzen, 2000). Le clonage chez les mammifères a d'abord été réalisé par une simple division d'un embryon à un stade précoce de son développement. Cette technique, la bissection de l'embryon ne permet d'obtenir que 2 individus génétiquement identiques (Colleau et al, 1998), mais à une fréquence élevée puisque un embryon manipulé sur quatre, voire sur deux, donne naissance à une paire de jumeaux (Hanzen, 2000).

Aujourd'hui elle est uniquement utilisée pour répondre aux demandes en expérimentation animale nécessitant des jumeaux monozygotiques. Le terme de clone est de fait employé aujourd'hui pour désigner un animal produit par la technique dite de « transfert nucléaire ». Cette technique consiste à fusionner une cellule donneuse de noyau avec un ovocyte receveur préalablement énucléé. Il existe 3 origines possibles pour les cellules donneuses de noyau, une cellule embryonnaire (pré implantatoire), une cellule fœtale, ou une cellule adulte ou somatique (exemple de la brebis Dolly). Selon l'origine de la cellule donneuse de noyau, les résultats sont très différents, les pourcentages de blastocystes obtenus par rapport au nombre d'embryons reconstitués sont respectivement de 30, 25 et 10 % pour le clonage embryonnaire, fœtale et somatique. (Colleau et al, 1998), (Cognié et Baril, 2002).

III-3-4) La transgénèse :

Consiste à ajouter, remplacer ou inactiver un gène dans le génome d'un individu (Hanzen, 2000). L'application de la transgénèse aux animaux d'élevage permet d'obtenir des résultats majeurs tels qu'une résistance aux maladies, des améliorations de la qualité de la viande, du lait ou de la laine, une production accrue de protéines dans le lait ou la viande (animaux secrétant des produits biopharmaceutiques), ou encore des caractéristiques favorables à l'environnement. La production de protéines recombinantes représente l'un des succès principaux des biotechnologies (MacKenzie, 2005).

PARTIE EXPERIMENTALE

LIEU ET PERIODE DE L'EXPERIMENTATION :

Cette étude expérimentale a été réalisée au niveau de la station expérimentale de l'université SAAD DAHLEB de Blida durant la période allant du 17 Novembre 2007 au 30 Mars 2008.

I) INTRODUCTION :

En vue de production et de transfert d'embryons in vivo, on a soumis des brebis de race Hamra à un traitement de synchronisation/superovulation à base de pFSH/pLH,et des brebis de race mixte à un traitement de synchronisation à l'aide d'éponge vaginale et de PMSG .

II) MATERIEL ET METHODES :

II-1) Matériel :

II-1-1) Animaux :

Six (06) brebis et trois (03) béliers ont été choisis du cheptel ovin de la station expérimentale.

a) **les brebis** : ont été divisées en donneuses et receveuses :

- **Les donneuses** : 02 brebis de race Hamra (D1, D2) qui présentaient un âge moyen de 3 ans, un poids moyen de 51kg et une note d'état corporel moyenne de 3 points.

- **Les receveuses** : 04 brebis de race mixte (R1, R2, R3, R4) qui présentaient un âge moyen de 2 ans, un poids moyen de 48,5kg et une note d'état corporel moyenne de 2,75 points.

b) **les béliers** :

- Un (01) bélier de race Hamra présentait un âge de 6 ans et demi, un poids de 71kg et une note d'état corporel de 3,5 points. Ce bélier été utilisé pour la saillie des brebis donneuses.

- Deux (02) béliers de race Ouled Djellal, ont été utilisés pour la détection des chaleurs des donneuses et des receveuses. Les deux béliers présentaient un âge moyen de 2 ans et demi, un poids moyen de 69,5kg, et une note d'état corporel moyenne de 3,5 points.

Touts les animaux étaient mis au pâturage et recevaient du concentré et du foin. Ils étaient déparasités auparavant (déparasitage interne et externe) par le vétérinaire de la station expérimentale.

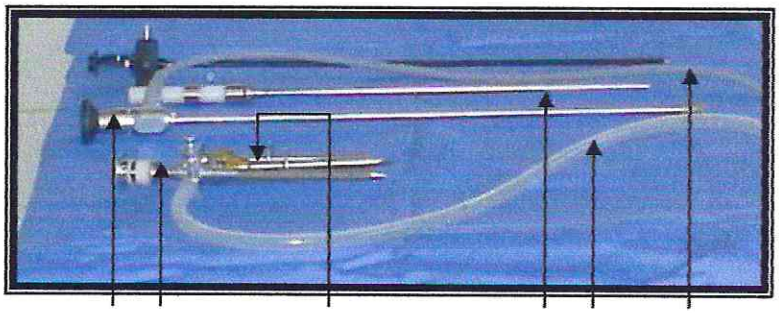
II-1-2) Appareillage, instruments et produits :

A) Appareillage et instruments :

- Un travail de contention et de pesée.
- Un échographe de type pie médicale 100Lc pourvu d'une sonde bifréquence 6/8 MHz
- Un tube de guidage (PVC).
- Un applicateur d'éponges vaginales.

❖ **matériel endoscopique** :

- Une table de contention inclinable (Cf. photo n°3).
- Endoscopie avec vision directe (0%), diamètre 6,5mm (STORZ).
- Générateur de lumière froide à intensité variable (STORZ).
- Câble de fibre optique (STORZ).
- Trocart avec canule à piston et orifice pour l'insufflation d'air (trocart de 7mm de diamètre recevant l'endoscope) (STORZ).
- Trocart avec canule de 5mm recevant la pince à préhension (STORZ).
- Pompe avec filtre et commande de pompe au pied (STORZ).
- Tuyau de connexion entre la pompe et le robinet d'arriver de l'air fixé sur le trocart recevant l'endoscope.
- Pince à préhension atraumatique.



a b c d e f

a: endoscope avec vision directe, **b**: trocart avec canule à piston, **c**: trocart avec canule de 5mm, **d**: pince à préhension, **e**: tuyau de connexion, **f**: câble de fibre optique.

Photo n°1: Matériel endoscopique.

Photo n°2: Générateur de lumière froide

Photo n°3 : Table de contention inclinable

B) Produits :

- **Eponges vaginales** : nous avons utilisé des éponges vaginales, imprégnées chacune de 40mg d'acétate de fluorogestone (FGA) ; ce produit commercialisé sous le nom de Chronogest(ND).
- **PMSG (eCG)** : la gonadotrophine sérique purifiée et lyophilisée utilisée dans notre étude est commercialisée sous le nom de FOLLIGON(ND).
- **pFSH** : Extrait hypophysaire porcins purifié (STIMUFOL(ND)).
- **pLH** : Extrait hypophysaire porcins purifié (STIMUFOL(ND)).
- **Antibiotique, désinfectant et lubrifiants** :

  - La terramycine.
  - Le permanganate de potassium pour la désinfection de l'applicateur après chaque utilisation.
  - la vaseline et gel.

II-2) Méthodes :

II-2-1) Examen échographique :

Les brebis vident ont été sélectionnées après deux examens échographiques à un intervalle de un mois, et pour cela nous avons utilisé les deux voies : transrectale et transabdominale, comme décrites par KAHN (1994). Pour la première voie, les brebis ont été examinées en position couchée et debout .La sonde bifréquence 6/8 MHz a été fixée à un tube de guidage (PVC) ce qui permet l'introduction de la sonde et sa manipulation externe (Cf. photo n°4).

Pour la deuxième voie, transabdominale, les brebis ont été examinées en position debout .La sonde enduite de gel est appliquée en avant de la mamelle de préférence à droite, orientée dorso-caudalement, et pressée modérément sur la paroi abdominale. Pour faciliter cet examen, un aide qui se plaçait à gauche de l'animal tenait le membre postérieur droit en extension pour dégager la région inguinale.

Photo n° 4: examen échographique de gestation.

Pour l'interprétation de l'image échographique sur l'écran, on visualisait les différentes couches traversées par les ultrasons.

Pour l'utérus non gravide, on recherchait ce dernier dans la région de l'apex de la vessie, l'échogénicité de sa paroi est homogène et grossièrement granuleuse.

Si l'animal était gestant, il était possible de visualiser les vésicules embryonnaires (zone anéchogène circulaire) voire les embryons, les placentomes apparaissaient comme de petites zones échogènes à la surface de l'endomètre.

Cette technique est utilisée à la fois pour le diagnostic de gestation, la détermination du nombre de fœtus (Russel et Goddard 1995).

II-2-2) Protocole de synchronisation/superovulation :

A) La synchronisation des chaleurs :

Les donneuses et les receveuses étaient soumises à une série d'interventions chronologiques précises.

Le traitement progestatif a débuté le 02/02/2008 .Il consisté en la mise en place des éponges vaginales imprégnées de 40mg de FGA pendant 14 jours. Chez les receveuses, une injection de 500UI de PMSG était effectuée le jour du retrait de l'éponge soit 12h avant les donneuses.

A-1) Mode d'application des éponges :

L'éponge pulvérisée avec de la terramycine était mise dans le tube de l'applicateur et poussée au bout de ce dernier par le poussoir. Après, immobilisation de la brebis et désinfection de sa vulve, l'applicateur était introduit jusqu'au fond du vagin, tout en évitant le traumatisme du méat urinaire. L'éponge était ainsi mise en place et l'applicateur pouvait être retiré soigneusement laissant le fil entre les deux lèvres vulvaires.

B) La superovulation :

L'administration de pFSH était effectuée pendant les trois derniers jours du traitement progestatif. Chaque brebis a reçu en intramusculaire 16mg de pFSH (du standard Armour) réparties en 6 injections à doses décroissantes et espacées de 12 heures. Les deux dernières injections étaient enrichies en pLH .Le rapport FSH/LH des deux dernières injections étaient respectivement de 0,3 et 0,22.

Le protocole de synchronisation et de superovulation est illustré dans la figure n° 1

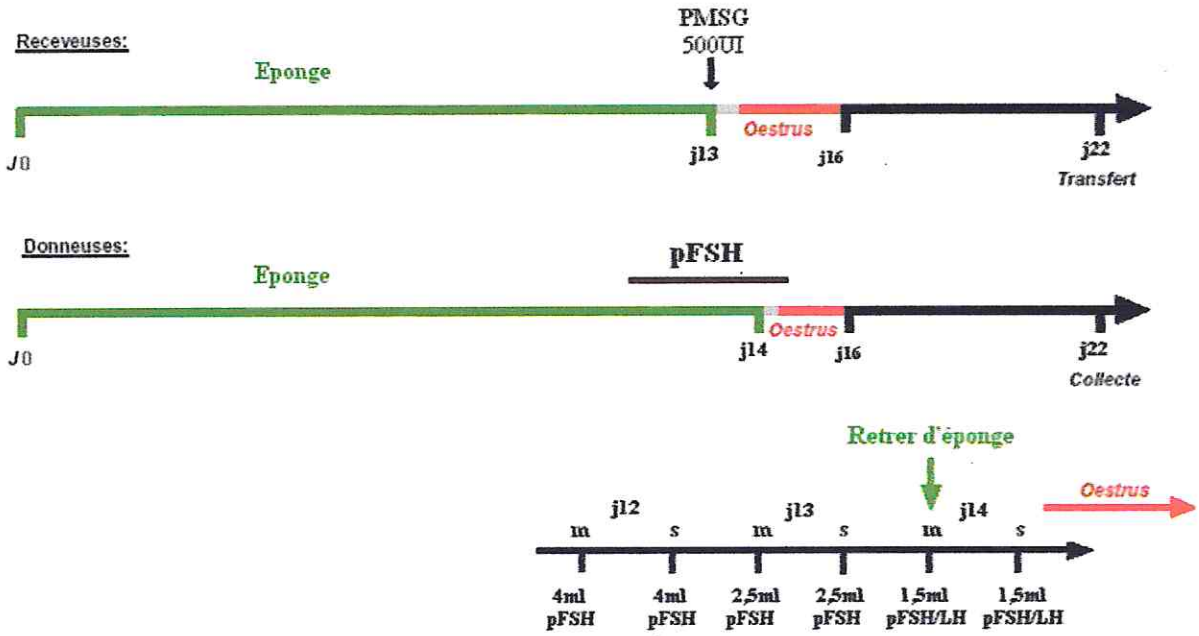


Figure n°1 : Protocole de synchronisation/superovulation des brebis donneuses et receveuses.

II-2-3) Détection des chaleurs et saillie :

La détection des chaleurs commençait à 16 et 24 heures après le retrait du dispositif intravaginal chez les donneuses et les receveuses respectivement. Elle était réalisée à l'aide de deux béliers muni chacun d'un tablier pour éviter la saillie (Cf. photo n°5) et à raison d'une heure d'observation chaque 4 heures jusqu'à la disparition des signes d'oestrus. Toute brebis restant immobile lors du chevauchement était considérée en chaleur.

Photo n°5: Détection des chaleurs chez les receveuses.

Toute donneuse détectée en chaleur était saillie trois fois avec un bélier de race Hamra (Cf. photo n°6).

Photo n°6: Saillie naturelle des donneuses

II-2-4) Examen endoscopique :

Les brebis étaient mises à la diète pendant les 24 heures qui précèdent l'intervention. Une tranquillisation était faite en IM avec une dose de 0,1mg/kg de xylazine.

Une fois la paroi abdominale ventrale, cranialement à la mamelle, tondue, rasée puis désinfectée; l'animal était placé en décubitus dorsal sur la table de contention à plan inclinable, la tête vers le bas avec un angle de 45°-60° par rapport à l'horizontale afin de faciliter l'accessibilité et la manipulation des organes génitaux.

Deux incisions de la peau abdominale ventrale étaient effectuées 3 à 4cm de part et d'autre de la ligne blanche et 5 à 7cm cranialement à la mamelle.

Une canule de 7mm de diamètre, munie de son trocart, était introduite à travers la première incision, le trocart était ensuite remplacé par l'optique de l'endoscope. Un pneumopéritoine était pratiqué permettant ainsi la visualisation et la manipulation du tractus génital.

La deuxième canule de 5mm, recevant une pince atraumatique était introduite au niveau de la seconde incision, afin de manipuler les ovaires et dénombrer les corps jaunes (Cf. photo n°7)

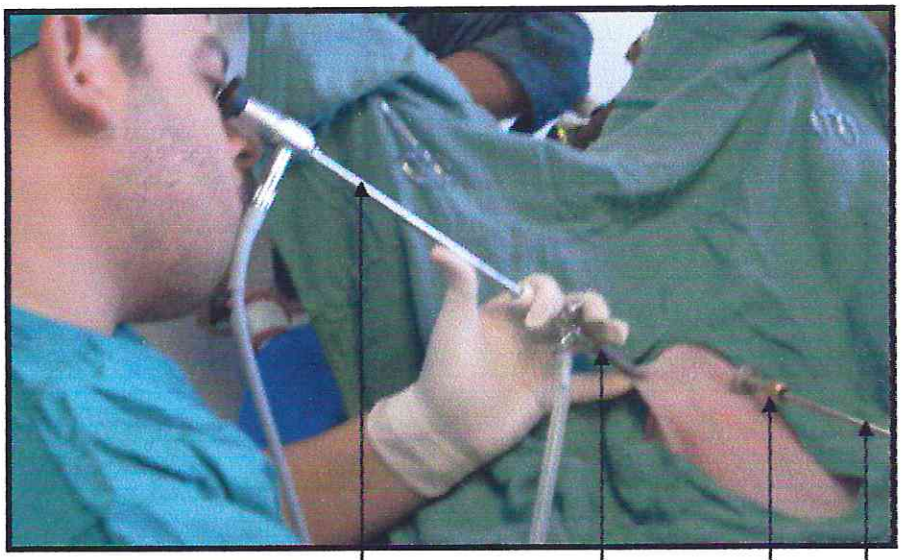


Photo n°7: Evaluation de la réponse ovarienne

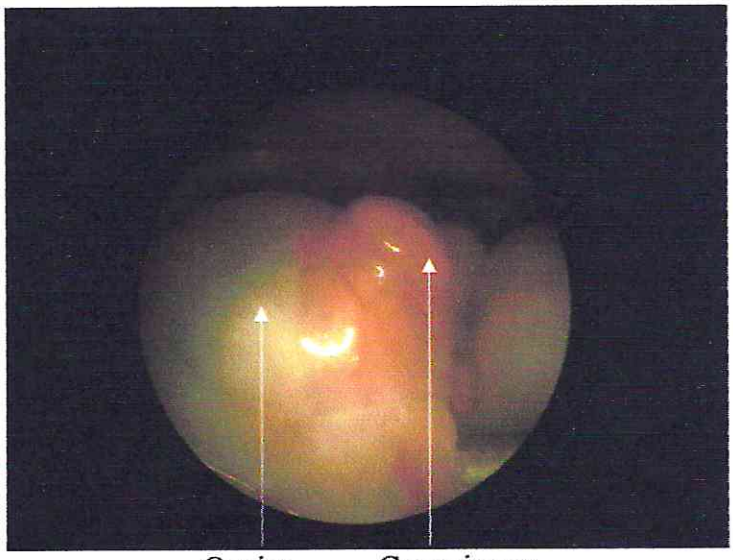


Photo n°8 : Image endoscopique d'un ovaire.

III) RESULTATS :

III-1) Les donneuses:

III-1-1) L'expression des chaleurs :

Les résultats de la détection des chaleurs des brebis superovulées sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau I: Résultats de la détection des chaleurs chez les brebis superovulées.

Brebis	Chaleurs après retrait de l'éponge (heures)		
	Début	Fin	Durée
D1	20	52	32
D2	24	44	20
Moyenne	22 ± 2	48 ± 4	26 ± 6

Nous avons remarqué que les chaleurs ont débutés 20 heures après le retrait des éponges. Alors que la fin de ces dernières a été observée 52 heures après le retrait. La durée moyenne des chaleurs est de 26 ± 6 h. Elle est plus longue chez la brebis D1 (environ 30h) que chez la brebis D2 (environ 20h).

III-1-2) Evaluation de la réponse ovarienne :

L'évaluation de la réponse ovarienne par le dénombrement des corps jaunes a été réalisée juste avant la récolte des embryons à l'aide d'un examen endoscopique .Les résultats de dénombrement sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II: Réponse ovarienne globale chez les brebis superovulées.

Brebis	Nombre de corps jaunes
D1	14
D2	09
Total	**23**
Moyenne	**11,5 ± 2,5**

Les résultats montrent que la réponse ovulatoire moyenne chez les deux brebis est de 11,5 ± 2,5 corps jaunes .La brebis D1 présente une réponse plus importante que celle de la brebis D2 (14 corps jaunes vs 09 corps jaunes).

Tableau III: Réponse ovulatoire par ovaire chez les brebis superovulées.

Brebis	Nombre et moyenne des corps jaunes		
	Ovaire gauche	Ovaire droit	Moyenne
D1	08	06	07
D2	03	06	04,50
Moyenne	**05,50 ± 2,50**	**06**	**05,75 ± 1,49**

Les résultats montrent que la réponse ovulatoire moyenne par ovaire chez les deux brebis est de 05,75 ± 1,49 corps jaunes.

III-2) Les receveuses :

III-2-1) L'expression des chaleurs :

Les résultats de détection des chaleurs des brebis receveuses sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV: Résultats de détection des chaleurs chez les receveuses.

Brebis	Chaleurs après retrait d'éponge vaginale (heures)		
	Début	Fin	Durée
R1	25	64	39
R2	/	/	/
R3	29	60	31
R4	33	64	31
Moyenne	29 ± 3,20	62,66 ± 1,33	33,66 ± 2,66

Les constations obtenus lors d'induction /synchronisation des chaleurs des brebis receveuses montrent que les brebis (R1, R3 et R4) ont exprimées des signes d'œstrus, alors que les seuls signes observés chez la brebis R2 étaient une congestion et une tuméfaction de la muqueuse vulvaire.

Les chaleurs ont débutées en moyenne 29 heures après le retrait de l'éponge vaginale avec une durée moyenne de 33,66 ± 2,66 h.

III-2-2) Evaluation de la réponse ovarienne :

Elle a été réalisée juste avant le transfert à l'aide d'un examen endoscopique. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau V: Réponse ovulatoire chez les receveuses

Brebis	**Nombre de corps jaune**		
	Ovaire gauche	**Ovaire droit**	**Total**
R1	00	03	03
R2	01	00	01
R3	00	01	01
R4	01	00	01
moyenne	0,5	01	1,5 ± 0,5

Les résultats obtenus montrent que toutes les brebis ont présenté au moins un corps jaune actif sur l'un des ovaires, avec une réponse plus importante (trois corps jaunes) chez la brebis R1.

CHAPITRE II

Récolte et transfert d'embryons

Les données rapportées dans ce chapitre concernent l'opération de récolte d'embryons chez des brebis de race Hamra et de leur transfert chez des brebis de race mixte.

I) MATERIEL ET METHODES :

I-1) Matériel :

I-1-1) Animaux : Cette partie de l'expérimentation a portée sur les même brebis (02 donneuses et 04 receveuses) présentées dans le chapitre I.

I-1-2) Instruments et produits de préparation du champ opératoire et des soins post opératoire:

- Savon et éponges.
- Rasoir et lame de rasoir.
- Champs de tissu.
- Pinces pour la fixation des champs.
- Des ciseaux
- Alcool iodé.
- Alcool chirurgical
- Lame de bistouri et porte lame.
- Aiguilles et porte aiguilles
- Pinces hémostatiques.
- Sonde cannelée.
- Fil de suture résorbable ((Vicryl décimale EP/2 et 5) et non résorbable (EP/6)
- Pré anesthésique (xylazine)
- Anesthésique local (xylocaïne à 2 %)
- Anesthésique général (kétamine)
- Antibiotique injectable et pour la pulvérisation sur les sites de ponction et d'incision de l'abdomen
- PGF2α (Estrumate)

I-1-3) Matériel et produits de manipulation des embryons :

- PBS (Phosphate Buferred Saline).
- NaCL isotonique
- Sonde de folley pédiatrique de 30cm.
- Cathéter 16 G.
- Clamps vasculaires.
- Seringues de 50ml pour injecter le PBS.
- Flacons de récolte stérile.
- Boites de pétrie carrées quadrillées.
- Petites boites de pétrie ronde.
- Une pipette en verre montée sur une seringue à insuline
- Loupe binoculaire (Nikon) et microscope inversé (Hund)
- Bain-marie.

I-2) Méthodes :

La récolte des embryons a été réalisée 6 jours après la saillie des donneuses.

I-2-1) Préparation des animaux :

Les brebis étaient mises à la diète 24 h avant la récolte. Une tranquillisation était faite en IM avec une dose de 0,1mg/kg de xylazine. L'animal était mis en décubitus dorsal sur une table et la paroi abdominale ventrale cranialement à la mamelle était tondue, rasée et nettoyée. La brebis était ensuite placée sur une autre table de contention à plan inclinable, tête en bas, avec un angle de 45°-60° par rapport à l'horizontale afin de faciliter l'accessibilité et la manipulation des organes génitaux.

Une fois sur la table, une anesthésie générale était induite par l'administration de kétamine. Le champ de tissu était fixé après une désinfection du site opératoire avec de l'alcool chirurgicale et iodée.

I-2-2) Collecte d'embryons :

Avant de procéder à la récolte des embryons on avait fait un examen laparoscopique, tel que décrit dans le premier chapitre, dans le but était de vérifier la réponse des brebis au traitement de synchronisation/superovulation et l'état de l'appareil génital.

Si le résultat de l'examen laparoscopique était favorable (présence de nombreux corps jaunes actifs sur les deux ovaires et absence de toute anomalie entravant la réalisation de la récolte) l'opération était alors lancée, une incision était pratiquée sur la ligne blanche à quelque centimètre (3 à 4cm) en avant de l'attache de la mamelle. Une fois les deux cornes utérines étaient extériorisées à l'aide du forceps guidé par la vision endoscopique, l'ensemble du matériel laparoscopique était retiré.

L'une des cornes était ponctionnée à l'aide de petits ciseaux pointus sur la grande courbure à hauteur du ligament inter cornéal, laissant ainsi le passage d'une sonde de Folley pédiatrique dont le ballonnet était gonflé avec du PBS, il permet de fixer la sonde dans la corne et éviter le reflux du liquide de collecte .L'autre extrémité de la corne était ponctionnée au niveau de la jonction utéro-tubaire d'où un cathéter était introduit permettant ainsi l'injection de 40ml de PBS. La récupération du milieu s'effectuait par la sonde de Folley dans un flacon stérile et pour pouvoir récupérer le maximum du liquide injecté, un petit massage de la corne était pratiqué. Le flacon était ensuite fermé et identifié puis mis dans un bain-marie à 37°C.

Une fois les deux cornes collectées, une suture par un point simple de l'incision ayant permis l'insertion de la sonde de Folley était effectuée avec du fil résorbable ($Vicryl_2^{®}$) .Les cornes étaient remises en place, la paroi abdominale était suturée par des points en croix avec du $Vicryl_5^{®}$ et la peau par un surjet simple à points passés avec du fil non résorbable (6).

I-2-3) Tri et sélection des embryons :

Après décantation du liquide de récolte, le décantât était mis dans une boite quadrillée et examiné sous une loupe binoculaire. A l'aide d'une pipette en verre connectée à une seringue à insuline, les embryons étaient aspirés et placés dans une petite boite de pétrie ronde contenant un milieu de conservation.

L'identification du stade de développement et de la qualité des embryons (Cf. photo n°9), était réalisée sous microscope inversé (grossissement x 60).

Photo n°9: recherche et classification des embryons.

On procédait à la détermination de leur stade de développement selon la nomenclature de l'IETS. Une fois le stade de développement identifié, la qualité de l'embryon était donnée en suivant les mêmes normes. On procédait alors au conditionnement des embryons transférables dans des pipettes en verre connecté à une seringue à insuline. Chaque pipette contenait deux embryons placés entre deux bulles d'air pour éviter leur déplacement à l'une des extrémités (Cf. figure n°2).

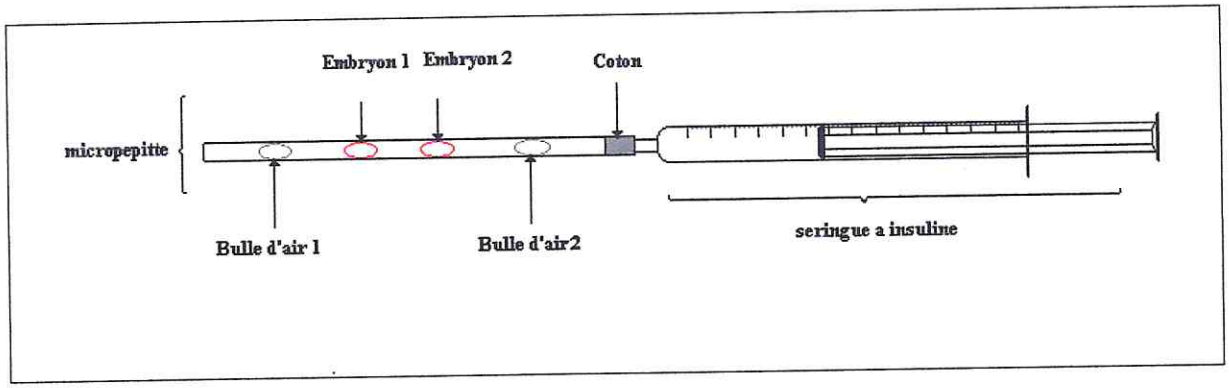


Figure n°2 : Schéma de montage de deux embryons pour un transfert en frais.

I-2-4) Transfert des embryons :

L'opération du transfert commençait juste après sélection des embryons transférables, par la préparation des receveuses de la même manière que pour les donneuses : diète complète auparavant, tranquillisation à base de xylazine, rasage, mise en place sur la table de contention à plan inclinable, fixation du champ de tissu, nettoyage et désinfection du site opératoire.
Puis on réalisait un examen laparoscopique, le même décrit dans la récolte, dans le but de vérifier la réponse des brebis au traitement de synchronisation par la recherche de corps jaunes.

Une fois que la réponse était jugée positive (présence d'au moins un corps jaune actif) le transfert était alors lancé.

L'extériorisation du tiers supérieur de la corne utérine ipsilatérale au corps jaune était effectuée à l'aide d'un forceps sous endoscopie. Une fois l'extrémité de la corne était saisie l'ensemble du matériel laparoscopique était retiré.

Une ponction de la paroi utérine était réalisée avec une aiguille 16 Gauges afin de faciliter l'introduction l'extrémité de la pipette en verre contenant les deux embryons.
Une fois les embryons injectés, la corne était remise à sa place et la peau était suturée par un point simple avec du fil non résorbable.

I-2-5) Soins postopératoire :

Juste après avoir terminé les sutures, la plaie de suture ainsi que les points d'insertion des trocarts sont pulvérisés par un antibiotique à usage externe, puis un traitement antibiotique, quotidien, à base de pénicilline-streptomycine en injection IM était réalisé pendant quatre jours afin d'éviter les infections .

Les brebis donneuses avaient reçu un traitement à base de PGF2α (Estrumate) à raison de deux injections en IM de 0.4ml le jour et le lendemain de l'intervention afin d'interrompre une éventuelle gestation. Les animaux étaient mis au calme et reprenaient normalement leur alimentation.

Des visites quotidiennes étaient faites pour s'assurer de l'état de santé des animaux et du bon déroulement de la cicatrisation des plaies et cela jusqu'à l'exérèse définitive des fils, 12 jours après l'intervention.

I-2-6) Diagnostic de gestation :

Quarante jours après transfert on avait réalisé le diagnostic de gestation chez les receveuses à l'aide d'un examen échographique avec la même technique décrite dans le premier chapitre.

II) PARTIE RESULTATS :

II-1) Dénombrement direct des corps jaunes:

Les résultats de confirmation du nombre de corps jaunes par dénombrement direct de ces derniers après extériorisation des ovaires, étaient les mêmes que ceux obtenus par l'examen endoscopique pour les deux brebis D1 et D2. On a noté que la brebis D2 avait présenté un follicule sur chaqu'un des deux ovaires (Cf. photo n°10).

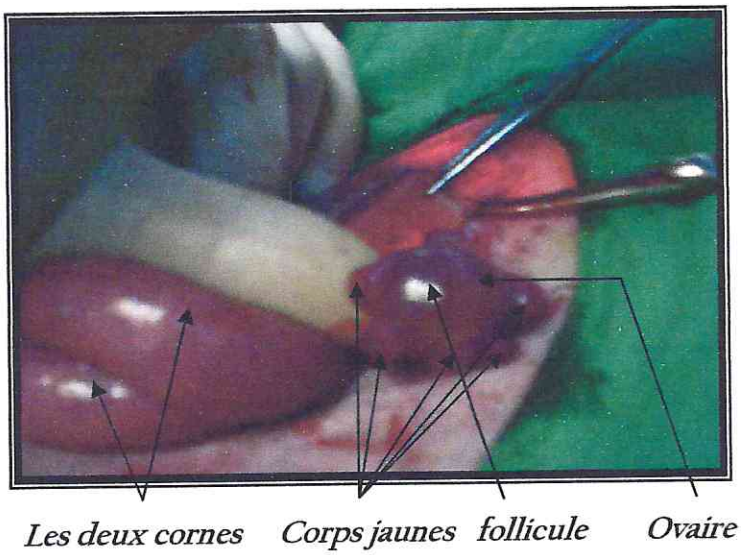


Photo n°10: Dénombrement direct des corps jaunes chez la brebis D2.

II-2) la collecte :

A- Taux de récupération :

Les résultas obtenus après récupération et examen sous une loupe binoculaire du liquide de récolte sont représentés dans les tableaux suivants.

Tableau VI: taux de récupération

Brebis	Nombre de CJ	Nombre de structures Récoltées	Taux de récupération
D1	14	14	100%
D2	09	07	77,77%
Taux moyen	11,50 ± 2,50	10,50 ± 3,50	91,30%

On constate que le nombre de structures récoltées (embryons ou ovocytes non fécondés) chez les deux brebis est de 21 avec un taux de récupération moyen de 91,30%.

B- Taux moyen des structures récoltées :

Les taux moyen des structures récoltées par corne et par brebis sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau VII : Taux moyen des structures récoltées par brebis.

Brebis	Structures récoltées
D1	14
D2	07
Total	21
Moyenne	10.5 ± 3,5

Nos résultats montre que la moyenne des structures récoltées pour les deux brebis est de 10,5 ± 3,5.

Tableau VIII: Taux moyen des structures récoltées par corne.

Brebis	Structures récoltées	
	Corne droite	Corne gauche
D1	06	08
D2	05	02
Total	11	10
Moyenne	05,5 ± 0,5	05 ± 3,0

Nous avons constaté que la moyenne des structures récoltées est de 05,5 ± 0,5 et 5 ± 3,0 pour la corne droite et gauche respectivement.

C- Taux de fécondité :

Les résultats de fécondation sont reportés dans le tableau IX :

Tableau IX: taux de fécondité

Brebis	Structures récoltées		Taux de fécondité
	Embryons	ovocytes	
D1	14	00	100%
D2	01	06	14,28%
Moyenne	7,50 ± 6,36	03 ± 3,00	71,42%

Le tableau IX montre que les 14 structures récoltées de la brebis D1 étaient des embryons, alors que la brebis D2 n'avait donné qu'un seul embryon sur sept (07) structures récoltées, se qui donne un taux de fécondité moyen pour les deux brebis de 71,42%.

D- Qualité des structures récoltées :

Le tableau X présente la qualité des embryons récoltés, ce qui permettra d'évaluer la capacité des embryons à être transférés. Seuls les embryons de classe 1, 2 seront utilisés pour le transfert.

Tableau X: classification des embryons selon leur qualité.
(B) Blastocyste ; (M) Morula ; (NF) Œuf non fécondé (D) embryon dégénéré

Brebis	Nombre de structure récolté	Embryon			
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
D 1	14	07 (M)	04 (03M+01B)	00	03 (D)
D 2	07	00	01(B)	00	06 (NF)
Total	21	07	05	00	09
moyenne	10,5 ± 3,5	3,5 ± 3,5	2,5 ± 1,5	00	4.5 ± 1,5

On constate à partir du tableau X que le nombre moyen d'embryons de classe 1, 2, 3 et 4 est respectivement de 3,5 ± 3,5, 2,5 ± 1,5, 00 et 4.5 ± 1,5 embryons (Cf. figure n°3 et photos 11,12 et 13).
On a remarqué que le nombre d'embryons transférables chez la brebis D1 est supérieur à ce lui de la brebis D2 (11 vs 01).

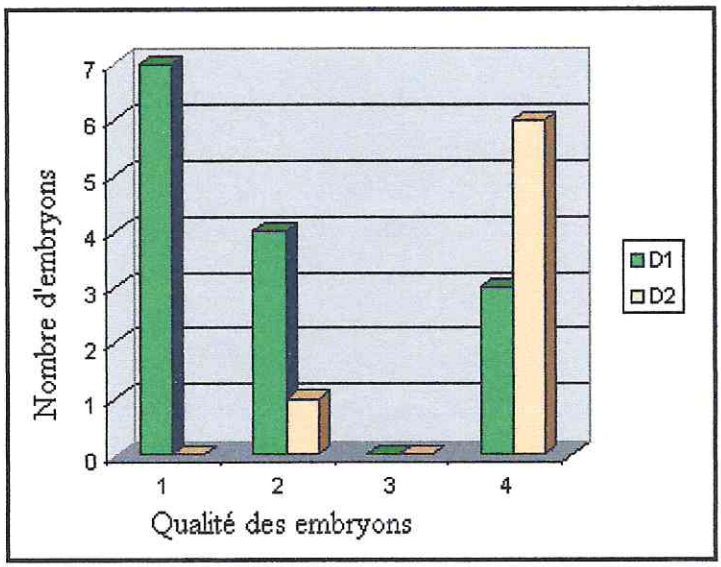
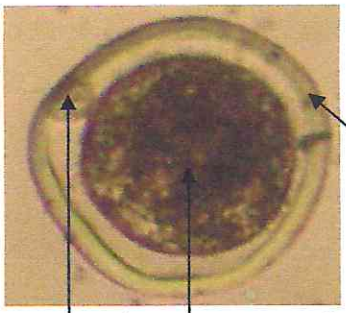


Figure n°3 : Qualité des embryons des donneuses.



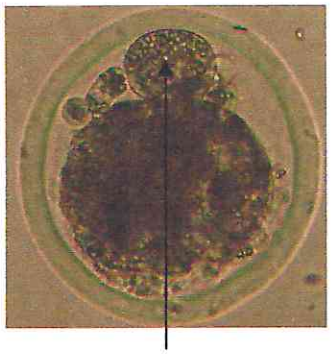
Chromatine condensée
Globule polaire

Zone pellucide

Blastomères

Photo n°11: Œuf non fécondé

Photo n°12: Morula (classe 1)



Blastomères détachés

Blastocoele *Trophoblaste*
Bouton embryonnaire

(a) **(b)**

Photos n°13: (a)Morula et (b) jeune blastocyste (Classe 2).

Le tableau XI illustre le nombre et les taux d'embryons transférables.

Tableau XI : Nombre et taux d'embryons transférables.

	Embryons	
	Nombre	**Taux %**
Récoltés	15	71,42
Classe 1	07	46,66
Classe 2	05	33,33
Transférables	12	80

A partir du tableau XI on déduit que la moyenne des embryons transférables est de 6 embryons par brebis avec un taux de 80% dont 46,7% sont de classe 1 et 33,3% de classe 2.

II-3) Résultats du transfert:

A- Détermination du taux de gestation

Les résultats de diagnostique de gestation sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII: taux de gestation

Brebis	Nombre d'embryons Transférés	Gestation
R1	02	+
R2	02	+
R3	02	+
R4	02	-
Total	08	03
Taux de gestation		75 %

Trois (03) receveuses, étaient confirmées gestantes R1, R2, et R3, dont une, R2, présente une gestation gémellaire.

Le taux de gestation est obtenu par la formule suivante : Taux de gestation (%) = Nombre de femelles gestantes / Nombre de receveuses X100 = 75%.

Les résultats du dénombrement direct, après examen échographique, des embryons viables sont reportés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Taux de viabilité des embryons transférés

brebis	Nombre d'embryons transférés	Nombre de fœtus
R1	02	01
R2	02	02
R3	02	01
R4	02	00
Total	08	04

De ce tableau, on constate que 04 sur les 08 embryons transférés sont viables.

Les images échographiques obtenues, chez les brebis R2 et R3, à 40 jours du transfert sont présentées dans les figures 14 et 15 :

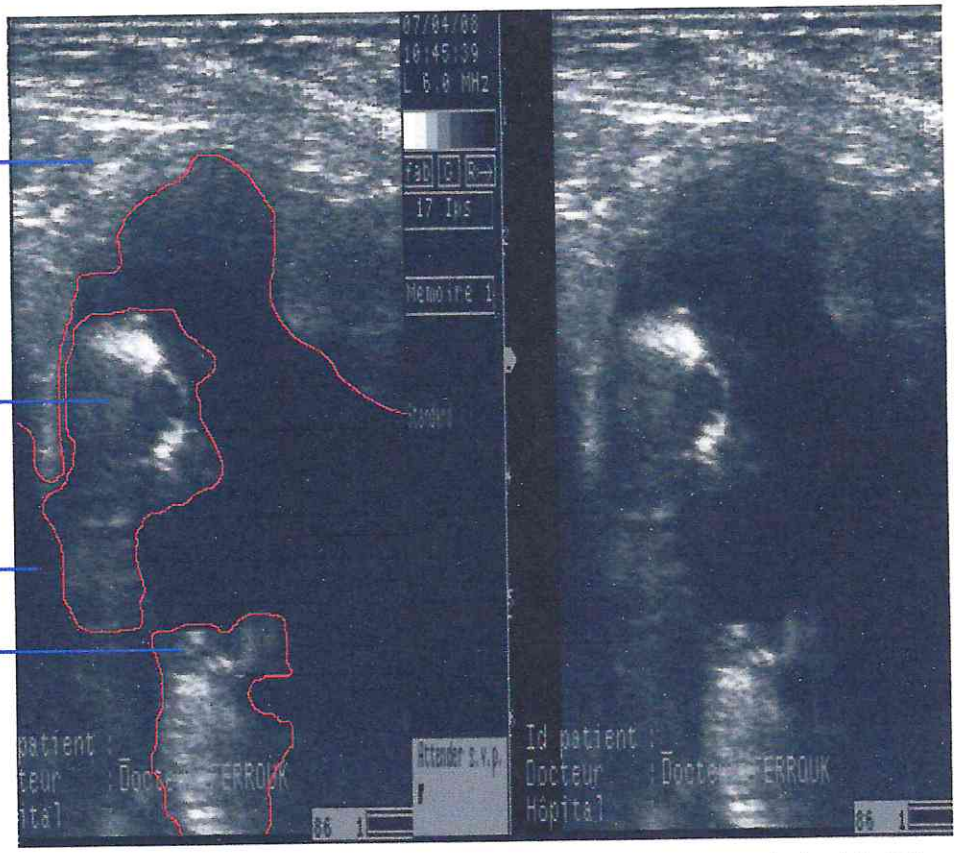


Photo n°14: image échographique présentant la gestation gémellaire de la brebis R2.

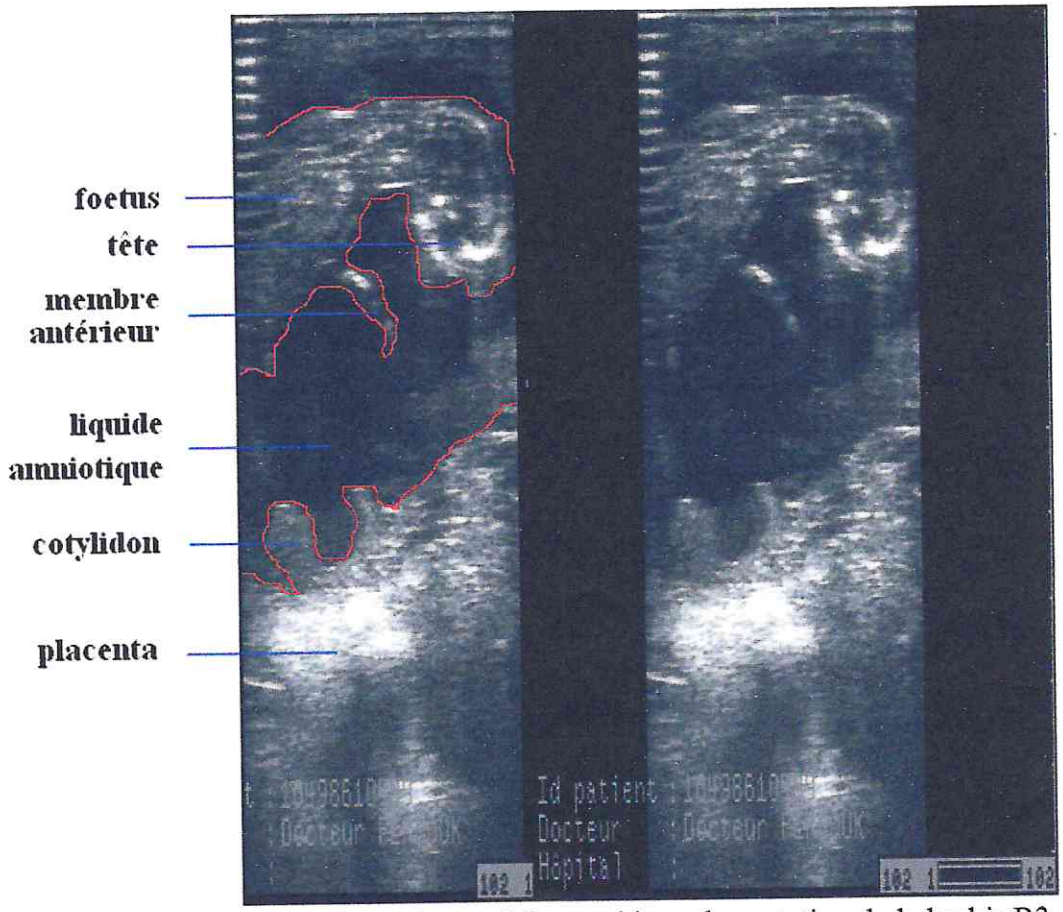


Photo n°15: image échographique de gestation de la brebis R3.

CHAPITRE III

Discussion

I) EVALUATION DE LA REPONSE OVARIENNE AU TRAITEMENT DE SYNCHRONISATION/SUPEROVULATION :

A) Expression des chaleurs :

A-1) chez les Donneuses :

Les résultats relatifs à l'apparition des chaleurs montrent que les donneuses ont présentés des œstrus dans les 24 heures qui ont suivie le retrait de l'éponge vaginale, avec une moyenne d'apparition de 22 ± 2,0h.

En effet, nos résultats sont comparables à ceux obtenus par :

- Simonetti et al, (2008) qui après un traitement à base de oFSH + eCG, chez la race Corriedale, rapportent que le début d'œstrus est observé à 22.0 ± 1.4h.
- Jabbour et Evans (2006) et Okada et al, (2000) qui rapportent que les chaleurs sont observées à 24,7 ± 2,3h et 22,7 ± 3,1h chez la race Merinos et Suffolk respectivement.

Aussi, selon Brebion et Baril (1993), environ 85% des brebis de race Lacaune, traitées avec de la pFSH, viennent en œstrus entre 16 et 28 heures après le retrait de l'éponge.

Cependant, elles sont précoces par rapport aux résultats décrits par Naqvi et Gulyani (1999) et Cordeiro et al, (2003) qui, en utilisant de la pFSH chez la race Rambouillet et Santa Inês obtiennent respectivement (45,4 ± 4,03h) et (36 ± 2,7h).

La fin des chaleurs est survenue 48 heures après le retrait des éponges, soit une durée moyenne des chaleurs de 26 ± 6,0h, ce qui offre une similitude (28,7 ± 4,76h) avec celle obtenue par Naqvi et Gulyani (1999) chez la race Rambouillet. Par contre, notre résultat est nettement inférieur à celui obtenu par Cordeiro et al, (2002) qui rapportent une durée de 43 ± 3,7h chez la race Santa Inês.

Il est à noter aussi, que selon (Cognie et Pelletier, 1976) l'œstrus survient plus tard chez les brebis allaitantes que chez les brebis taries et que le moment d'apparition de l'œstrus après traitement progestatif varie selon la race de la brebis.

L'intervalle fin du traitement-apparition des chaleurs est plus court pendant la saison sexuelle que pendant l'anœstrus (Mauer et al, 1972).

A-2) chez les Receveuses :

Le début des chaleurs est survenu 29 ± 2,3h en moyenne après l'injection de PMSG. Elles ont durée en moyenne 33,7 ± 2,66h.

Nos résultats sont comparables à ceux de Brice et al, 1984 cité par Cognié en 1988 qui rapportent que les brebis rentrent en chaleur 30 heures après la fin du traitement avec une dose de 800 UI de PMSG, alors que cet intervalle est de 35 heures lorsque la dose utilisée est la même que la notre soit 500 UI.

Cependant, elles sont tardives par rapport à celle observées chez la race Suffolk (22,7±3,1h) comme rapporté par Okada et al, (2000). Elles sont par ailleurs précoces comparées à celle observées par Riesenberg et al, (2000) qui rapportent que 100 % des brebis sont venues en chaleurs à 40 heures après une injection de PMSG pratiquée le jour du retrait de l'éponge.

Selon Cognie et al, (1970), l'injection de la PMSG réduit l'intervalle fin de traitement-apparition de l'œstrus. Cette réduction varie de 5 à 14 heures selon la dose de PMSG et la saison. En effet, les femelles ayant reçues une injection de PMSG au retrait de l'éponge vaginale, viennent en chaleurs en moyenne 36 heures plus tard avec un retard de 12 heures par rapport aux donneuses traitées avec FSHp. D'ou l'intérêt d'arrêter le traitement progestatif des receveuses avec une avance de 12 heures par rapport à celui des donneuses.

Il en ressort que pour notre étude, il y'a une synchronisation des chaleurs entre les donneuses et receveuses (29 ± 2,3 vs 22 ± 2,0h). Selon Baril (1993), une certaine tolérance est permise (±1 jour), meilleure est la synchronisation des stades physiologiques entre donneuses et receveuses, meilleure sera le taux de réussite des transferts.

On tient à signaler que la brebis R2, est une agnelle qui n'a pas présenté de chaleur. Le seul signe apparent été la congestion et la tuméfaction de la muqueuse vulvaire. Cependant, la présence de corps jaune fonctionnel le jour de l'examen endoscopique (7 jour après retrait de l'éponge) nous laisse penser que soit la brebis a manifesté des chaleurs silencieuses ; soit qu'elle est délaissée par les béliers détecteurs en présence de brebis plus expérimentées. Ces mêmes constatations ont été signalées par Baril (1993).

B) Taux d'ovulation (nombre de corps jaunes CJ) :

B-1) chez les donneuses :

L'examen laparoscopique nous a permis de constater que la réponse ovarienne moyenne des brebis superovulées est de 11,5 ± 2,5 CJ par brebis. Notre résultat est comparable à celui obtenu par D'Alessandro et al, (2005) et Giovanni et al, (2001) qui rapportent une réponse de 11,9 ± 1,6 CJ et 11,8 ± 4,0 CJ respectivement.

La réponse moyenne que nous avons obtenue est placée dans l'intervalle rapporté dans les études menées chez l'espèce ovine (4,4 à 20,6 CJ). Toutefois, si l'on compare cette moyenne au rendement par donneuse soit 4,4 ± 1,5 CJ et 6,2 ± 1,1 CJ obtenu par Naqvi et Gulyani, (1999) et Simonetti et al, (2008) respectivement, on constate alors que les brebis de race Hamra ont répondue favorablement à la dose de 16 mg de pFSH .

Par contre nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Torres et al, en 1984 (19,5 ± 2,6 CJ) et Cognié et al, en 2003 (20.6 ± 10.2 CJ).

On estime que notre résultat est satisfaisant vu les conditions d'élevages défectueuses (tel que l'alimentation déséquilibrée), qui peuvent influencer la réponse ovarienne.

On tien à préciser que la réponse de la brebis D1 au traitement de superovulation est meilleur que celle de la brebis D2 (14 vs 09 CJ), ceci est peut être expliqué par la différence du statut ovarien au début de la stimulation hormonale, puisque d'une part, les deux brebis sont de la même race, du même âge et vivent dans les mêmes conditions.

Selon (Cognié et al, 1999), le principal facteur limitant la réponse d'un animal à un traitement de superovulation est l'état de la population folliculaire (petits follicules de 1-2 mm) présente sur l'ovaire au moment où commence la stimulation exogène.

B-2) chez les receveuses :

L'évaluation la réponse ovarienne au traitement de synchronisation avec une dose de 500 UI de PMSG, juste avant le transfert, à l'aide d'un examen laparoscopique nous a permet de révéler que 100% des brebis ont répondu positivement avec une moyenne de 1,5 ± 0,5 CJ par receveuses.
Nos résultats sont :

- Comparables à ceux obtenus par Laster et Glimp (1974) qui, après deux injections de 750UI de PMSG, rapportent un taux d'ovulation moyen de 1,4 et 1,6 chez la race Targhee et Suffolk respectivement.

- Inférieurs à ceux obtenus par Lunstra et Cjhrietenson (1981) ; Laster et Glimp (1974) qui rapportent des taux d'ovulation de 2,9 et 2,8 respectivement, chez la race Corriedale.

- Supérieurs à ceux rapportés par Evans et Robenson (1980), qui donnent un taux de 1,2 CJ avec une dose de 200UI de PMSG.

Selon Evans et Robinson (1980) la PMSG augmente le taux d'ovulation. De plus, il a été démontré une interaction significative entre la dose de PMSG et la race pour le taux d'ovulation (Laster et Glimp, 1974).

II) RECOLTE ET TRANSFERT DES EMBRYONS

A) Taux de récolte :

Un taux de récupération moyen de 91,30% est obtenu par une combinaison des deux techniques, laparoscopique et chirurgicale telle que décrite par Clément, 2005.

Notre résultat s'avère supérieur, comparativement à la littérature où les taux de récolte varient de 49,3% (Simonetti et al, 2008) à 87,5 ± 8,5 (D'Alessandro et al, 2005), ceci est peut être dû au nombre réduit de femelles récoltées et/ou encore à la technique de récolte choisie qui est qualifiée de mixte.

B) Taux de fécondation :

Après un examen de tri et de sélection des embryons nous avons eu 15 embryons fécondés sur 21 structures collectées ce qui donne un taux de fécondation de 71,42%.
Ce taux se situe dans l'intervalle rapporté par D'Alessendro et al, (2005) soit entre 55,8 ± 10,9% et 73,2± 11,5%.

Cependant, le taux de fécondation que nous avons obtenu est bien inférieur aux résultats rapportés par Cognié et al, (2003) et Giovanni et al, (2001) qui sont respectivement 90% et 82%.

Ce faible taux moyen semble être lié à la à la présence d'un follicule anovulatoire sur chaque ovaires au moment de la récolte chez la brebis D2, dont la cause est peut être attribuable à la perturbation du contrôle hormonal (sécrétion d'œstrogènes) pouvant influencer la remontée des spermatozoïdes.

C) Embryons transférables :

Concernant le rendement des embryons transférables, dans notre étude, il est de 6 embryons transférables par donneuse collectée soit un taux de 80%. Les résultats publiés dans les études précédentes (toutes races confondues) donnent un rendement compris entre 1.1 et 12 embryons transférables.

Ce résultat est d'autant plus remarquable en comparaison avec les résultats obtenus par d'autres traitements, comme ceux rapportés par Cognie en 1984 (1.9 embryons transférables par donneuse) utilisant de la PMSG, ou ceux rapportés par Simonetti et al en 2008 (1,4 embryons transférables/donneuse) avec de la oFSH.

En revanche, le taux que nous avons obtenu, concorde avec ceux rapportés par Cognié en 1984 et par Gonzalez et al, en 2003 qui sont respectivement 6,5 et 5,6 ± 0,9 embryons transférables.

Par contre, les taux cités par Cognié et al, en 2003 (12,0 ± 7,8 embryons transférables) et Brebion et al, en 1992 (12,5 embryons transférables), sont nettement supérieurs au notre.

D'un point de vue qualitatif, il est possible de prendre en compte la qualité des embryons récoltés, mais aussi le stade de développement de ces mêmes embryons (Clément, 2005).

Concernant la qualité des embryons, les études de Cordeiro et al, (2003) fournissent des données sur le taux d'embryons de qualité 1 ou 2 de l'ordre de 67,4% des embryons totaux. Dans notre étude, ce taux est de 80% avec 46,7% d'embryons de qualité 1 et 33,3% de qualité 2.

La variation de la qualité des embryons peut s'expliquer principalement par le recrutement en début du protocole de superovulation de follicules datant des vagues précédentes (follicules persistants) (Brebion, 1992)

III) RESULTATS DU TRANSFERT

A) Taux de gestation :

Notre expérimentation est couronnée par un taux de gestation de 75%, qui est identique à celui obtenu par Baril et al, en 2001 et comparable à celui cité par Cognié (1999) (70%).

Cependant, ce taux est inférieur à ceux obtenus par Brebion et al, 1992 qui rapportent un taux de 88% après transfert chirurgical et 80% après transfert laparoscopique.

Par contre notre résultat est nettement supérieur à celui obtenu par Naohisa et al (1997) (38,9%). En effet ce résultat confirme la bonne synchronisation du stade physiologique des receveuses avec l'âge des embryons transférés.

B) Taux de viabilité après transfert :

L'examen échographique à 40 jours après transfert nous a permis d'avoir un taux de viabilité de 50% soit 04 embryons viables sur 08 transférés.
Des taux équivalent (49%) ont été obtenus par Traldi (1995) et Baril et al (2002), mais ça reste insuffisant par rapport aux taux espérés. Ceci peut être attribuable au mauvais jugement des embryons.

Il faut signaler, que le jugement visuel des embryons donne une estimation très imparfaite de leur viabilité réelle (Brebion et al, 1992).

IV- TECHNIQUES UTILISEES

L'utilisation de la technique endoscopique pour l'examen avant collecte ou transfert permet d'économiser beaucoup de temps par rapport à une laparotomie classique. En effet, si une donneuse ne répond pas aux conditions nécessaires à sa collecte, la partie chirurgicale n'est plus nécessaire.

Comparativement à une technique purement chirurgicale, la manipulation de l'appareil génital par l'opérateur est moindre dans la technique dite mixte. En effet, l'examen par endoscopie réduit fortement la création d'adhérences post opératoires pour les donneuses non collectées, de même, pour les donneuses collectées. Ainsi la technique peut être répétée plusieurs fois par cette méthode mixte, alors qu'on rapporte rarement plus de 2 collectes par méthode chirurgicale pure.

En revanche, l'utilisation de l'endoscopie rend la technique moins accessible qu'une méthode purement chirurgicale. Tout d'abord le matériel nécessaire pour l'endoscopie est coûteux. De plus, une bonne expérience de l'opérateur est nécessaire pour la manipulation des instruments (trocarts, optique, pince atraumatique, pistolet d'insémination) sous endoscopie.

CHAPTER IV

CONCLUSION

Conclusion

Les techniques de production et de transfert d'embryons in vivo, offrent de multiples avantages tels que la multiplication accrue des individus remarquables, l'accélération du progrès génétique, la création rapide de population indemne de pathologies.

Le travail que nous avons effectué montre, que la brebis de race Hamra a répondu favorablement à un traitement de superovulation à base d'un rapport adéquat de pFSH/pLH.

Il en ressort que la réponse ovarienne est très bonne avec une dose de 16 mg, le nombre moyen de corps jaunes obtenu par brebis est de 11,5 ± 2,5. Ainsi, la récolte à été réalisée avec sucés ou le taux de récupération a atteint 91,30%, dont 57,14% des structures récoltées étaient des embryons transférables soit 6 embryons transférables par donneuse.

Le transfert de ces embryons produits in vivo, chez des receveuses de race mixte a permis d'avoir un taux de gestation de 75%.

En effet, nos résultats sont tout à fait en correspondance avec ceux rapportés dans la littérature sur différentes races ovines mondiales. Néanmoins, certains facteurs limitent l'utilisation de ces techniques, tels que la variabilité de la réponse au traitement de superovulation et le coût de cette technique qui demeure élevé. Cependant, la demande grandissante du marché de la viande ovine et surtout la nécessité de préserver des races en voie de disparation justifie son utilisation.

D'autres travaux sur un nombre élevé d'animaux sont nécessaire afin de déterminer la dose optimale a utilisée chez la race Hamra et d'améliorer la réponse ovarienne des brebis.

Enfin, on peut conclure que notre expérimentation a arboré des résultas très encourageants pour l'application sur le terrain de la production et du transfert embryonnaire in vivo car elle nous a permis d'éclaircir un domaine récent de biotechnologie de reproduction.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

ADAMS G.P; KOT K; SMITH C.A; GINTHER O.J, 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growh in heifers. Anim. Reprod. Sci., 30, pp. 259-271.

ALILO H.W. & DOWD J.P. 1991. The control of corpus luteum function in domestic ruminants. *Oxford Reviews of Reproductive Biology..*

Al-KAMALI, A.A., BOLAND, M.P., CROSBY, T.F., GORDON, I., 1985. Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotrophin treatment. Vet. Rec. 116, 180–181. 131. SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide, Version 6.03. SAS Institute, Cary, NC, 1028 pp.

ARMSTRONG DT, PFITZNER AP, WARNES GM, SEAMARK RF. 1983 Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *Journal of Reproduction and Fertility,*67, 403-410.

ARMSTRONG D.T., EVANS G. 1983, Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats, Theriogenology 19, 31–42.

LEBÎUF B. _(1), E ANFREDI_(2), P. BOUE_(3), A. PIACéRE_(4), G. BRICE_(5), G. BARIL_(6), C. BROQUA_(5), P. HUMBLOT_(7), M. TERQUI_(6) 1998.
L'insémination artificielle et l'amélioration génétique chez la chèvre laitière en France INRA Prod. Anim., 11 (3), 171-181

BARIL G, CASAMITJANA P, PERRIN J, VALLET JC. 1988 (9-10 **septembre).** Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *In: 4ème réunion AETE,* Lyon, AETE, 67-93.

BARIL G., BREBION P.,CHESNE P., 1993. Manuel de formation pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. FAO, 115, ISSN1014-1099.

BARIL G., Traldi A.-L., Cognié Y., Leboeuf B., Beckers J.-F., Mermillod P., 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. Theriogenology, 56, 299-305.

BARONE, R.1978.anatomie comparée des mammifères domestiques Tome 3.

BARONE. R, 1990. Anatomie comparée des animaux domestique. Splanchnologie. Edition Vigot

BESSELIEVRE A. 1986. Préparation des brebis à la lutte pâtre p335.
BINDON, B. M., ET PIPER, l. R. 1982. physiological basis of the ovarian response to PMSG in sheep and cattle. In embryo transfer in cattle, sheep and goats', (Eds J. N. Shelton, A. O. Trounson, N. W. Moor, and J. W. James.) pp. 1-5. (Aust. Soc. Reprod. Biol).

BONDURANT RH, SKIRROW S, ANDERSON GB, HANSON F, ROGERS WH. 1984. Nonsurgical collection of blastocysts from dairy goats. Theriogenology, , **22,** 423-430.

BOUKHLIQ Rachid. 2002. -cours en ligne sur la reproduction ovine –institut agronomique et vétérinaire Hassan II.

BOUTONNET J, P, 1989. La spéculation ovine en Algérie. Un produit clé de la spéculation. E.N.S.A-INRA, Montpellier, p90.

BOUZEBDA. F. A ; 1985. Le transfert d'embryons dans le contrôle de la reproduction en élevage ovin, étude bibliographique et travaux personnels, thèse maitrise des sciences vétérinaires, ENV Lyon.

BREBION P; BARIL G; COGNIE Y; VALLET J.C, 1992. Transfert d'embryon chez les ovins et les caprins. Ann. De zoot.41, 331-339.

BYSCOV, AG, 1979, Regulation of meiosisen mammals Ann. Biol. Anim. Biophys. 19: 1251-1261.

CAHILLE LP et MAULEON P., 1980. « influence of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep J Reprod Fertil

CAHILL L.P; SAUMANDE J; RAVAULT J.P; THIMONIER J; MARIANE J.C; MAULEON P, 1981. Hormonal and follicular relation ships in ewes of hit hand the low ovulation rates. J. Reprod. Fert, 62, 141-150.

CALDANI M; CARATY A; PELLETIER J; THIERY J.C; TILLET Y, 1991. La libération pulsatile de LH et son contrôle. In: THIBAULT et LEVAISSEUR, 1991. la production chez les mammifères et l'homme. INRA, 71-87.

CAMPUS VIRTUEL SUISSE, CVS, 2005.. Embryogenèse, module préimplantation, Embryology.ch, mise à jour le 30 juin 2005 http://www.Embryology.ch/genericpages/modulembryofr.html

CARATY A., EVANS M., THIERY J.C., MALPAX B., CHEMINEAU P., 1997 contrôle central de la sécrétion des gonadotropines par les neurones à GNRH. In : les gonadotropines .Ed. Combarnous Y., Volland-Nail P. INRA, Paris, 225-239.

CEVA, innover en reproduction, pour construire. Melovine … Suivez le guide, CEVA Santé animale, Libourne, s.d.

CHAFFIN C L, Hess D L, Stouffer R L., 1999. "dynamics of periovulatory steroidogenesis in the rhesus monkey follicle after ovarian stimulation" Hum Roprod.

CHELLIG, 1992. Les races ovines en Algérie, C.N.P.A.

CHEMINEAU P. et al, 1991. Utilisation des implants de mélatonine pour l'amélioration des performances de reproduction chez la brebis. Rec. Méd. Vét.

CHEMINEAU P. MALPAUX B, GUERIN Y, MAURICE F, DAVEAU A, PELLETIER J. 1992. Lumière et mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. *Annales de Zootechnie,* **41,** 247-261.

CHEMINEAU P. MALPAUX B., 1998. Mélatonine et reproduction chez les mammifères d'élevage. C.R.SOC.BIOL.

CHEMINEAU P, BARIL G, LEBOEUF B, MAUREL MC, ROY F, PELLICER-RUBIO M, et al, 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, **54,** 129-142.

CHUPIN D. et al ; 1974. Utilisation des progestagènes en implants sous cutanés pour la maitrise des cycles sexuels chez les ovins. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophy ; 14 27-39.

CLEMENT, 2006. Production et transfert d'embryons *in vivo* chez la chèvre de race boer, Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire d'alfort,

COGNIE Y. et al ; 1970. Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par progestagènes associer ou non à une injection de PMSG, Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophy, p10-15.

COGNIE Y et PELLETIER J, 1976. Preovulatory LH relesse and ovulation dry and lactating ewes after progestagen and PMSG treatment during the seasonal anœstrus. Ann. Biol. Bioch.Bioph, 16, 529-536.

COGNIE Y et MAULEON P, 1982. Control of reproduction in ewes. In: Sheep Production. Ed HARESIGN W. butterworthe, London, pp381-391.

COGNIE Y., 1984. Comparaison de deux traitements de Superovulation chez la brebis.

COGNIE Y., CHUPIN D. et SAUMANDE J. 1986, – Effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. *Theriogenology*, 25 (n° 1), 148.

COGNIE Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology,* 51, 105-116.

COGNIE Y. BARIL G. 2002. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo et in vitro chez la brebis et la chèvre. INRA Productions Animales, 15, 199-207.

COGNIE Y. BARIL G., 2002. Physiologie de la reproduction et des comportements. INRA Prod. Anim., 15 (3), 199-207

COGNIÉ Y., G. BARIL, N. POULIN, P. MERMILLOD, 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. INRA, Physiologie de la Reproduction et des Comportements 37380 Nouzilly, France.

COLIN MICHELE, 2004. Reproduction des animaux domestiques. (Guide pratique ASV).

COLLEAU J-J, HEYMAN Y, RENARD J-P., 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Productions Animales,* 11, 41-56.

COMBANOUS Y, 1991. Les gonadotropines; structure, synthèse, fonction, In: THIBAULT et LEVAISSEUR, 1991. La production chez les mammifères et l'homme. INRA, 53-69.

COOP I.E, 1966. Effect of flushing on reproductive performances of ewes. J. Agri. Camb, 67, 305-323.

CORDEIRO M.F, J.B. LIMA-VERDE, E.S. LOPES-Júnior, D.I.A. TEIXEIRA, L.N. FARIAS, H.O. SALLES, A.A. SIMPL'YCIO, D. RONDINAo, V.J.F. FREITAS, 2003. Embryo recovery rate in Santa In^es ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Avenue Paranjana 1700, Fortaleza CE 60740-000, Brazil.

CORTEEL J.M., 1974. Viabilité. des spermatozoïdes de boucs conservés congelés avec ou sans leur plasma séminale Effet du glucose. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 14, 741-745.

COUROT M. NAIL V. 1991. conduite de la reproduction des mammifères domestiques : présent et futur. INRA. Prod. Anim.

CRAPLET.C, THIBIER. M ; 1984. Le mouton, production génétique, alimentation, maladies. Tome IV éd vigot, Paris, 575p.

D'ALESSANDRO, A.G., MARTEMUCCI, G. TAIBI L., 2005, How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. Istituto Sperimentale per la Zootecnia, Via Napoli, Segezia 71020, Foggia, Italy.

DERIVEAUX J; ECTORS F; BECKENS F, 1976. Données récentes en gynécologie animale. Ann.

DERIVAUX. J, ECTORS. F, 1980. Physiopathologie de la gestation et obstétrique vétérinaire. éd. Le point vétérinaire, Maisons-Alfort, 273P.

DERIVAUX J et ECTORS F, 1989. Reproduction chez les animaux domestiques. 79-103 et 443-476. 3ème (éd).

DOLIGEZ P. et BERSINGER I. 2006. Le transfert d'embryons chez les équidés, fiches techniques reproduction. www.haras-nationaux.fr consulté le 20/03/2008.

DRIANCOURT M.A, 1987. Ovarian fœtus contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. J. reprod. Fert. 80, 207-212.

DRIANCOURT.M, A. GOUGEON. A, ROYERE. D, THIBAULT. C; 1991. La fonction ovarienne; In Thibault, Levasseur. M. C (Eds) la reproduction chez les mammifères et l'homme, I.N.R.A. Ellipses, paris, p573

DRIANCOURT M.A; ROYEPE D; HEDON B; LEVASSEUR M.C, 1991. Cycles œstriens et cycle menstruel in: THIBAULT et LEVASSEUR, 1991. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA: 573-587.

DRIANCOURT MA., 2001. "Turnover of large ovarian follicles: when, how, why?" Theriogenology.

DUDOUET .C. 1997. La reproduction du mouton. Edition France agricole

DUDOUET .C.2000. La reproduction du mouton. Edition France agricole.

DUPOUY J.P; BOISIN J; DESCHAUX P; LEGRAND C; PICON L.O, 1992. Hormones et grande fonctions. Tome1. éd. Marketing, Paris.

EDEY T.N, 1968. Body weight and ovulation rate in sheep. Proc. Aust. Sci. Anim. Prod, 7, 188-191.

EVANS, G., ROBINSON, T.J., 1980. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. J. Agric. Sci. 94, 69–88.

EVANS G., ARMSTRONG D.T., 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. J. Reprod. Fert., 70, 47-53.

EVANS G, MAXWELL WMC. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats, Sydney Butterworths,

FABRE-NYS C. 2000. Le comportement sexuel des caprins : contrôle hormonal et facteurs sociaux. INRA/CNRS, PRMD, 37380 Nouzilly.

FERROUK M. 2006 Cours de zootechnie I, les races ovines. Université de Blida .

FIENI F.BUGGIN M. TAINTURIER D. BRUYAS J. F. ET MERCIER A. 1991 Utilisation de l'insémination artificielle intra utérine chez la chèvre synchronisée et chez la chèvre superovulée. Bull. des GTV.

FINDLAY J.K; CLARKE I.J; LUCK M.R; RODGERS R.J; SHUKOVSKI L; ROBERTSON; D.M; KLEIN R; MURRAY J.F; SCARAMUZZI R.J; BINDON B.M; O'SHEA T; TSONISC G; FORAGE R.G, 1991. Periphery and intragonadal actions of inhibin-related peptides. J. Reprod. Fertil. Suppl., 43, pp. 139- 150.

FLETCHER I.C, 1971. Effects of nutrition, live weight, and season on the incidence of with ovulation in south Australian strong-weel Merino. Aust. J. Agri. Res, 22, 321-330.

FLORENCE B; ELISABETH B; JEAN PIERRE B; MARRIANA G; FRANCOIS H; YVAN H; GUY P. MARIE-CLAIDE R.S; FABRICE S; XAVIER V, 2005. Reproduction des animaux d'élevage, 2ème éd, p:41, 298.

FLORES-FOXWORTH G, MCBRIDE BM, KRAEMER DC, NUTI LC. 1992. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology,* , **37,** 213.

FONTAINE. M, CADORE. J-L, 1995. Vade-mecum du vétérinaire. éd. Vigot, paris, 1672P.

FUKI, Y, KANO, H, KOBAYASHI, M, TETSURA, M, ONO, H, 1985. Response to repeated superovulation treatment in the ewe. Jpn. J. Anim. Reprod. 31, 155–157.

GALLOWAY D.B et al, 1987. a clinical trial using a regimen which includes a norgestomet implant and norgestomet plus oestradiol valerate injection as a treatement for anoestrus in dairy cows. austr. vet. j; 64, p187-189.

GEISERT RD., 1999. Learning Reproduction in Farm Animals, Oklahoma State University, Stillwater, OK, [en-ligne], Mise à jour en 1999 [http://www.ansi.okstate.edu/reprod/]

GINTHER O.J; 1992. In: reproductive biology of the mare. Basie and applied aspects. Equiservices, Wisconsin.

GINTHER O.J; WILTBANK M.C; FRICKE P.M; GIBBONS J.R; KOT K, 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol Reprod, 55, pp.1187-1194

GIOVANNI LEONI*, LUISA BOGLIOLO, PIERPAOLO PINTUS, SERGIO LEDDA, SALVATORE NAITANA, 2001, Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. Department of Animal Biology, University of Sassari, 07100 Sassari, Italy.

GONZALES-BULNES A, BAIRD DT, CAMPBELL BK, COCERO MJ, GARCIA-GARCIA RM, INSKEEP EK. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development, ,* 16, 421-435.

GONZÁLEZ-BULNES ANTONIO, ROSA MARÍA GARCÍA-GARCÍA, VANESA CASTELLANOS, JULIÁN SANTIAGO-MORENO CARMEN ARIZNAVARRETA, VERÓNICA DOMÍNGUEZ, ANTONIO LÓPEZ-SEBASTIÁN, JESÚSA.F. TRESGUERRES, MARÍA JESÚS COCERO. 2003, Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. aDpto. de Reproducción Animal, INIA, avda. Puerta de Hierro s/n, 28040-Madrid, Spain.

GONZALEZ-BULNES, A.; J. SANTIAGO-MORENO, M.J. COCERO AND A. LOPEZ-SEBASTIAN. 2000, effects of fsh commercial preparation and follicljlar status on follicular growth and superovulatory response in spanish merino ewes. Dpto. de Reproduction Animal. SGIT/INIA (MAPA) Avda. Puerta de Hierro Km. 5,9 28040-Madrid (Spain).

GOUGEON A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses endoc. Rev.

GOUHIS F, 1989. Influence d'une injection de PMSG et de la race sur les performances de reproduction de la brebis; Mémoire de fin de cycle de zootechnie, option: Reproduction ovine, Institut national agronomique de Tunisie.

GREEN Wald (G.S). 1972. Of eggs and follicules (editorial) Am. J.Anort. 137.1

GUTHRIE H.D; GRIMES R.W; COOPER B.S; HAMMOND J.M, 1995. Follicular atresia in pigs: Measurement and physiology. J Anim Sci, 73, pp. 2834-2844.

GUTHRIE H.D et GARETT W.M, 2001. Apoptosis during folliculogenesis in pigs. Reprod Suppl, 58, pp.129-176.

HAFEZ ESE. 1962, Reproduction in Farm Animals, Philadelphia: Lea and Febiger, 456p

HANRAHAN J.P et QUIRKE J.F, 1986. Breeding season and multiple birth in small ruminate. Proc. 3rd world congress on genetic applied to Livestock production. Nebraska. Pp 30-45.

HANSEL W et EDWARDS .L, 1983. Physiology of œstrus cycle. J. Anim. Sci, 57, suppl-2, 404-426.

HANSEL C.H, 1988. Propriétés physiologiques de GnRH. Ann. Mèd. Vét, 132, 465-474.

HANZEN Ch. 1999-2000 « propédeutique et pathologies de la reproduction male et femelle » ; 2ème doctorat en médecine vétérinaire.

HASLER JF 2000« in vitro culture of bovine embryosin Ménézo's B2medium or without coculture and serum » Anim. Repro. Sci. 60-61.

HENDERSON D.C, 1991. The reproductive cycle and its manipulation. In: MARTIN W.b, AIKEN I.D. Diseases of sheep. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

HIRSHFIELD A.N, 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biol Reprod, 44, pp. 1157-1162.

HUMBBOT P, 1990. Troisième symposium sur la reproduction des ruminants. Elevage et insémination. 238, 21, 23-24.

HUNTER R.H.F, 1980. Physiology and technology of reproduction in fermle domestique animals. Published by Academic Press. Int.

IETS, ROBERTSON I, NELSON RE, 1998. International Embryo Transfer Society guide. Chapter 9. Certification and identification of the embryo., 3rd edition. Savoy, IL.: IETS, 170p.

INTERVET INTERNATIONAL, 1993. Abrégé de reproduction animale

IRELAND J.J et ROCHE J.F, 1983. Development of non-ovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. Endocrinology, 112, pp.150-156.

JABBOUR, H.N., EVANS, G., 1991. Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. Anim. Reprod. Sci. 26, 93–106.

JEAN-LOUP BISTER, 2002. La reproduction du mouton, Laboratoire de Physiologie animale, FUNDP CRO.Belgique

JOLLY P.D; TISDALL D.J; HEATH G; HEATH D.A; LUN S; HUDSON N.L, 1997 Granulosa cells apoptosis, aromatase activity, cyclic 3'-5' monophosphate response to gonadotropins and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. Biol. Reprod., 56, pp.530-536.

KHALDI G, 1984. Variations saisonnières de l'activité ovarienne, du comportement d'œstrus et de la durée de l'anœstrus post-partum des femelles ovines de race Barbarine: influence du niveau alimentaire

KAHN W, 1994. Examen échographique de la brebis et de la chèvre. In : Atlas de diagnostics échographiques. Editions Maloine, Paris, 1994, 186-210.

et de la présence du mâle. Thèse de Doctorat d'Etat des sciences. Académie de montpellier.

KHIATI B, 1999. Etudes des possibilités d'amélioration des performances reproductives chez la brebis de la race RUMBI, Thèse de magister; Centre universitaire de Tiaret.

LAND L.B, 1970. Number of oocytes present at birth in the ovary of pure and Finnish Landrace cross Blackface and Welsh sheep. J. Reprod. Fertil., 21, pp. 547-521.

LASTER D.B et GLIMP H.A, 1974. Influence of breed on respose to exogenous hormones in œstrous and anœstrous ewes. J. Anim. Sci, 39, 1129-1135.

LAVOIR M.C et FORTUNE J.E, 1990. Follicular dynamics in heifers after injection of PGF2α during the first wave of follicular development. Theriogenology, 33: 270 (Abstr.).

LEBOEUF B, RESTALL B, SALAMON S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science,* **62,** 113-41.

LEGAN S.J; WINANS S.S, 1981. The photo-neuroendocrine control of seasonal breeding in the ewe. General and comparative endocrinology, 45, 317-328.

LENNOZ M, 1987. Les hormones de la reproduction. Le point vétérinaires, 7, 33, 11-17.

LINDNER GM, WRIGHT RWJ., 1983 Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology, ,* 20, 407-416.

LINDSAYD R; KNIGHT T W; SMITH J.F; OLDHAM C.M, 1975. Studies in ovine fertility in agricultural regions of Western Australia. Ovulation and lambing performance. Aust. J. Agri. Res, 26, 189-198.

LUNSTRA D.R et CHRISTENSON R.K, 1981. Fertilisation and embryonic survival in ewes synchronised with exogenous hormones during the anœstrus and œstrus seasons. Anim. Sci, 53, 458-466.

MACKENZIE Anne A. 2005 Applications du génie génétique aux animaux d'élevage et aux produits issus des biotechnologies. Canadian Food Inspection Agency (Agence canadienne d'inspection alimentaire) 59 Camelot Drive, Ottawa, Ontario K1A 0Y9, Canada.

MARTAL J, 1985. Régulation endocrine du corps jaune in"l'utérus de la vache". Société française de taniative (Maison Alfort), 84-85.

MAP, 1998, Ministère de l'agriculture et de la pêche (direction des statistiques agricoles et des système d'information).

MAP, 2004, Ministère de l'agriculture et de la pêche (direction des statistiques agricoles et des système d'information).

MAUER R.E; REVENAL P; JOHNSON E.S; MOYER R.H; HIR1ATA A; WHITE w. F, 1972. Levels of luteinizing hormone in sera of ewes near the time of œstrus as determined by radioimmunossay. J. Anim. Sci, 34, 88-92.

MCKELVEY, W.A.C., ROBINSON, J.J., AITKEN, R.P., ROBERTSON, I.S., 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. Theriogenology 25, 855–865.

MERMILLOD P, BARIL G, BEECKERS JF,COGNIÉ Y.,2000. Successfull direct embryo transfer of vitrified sheep embryos. 14^{e} ICAR, Stockholm, 2-6 juillet 2000.

MONNIAUX D., CHUPIN D., SAMMANDE J. 1983. Superovulatory reponse of cattle. Theriogeniology. 19: 54-64.

MONNIAUX D, MONGET, 1997. Gonadotropine et révélation paracrué ovarièn dons combarnus y. Voland-Nailp. Les gonadohopme. **INRA, 276-284.**

MONNIAUX D; MANDON-PEPIN B; MONGET P; 1999. L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. Med Sci, 15, pp.157-166.

MOORE B. PENNINGTON J, MCCARTER M, WALL C, 2006. Marketing of meat goats, University of Arkansas, Division of Agriculture, Cooperative Extension Service (en-ligne), [http://www.uaex.educ]

MOORE (N.W.) 1974 – Multiple ovulation and ovum transfer in the goats. Proc. Aust. Anim. Prod., , 10, 246.

MORLEV F.W.H; WHITE D.H; KENNY P.A; DAVIS I.F, 1978. Predicting ovulation from live weight in ewes. Anim. Breed. Abst, 46, 437.

MOSSA F., DUFFY P. , NAITANA S., LONERGAN P. , A.C.O. Evans ,2006. Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. College of Life Sciences, University College Dublin, Bel.eld, Dublin 4, Ireland.

NAQVI S.M.K., GULYANI R., 1999, Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. Division of

Physiology, Central Sheep & Wool Research Institute, Avikanagar, Jaipur, Rajasthan 304 501, India.

NIBART M., 1991. « Le transfert embryonnaire et les biotechnologie appliquées : bissection et sexage », Rec. Med. Vet., 167, pp.261-290.

NISURCUDER G.D et NETT A, 1988. The corpus luteum and its control. Knobil E, Neill J (éd). The physiology of reproduction, Raven press, New York: 486-526.

OKADA A; KAWADA S.J; MIYAMOTO A; FUK Y, 2000. Incidence of abnormal corpus in superovulated ewes . J. Reprod.Fertil.Dev.46, 6.

OUATTARA Issif., 2001. Gestion de la reproduction dans un élevage ovin.Institut agronomique & veterinaire Hassan II.

PEREIRA RJ, SOHNREY B, HOLTZ W., 1998. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2alpha and oxytocin. Journal of Animal Science, 76, 360-363.

PROTEAU T., 1989, La transplantation embryonnaire dans l'espèce caprine, intérêts et aspects pratiques. Thèse Méd. Vét, Toulouse, 77p.

RYAN J.P., HUNTON J.R., MAXWELL W.M.C., 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of PMSG and FSH-P. Reprod. Fert. Dev., 3, 551-560.

RIBADY A.Y. DOBSON H. WARD P, 1994. Ultrasound and progesterone monitoring of ovarian follicular cysts cow treated with GnRH. B. Vet. J. 50,489.

ROCHE J.F, 1996. Control and regulation of folliculogenesis a symposium in perspective. Reviews of Reproduction, 1, pp. 19-27.

ROQUES (J.M.) 1991. L'insémination intra utérine chez la brebis. Bulletin des GTV, , 5, 75,81. 105-116.

ROTTEN D, 1991. Régulation de la synthèse et de la sécrétion de FSH.

ROUX M, 1986. Alimentation et conduite du troupeau ovin. Technique agricole, 3-18

RUBIANES E, MENCHACA A. 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science, ,* 78, 271-287.

RUCK BUSCH Y, 1981. Physiologie, pharmacologie thérapeutique 2ème éd. Vigot, 275p.

SAKKAS D, BATT PA, CAMERON AW., 1989. Development of preimplantation goat (Capra
hircus) embryos *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility,* 87, 359-65.

SALAS-CORTES L. 2006. Le sexage des embryons bovins: sexage des spermatozoïdes et de l'embryon. *In: T1Pro Pathologie de la reproduction,* ENVA, Maisons Alfort, , 15p.

SAUMANDE J., PROCUREUR R., CHUPIN D. 1984 . Effect of injection time of anti-PMSG anti serum on ovulation rate and quality of embryos in super ovulated cows. Theriogenology: 21; 727-731.

SAUMANDE J. 1991, la folliculogénèse chez les ruminants. Rec. Med. Vét. 167 :205-218.
SAUMANDE J. 1995. La production d'embryon chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? INRA, pro. Anim. 8 : 275-283.

SAVIO J.D; THATCHER W.W; BADINGA L; DE LA DOTA R.L; WOLFENSON D, 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the œstrous cycle in cow. J. Reprod. Fertil, 97, pp.197-203.

SCHAETZ F, 1977. Encyclopédie vétérinaire; les hormones sexuelles. Ed. Vigot, Berlin. Med Vét, 143, 5, 427-433.

SENGER PL. 1997. *Pathways to pregnancy and parturition,* 1st revised edition. Ephrata, PA: Current Conceptions Inc., , 281p.

SHELTON, J.N., MOORE, N.W., 1967. The response of the ewe to pregnant mare serum and to horse anterior pituitary extract. J. Reprod. Fertil. 14, 175–177.

SIMONETTI L., FORCADA F., RIVERA O.E., CAROU N., ALBERIO R.H., ABECIA J.A., PALACIN I. 2008. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. Animal Production and Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain.

SIROIS J et FORTUNE J.E, 1990. Lengthening the bovine œstrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance, Endocrinology. 127, pp.916-925.

SOLTNER.D ; 1993. Zootechnie générale 3eme édition.

SOUILEM O; COGNIE M; DEOUCHEC, 1992.L'inhibine: Revue Générale. Rev.

STAIGNILLER R.B ET ENGLEND B.G, 1982. Folliculogenesis in the bovine. Theriogenology, **17**(l), pp. 43-52.

STOCK A.E et FORTUNE J.E, 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. Endocrinology. 132, pp. 1108-1114.

SUYADI, SOHNREY B, HOLTZ W. 2000. Transcervical embryo collection in Boer goats. Small Ruminant Research, , **36,** 195-200.

SUZANNE WINTENBERGER TORRES et CLAUDE SEVELLEC., 1987. Atlas du développement embryonnaire precoce chez les ovins. INRA, Paris,

TAYLOR C et RAJAMAHENDRAN R, 1994. Effect of mid-luteal phase progesterone levels on the first wave dominant follicles in cattles. Can J Anim Sci, 74, pp. 281-285.

THIBAULT. C, LEVASSEUR. M-C, 1991. Reproduction chez les mammifères et l'homme. Ed. marketing, 769P.

THIBAULT C et LEVASSEUR M, 2001. "La reproduction chez les mammifères et l'homme" INRA, Paris.

THIMONIER J, MAULEON P. 1969. Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovariennes et hypophysaires chez les ovins. Ann. Boil. Anim. Bioch. Biophy.

TILLY J.L, 1996. Apoptosis and ovarian function . Rev Reprod, 1, pp.162-172

TIXIER V, 1981 ; Physiologie Rev, 61, 974-1011.

TRALDI A.S., 1995. Superovulaçao com a gonadotrofina da menopausa humana (hMG) e prevenção da regressão prematuras dos corpos lúteos em caprinos. Tese apresentada par obtençao do título de Doutor. Universidade de São Paulo – Brasil, 155 p.

TSUNODA Y, SUGIE Y. 1989. Superovulation in nonseasonal Japanese native goats, with special reference to the developmental progression of embryos. *Theriogenology,* 31, 991-996

VAISSAIR. J-P, 1977. sexualité et reproduction chez les mammifères. Ed. Maloine S.A, 453P.

VALLET J.C., CASAMITJANA , BREBION P. ET PERRIN J. , 1991. Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits. *Recueil de Médecine Vétérinaire,* 167, 293-301.

VARODIN, M., 1977. ((Responsabilidad legal del veterinario en la prhctica de la I.A.)). Rev. Ganadería, año XXV, n° 405.

WARE (C.B) et coll. 1985. –Research report. University College, Dublin,.

WIMSATT W A. 1975. "Some comparative aspects of implantation". Biol. Repro., 12, 1-40.

WOODRUF T. et al; 1990. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian follicugenisis. Endocrinology; 1272, 693-698.

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilisation. In : Knobil E, Neill JD. (Eds). 1994. The physiology of reproduction. Second edition. Raven Press Ltd. New York, , 189-317.

YOUNGQUIST RS. 1997. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology,* 1st edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 898p.

ZAIEM I. et al, 2000. Amélioration des performances des reproductions par l'utilisation de la mélatonine chez la brebis à contre saison en tunisie. Revue med, vet 151,517-522.

ZELENICK A.J, 1993. Dynamics of primate follicular growth. A physiologic perspevtive. In: Adashi Ey, Leung PCK (Eds), the Ovary. New York: Raven Press. pp 41-55.