



LE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université SAAD DAHLEB Blida

Faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques  
Département des sciences vétérinaires

*Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de  
Docteur Vétérinaire*

**THÈME**

***Effet de la répétition du prétraitement par un  
agoniste de GnRH sur le rendement de la  
production d'embryons chez la brebis de race  
OULED DJELLAL***

Réalisé par :

M<sup>r</sup> : DJAHDOU LOUNIS

M<sup>r</sup> : HADJERAS SOFIANE

Jury composé de:

Président:

M<sup>r</sup> : YAHIMIA

Maître assistant A (USDB)

Examineur:

M<sup>r</sup> : ADEL.D

Maître assistant A (USDB)

Promoteur: M<sup>r</sup> : GHARBLI

Maître assistant A (USDB)

# Remerciements

-Nous remercions ALLAH de nous avoir attribué la faveur de réussir nos études.

-A Mr GHARBI I. : qui nous a proposé ce sujet et qui nous a aidé tout au long de la réalisation de ce travail par ses conseils précieux, son soutien et sa disponibilité, qu'il trouve ici la marque de notre reconnaissance et de notre profond respect.

-A Mr FERROUK M. et Mme GHARBI A. : pour leur aide à la réalisation de notre partie expérimentale.

-Nos remerciements les plus attentionnés s'adressent :

Aux enseignants D<sup>r</sup> YAHIMI.A et D<sup>r</sup> ADEL.DJ, qui nous ont fait l'honneur et l'amabilité de participer à notre jury de thèse. Sincères remerciements

A tout le personnel du département vétérinaire de l'U.S.D.Blida.

-A tous les enseignants qui ont contribué à notre formation et nous ont transmis leur science et savoir. Sincères gratitude et profond respect.

Aux Docteurs ABOU LAICH M, IRZOUNI S, AIT LHADJ C. qui ont contribué à notre formation par leurs conseils et leur disponibilité avec générosité et accueil amical au sein de leurs cabinets.

Chaleureux remerciements à tous ceux qui ont participé avec sympathie et générosité de près ou de loin à la naissance de ce modeste travail. Grand MERCI.

**S & L**

# Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volanté fait toujours les grands Hommes...A toi mon père.

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, pour sa gentillesse, son affection, sa douceur, sa tendresse et ses encouragements éternels ... A toi ma mère.

A mes frères et sœurs qui ont été toujours présents pour m'encourager, merci pour votre soutien chaque jour, vos précieux conseils et pour avoir tout rendu possible.

A toute ma famille, mes cousins, mes tantes et mes oncles.

A mon Binôme Sofiane et toute sa famille.

A tous mes amis sans exception ; Belkacem, Dahmane, Rabah, Ali, mohand, Nazim, Samir, Ahvive, Mekhlouf et surtout Djamel, Foofi, Djafer, Nawel, Nounouche, Mika, Faroudja avec qui j'ai partagé les bons moments...

Au Dr Hamani A A, pour son aide et ses conseils que je n'oublierai jamais...

Au Dr Benhamouche qui m'a rendu un grand service. Vous me devez beaucoup...

Enfin, à toutes les personnes qui me connaissent, je leur dédie ce travail en signe de reconnaissance et du respect sans oublier le groupe 04 ainsi que toute la promo vétérinaire 2010/2011.

**LOUNIS**

## DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail :*

*A Mes très chers parents (Lounes & Dhahbia) pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont toujours apporté durant toutes ces années. Sans lesquels je n'arriverais jamais là. Que dieu vous garde pour toujours !  
Vous méritez tout, tout simplement !*

*A mes frères, kamel, Youcef, Miloud et mes sœurs Karima, Jedjiga, Nadia, Sabrina pour leur soutien et encouragements ininterrompus durant toutes ces années, avec mon éternelle reconnaissance et toute mon affection. Sans oublier mes belles sœurs Bahia et Lilia, et nos gendres Mohamed et Ahcen, ainsi que mes neveux et nièces surtout le bébé Anis à qui je souhaite un avenir merveilleux.*

*A toute la famille HADJERAS et ARROUS surtout Khali Said et DaChabane, grands et petits.*

*A mes deux anges gardiens : Djafer & Nawel nagh comme d'habitude, avec qui j'ai partagé mes larmes et mes joies... Mes frères sans vous ma vie ne serait jamais la même.*

*A tous mes amis(es) et plus spécialement: Miloud, Nacim, Hamimi, Yazid, Fahim, Tarik, Salim, Khaled, Karim, Nazim, Foofi, Djamel, Salah, Fateh, Samir, Mohand Arab, Abdou, Amediaz, Makhluf... et Saïda, Lilya, Lidya, Jean taché, Nunuch, Maya, Micha, Flawa*

*A toute la promotion de 5ème année vétérinaire 2011.*

*A mon binôme LOUNIS et toute sa famille et ses amis.*

SOFIANE

## **TABLES DES MATIERES**

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES PHOTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>V</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>

## ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

### **CHAPITRE I : LES TECHNIQUES ET FACTEURS DE VARIATIONS DE LA PRODUCTIO D'EMBRYONS IN VIVO**

<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>II-LES TECHNIQUES DE PRODUCTION IN VIVO D'EMBRYONS .....</b>	<b>2</b>
<b>II-1. Synchronisation des chaleurs .....</b>	<b>2</b>
<b>II-1.1. Les Progestagènes .....</b>	<b>2</b>
<b>II-1.2. Les prostaglandines .....</b>	<b>3</b>
<b>II-2. Induction de la superovulation .....</b>	<b>3</b>
<b>II-2.1. Nature des traitements .....</b>	<b>3</b>
<b>II-2.1.1. PMSG.....</b>	<b>4</b>
<b>II-2.1.2. FSH.....</b>	<b>4</b>
<b>II-3. La fécondation .....</b>	<b>4</b>
<b>II-3.1. Saillie naturelle.....</b>	<b>5</b>
<b>II-3.2. Insémination artificielle.....</b>	<b>5</b>

II-4. La collecte d'embryons.....	6
II-5. Examen et classement des embryons .....	7
II-6. Conservation des embryons .....	8
<b>III- FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS IN VIVO.</b>	<b>9</b>
III-1. Les facteurs intrinsèques .....	9
III-1.1. L'individu .....	9
III-1.2. La race.....	9
III-1.3. L'âge .....	10
III-1.4. Etat des ovaires.....	10
III-2. Les facteurs extrinsèques.....	10
III-2.1. La saison.....	10
III-2.2. Facteurs nutritionnels.....	11
III-2.3. Le choix de l'hormone du traitement.....	11
III-2.4. Doses utilisées .....	11
III-2.5. Répartition des doses et rapport FSH/LH .....	12
III-2.6. La technique d'insémination utilisée.....	12

**CHAPITRE II : FACTEURS D'AMELIORATION DE LA PRODUCTION  
D'EMBRYONS IN VIVO**

II-Introduction.....	13
II-1.Les techniques inhibant les effets délétères du follicule dominant .....	13
A .Début du traitement de superovulation en l'absence d'un follicule dominant.....	13

<b>B .Elimination du follicule dominant .....</b>	<b>13</b>
<b>B.1.Méthodes physiques.....</b>	<b>13</b>
<b>B.2.Méthodes hormonales .....</b>	<b>14</b>
<b>1. Progestagènes et oestradiol 17-β (E17-β) .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Utilisation de la GnRH .....</b>	<b>14</b>
<b>2. 1.Définition de la GnRH .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Rôles physiologiques de la GnRH.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Effet de l'administration chronique des agonistes de la GnRH (Désensibilisation de l'hypophyse) .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Effet de l'administration des antagonistes de la GnRH (Inhibition de la sécrétion de la GnRH).....</b>	<b>16</b>
<b>2.5. Utilisation de la GnRH en médecine humaine.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Utilisation de la GnRH en médecine vétérinaire.....</b>	<b>17</b>
<b>a. Chez la jument.....</b>	<b>17</b>
<b>b. chez les ruminants.....</b>	<b>17</b>
<b>b. 1. Chez la vache.....</b>	<b>17</b>
<b>b. 2. Chez la chèvre .....</b>	<b>18</b>
<b>b. 3.Chez la brebis .....</b>	<b>18</b>
<b>1. Protocoles utilisant les agonistes de la GnRH .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Protocoles utilisant les anti GnRH .....</b>	<b>19</b>

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE I : EFFET DE LA REPETITION D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONIST DE LA GnRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE.</b>	
<b>I-LIEU ET PERIODE DE L'EXPERIMENTATION.....</b>	<b>22</b>
<b>II-MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>22</b>
<b>II-1. Matériel.....</b>	<b>22</b>
<b>II-1.1. Animaux .....</b>	<b>22</b>
<b>II-1.1.1. Brebis .....</b>	<b>22</b>
<b>II-1.1.2. Béliers.....</b>	<b>23</b>
<b>II-1.2. Matériel, appareillages et produits .....</b>	<b>24</b>
<b>II-1.2.1. Appareillages.....</b>	<b>24</b>
<b>II-1.2.1.1. Echographe.....</b>	<b>24</b>
<b>II-1.2.1.2. Endoscope.....</b>	<b>24</b>
<b>II-1.2.1.3. Instruments .....</b>	<b>24</b>
<b>II-1.2.1.4. Matériels de récolte du sperme et d'insémination .....</b>	<b>24</b>
<b>II-1.2.2. Produits.....</b>	<b>25</b>
<b>II-1.2.2.1. Hormones .....</b>	<b>25</b>
<b>II-1.2.2. 2. Antibiotiques et autres produits .....</b>	<b>25</b>
<b>II-2. Méthodes.....</b>	<b>26</b>
<b>II-2.1. Echographie.....</b>	<b>26</b>
<b>II-2.2. Traitements de synchronisation et de super ovulation.....</b>	<b>26</b>
<b>II-2.2.1. Traitement de synchronisation des chaleurs.....</b>	<b>26</b>

II-2.2.2. Traitements de super ovulation .....	26
II-2.3. Détection d'œstrus .....	28
II-2.4. Récolte et conditionnement du sperme .....	28
II-2.5. Fécondation .....	29
II-2.6. Endoscopie.....	29
III-ANALYSES DES DONNEES .....	29
IV-RESULTATS .....	30
IV-1.Comportement d'œstrus après induction de la superovulation.....	30
IV-1.1. Comportement d'œstrus chez les brebis du lot 1 .....	30
IV-1.2. Comportement d'œstrus chez les brebis du lot 2.....	30
IV-1.3. Effet de la répétition du prétraitement sur le comportement d'œstrus.....	31
IV-2.Réponse ovarienne après induction de la superovulation.....	32
IV-2.1. Réponse ovulatoire chez les brebis du lot 1 .....	32
IV-2.2. Réponse ovulatoire chez les brebis du lot 2.....	32
IV-2.3.Effet de la répétition du prétraitement sur la réponse ovarienne .....	33
<b>CHAPITRE II : EFFET DE LA REPETITION DU PRETRAITEMENT AVEC DE LA GnRH SUR LE RENDEMENT DE LA SUPEROVULATION</b>	
I-MATERIELS ET METHODES .....	34
I-1. Matériel.....	34
I-1.1. Animaux .....	34
I-1.2. Instruments et produits .....	34

<b>I-2. Méthodes .....</b>	<b>35</b>
<b>I-2.1. Préparation des animaux.....</b>	<b>35</b>
<b>I-2.2. Récolte des embryons.....</b>	<b>35</b>
<b>I-2.2.1. Préparation de la brebis .....</b>	<b>35</b>
<b>I-2.2.2 Technique de récolte .....</b>	<b>35</b>
<b>I-2.3. Tri et sélection des embryons .....</b>	<b>36</b>
<b>I-2.3.1. Recherche des embryons .....</b>	<b>36</b>
<b>I-2.3.2. Examen et conditionnement des embryons .....</b>	<b>36</b>
<b>I-2.4. Soins post-opératoires .....</b>	<b>38</b>
<b>II-ANALYSES STATISTIQUES.....</b>	<b>38</b>
<b>III-RESULTATS.....</b>	<b>38</b>
<b>III-1. Dénombrement des corps jaunes .....</b>	<b>38</b>
<b>III-2. Résultat de la récolte.....</b>	<b>39</b>
<b>III-2.1. Structures récoltées.....</b>	<b>39</b>
<b>III-2.2. Taux de récolte .....</b>	<b>40</b>
<b>IV- CLASSIFICATION DES EMBRYONS.....</b>	<b>40</b>
<b>IV-1. Qualité des structures récoltées.....</b>	<b>40</b>
<b>IV-2. Détermination du taux de fécondité .....</b>	<b>43</b>
<b>IV-3. Détermination du taux des embryons transférables .....</b>	<b>43</b>
<b>IV-4.Effet de la répétition du prétraitement sur le nombre de structures récoltés, taux de récolte, de fécondité et des embryons transférables .....</b>	<b>43</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>50</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### Partie bibliographique :

<b>Tableau I</b> : Résultats comparatifs entre la saillie naturelle+insémination artificielle et la saillie naturelle seule. ( Bari et al .,1999).....	06
<b>Tableau II</b> : Classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCEIA, 1990).....	08
<b>Tableau III</b> : Production d'embryons chez la brebis en fonction du prétraitement utilisé (Baril et al., 2004; Lopez-Alonso et al., 2005 ; Bensaïd et al., 2004).....	20

### Partie expérimentale

<b>Tableau I</b> : Poids, âge et note d'état corporel (NEC) des brebis donneuses.....	22
<b>Tableau II</b> : Race, âge, poids et note d'état corporel (NEC) des béliers.....	23
<b>Tableau III</b> : Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les brebis du lot 1.....	30
<b>Tableau IV</b> : Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les brebis du lot 2.....	30
<b>Tableau V</b> : Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les brebis du lot témoin, lors du premier prétraitement et deuxième prétraitement (Moyenne ± écart type)....	31
<b>Tableau VI</b> : Réponse ovulatoire après induction de la superovulation chez les brebis du lot 1.....	32
<b>Tableau VII</b> : Réponse ovulatoire après induction de la superovulation chez les brebis du lot 2.....	32
<b>Tableau VIII</b> : réponse ovulatoire chez les brebis du lot témoin, lors du premier prétraitement et deuxième prétraitement.....	33
<b>Tableau IX</b> : Structures récoltées chez les brebis du lot 1 et 2.....	39
<b>Tableau X</b> : Taux de récolte des embryons chez les brebis du lot 1 et 2.....	40

<b>Tableau XI</b> : Qualité des structures récoltées. Embryon dégénéré (D), Œuf non fécondé (NF),.....	41
<b>Tableau XII</b> : Taux de fécondité.....	43
<b>Tableau XIII</b> : Taux des embryons transférables.....	43
<b>Tableau XIV</b> : réponse ovulatoire chez les brebis du lot témoin, premier prétraitement et deuxième prétraitement.....	44

## **LISTE DES FIGURES**

### **Partie expérimentale**

- Figure 1** : Protocole de synchronisation et de superovulation du lot 1.....27
- Figure 2** : Protocole de prétraitement, synchronisation et de superovulation du lot 2.....28
- Figure 3** : Schéma de montage des embryons en paillette pour une congélation.....37

# LISTE DES PHOTOS

## Partie expérimentale

<b>Photo 1</b> : Recherche des embryons sous une loupe binoculaire.....	36
<b>Photo 2</b> : Congélation des embryons: opération de la cristallisation.....	38
<b>Photo 3</b> : Dénombrement des corps jaunes après extériorisation des ovaires.....	39
<b>Photo 4</b> : Ovocyte non fécondé de classe 4.....	42
<b>Photo 5</b> : Embryons dégénérés de classe 4.....	42
<b>Photo 6</b> : Blastocyste en expansion.....	42
<b>Photo 7</b> : Blastocystes de classe 1.....	42

## TABLE DES ABREVIATIONS

ARNm: acide ribonucléique messenger.

C° : Degré Celsius.

CJ : Corps Jaune.

eCG : équine Chorionic Gonadotropin.

FGA : Acétate de Fluorogestone..

FSH : Follicule Stimulating Hormone.

FSHo: Follicule Stimulating Hormone ovine.

FSHp : Follicule Stimulating Hormone porcine.

FVI : fécondation in vitro.

GnRH : Gonadotrophine Releasing Hormone.

hCG: human Chorionic Gonadotropine.

IA : Insémination Artificielle.

IETS : International Embryo Transfer Society.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

LH : Luteinizing Hormone.

LHp : Luteinizing Hormone porcine.

MAP : Medroxyprogesterone.

MHZ: Mégahertz.

ND : Nom Déposé.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2.

PMSG : Prénant Mare Sérum Gonadotrophine.

SN : Saillie naturelle.

UA : Unité Armour.

UI : Unité Internationale.

UNCEIA : Union National des Coopératives d'Elvage et Insémination Artificielle.

# RESUME

Chez les ovins, l'extrême variabilité de la réponse ovulatoire limite le développement des programmes du transfert embryonnaire. L'amélioration du rendement de la production d'embryons peut être obtenue par l'usage d'un agoniste ou antagoniste de la GnRH. L'objectif de notre étude a été d'évaluer l'effet de la répétition d'un prétraitement par un agoniste de GnRH sur la production d'embryons *in vivo* chez les brebis de race Ouled Djellal.

Dix (10) brebis de race Ouled Djellal ont été synchronisées par la pose des éponges vaginales imprégnées de 40mg de FGA, pendant 14 jours. Les brebis ont été réparties en deux lots : le lot 1(témoin) (n=3) n'ont pas reçu de GnRH, tandis que le lot 2 (n=7) ont reçu de la GnRH, pendant 14 jours, comme deuxième prétraitement. La superovulation a été induite durant les derniers jours du traitement progestagène, chez les lots 1 et 2, avec une dose de 20UA et 32UA de FSHp, respectivement. La fécondation a été obtenue par l'utilisation de la saillie et l'insémination intra utérine, et la récolte des embryons a été effectuée à j7 par la voie chirurgicale.

Nos résultats montrent la durée d'œstrus lors du 2<sup>ème</sup> prétraitement a été plus courte par rapport à celle observée lors du 1<sup>ème</sup> prétraitement ( $40 \pm 5,65$  vs  $46,4 \pm 8,29$ h). Le nombre moyen de corps jaunes tend à être plus élevée lors du premier prétraitement par rapport à celui du deuxième ( $17.60 \pm 6.01$  vs  $11.4 \pm 7,16$ ,  $p = 0.1$ ). De plus, comparativement au lot témoin la réponse ovulatoire a été plus élevée lors du 2<sup>ème</sup> prétraitement ( $08.33 \pm 5.03$  vs  $11.4 \pm 7,16$ ). Le nombre moyen des structures récoltées et celui des embryons transférables tend être significativement plus faible lors du 2<sup>ème</sup> prétraitement par rapport au 1<sup>er</sup> prétraitement: (structures récoltées :  $09.83 \pm 3.97$  vs.  $06,2 \pm 4.96$ ,  $p = 0.09$ ), (embryons transférables :  $09.33 \pm 3.93$  vs.  $05.8 \pm 4.43$ ,  $p = 0.06$ ).

Chez les brebis Ouled-Djellal, l'administration d'un agoniste de GnRH comme premier prétraitement a permis d'améliorer la production d'embryons. Cependant, une baisse du rendement de la production d'embryons a été observée lors de la répétition du prétraitement de GnRH.

**Mots clés:** Brebis, Ouled Djellal, Agoniste de GnRH, superovulation, embryons.

## Abstract

In sheep, the extreme variability in ovulatory response limits the development of embryo transfer programs. Improved performance of the production of embryos can be obtained by the use of an agonist or GnRH antagonist. The aim of our study was to evaluate the effect of the repetition of a pretreatment with a GnRH agonist on embryo production in vivo in ewes Ouled Djellal.

Ten (10) ewes were synchronized Ouled Djellal by the installation of vaginal sponges impregnated with 40 mg of FGA for 14 days. The sheep were divided into two lots: lot 1 (control) (n = 3) did not receive GnRH tandsi the batch 2 (n = 7) received GnRH for 14 days as second pretreatment. Superovulation was induced during the last days of progestagen treatment, in lots 1 and 2, with a dose of 20uA and 32UA FSHp, respectively. Fertilization was obtained by the use of mating and intrauterine insemination, and collection of embryos was performed at day 7 by the surgery.

Our results show the duration of estrus during 2ier pretreatment was shorter compared to that observed in the 1ieme pretreatment ( $40 \pm 5.65$  vs.  $46.4 \pm 8.29$  h). The average number of corpora lutea tends to be significantly higher in the first pre-treatment compared to that of the second ( $17.60 \pm 01.06$  vs  $04.11 \pm 7.16$ ,  $p = 0.1$ ). In addition, compared to the control group the ovulatory response was higher at the 2nd pre-treatment ( $08.33 \pm 03.05$  vs  $11.04 \pm 7.16$ ). The average number of structures collected and the embryos transferred tend to be significantly lower when compared to pretreatment 2nd 1st pretreatment: (Structures collected:  $09.83 \pm 3.97$  vs.  $06.2 \pm 4.96$ ,  $p = 0.09$ ), (transferable embryos:  $09.33 \pm 3.93$  vs.  $8.5 \pm 4.43$ ,  $p = 0.06$ ).

Ewes Ouled-Djellal, administration of a GnRH agonist as first pretreatment enhances the production of embryos. However, a decrease in the efficiency of embryo production was observed when repeating the pretreatment of GnRH.

Keywords: Sheep Ouled Djellal, GnRH agonists, superovulation, embryo

## ملخص

عند الأغنام، التباين الشديد في الاستجابة لعملية التبييض يحد من تطوير برامج نقل الأجنة، ويمكن الحصول على أداء محسن للانتاج الأجنة باستخدام مماثل و ناقض GnRH . الهدف من دراستنا هو تقييم تأثير المعالجة المتكررة بناقض GnRH على إنتاج الأجنة عند النعاج أولاد جلال.

تم استخدام الإسفنج المهبلي مشبع ب 40 ملغ من FGA على عشرة (10) نعاج أولاد جلال لمدة 14 يوماً. قمنا بتقسيم النعاج إلى قسمين: المجموعة 1 (الشاهدة) (ن = 3) لم تتلق أي علاج ب GnRH. المجموعة 2 (ن = 7) تلقت للمرة الثانية العلاج ب GnRH لمدة 14 يوماً. مفعول فرط الإباضة كان خلال الأيام الأخيرة من العلاج البروجستيروني، في كل من المجموعتين 1 و 2 ، مع جرعة 20 ود و 32 ود من FSHp على التوالي تم الحصول على الإخصاب عن طريق استخدام التزاوج والتلقيح مباشرة داخل الرحم، و جمع الأجنة كان في اليوم 7 بواسطة الجراحة.

نتائجنا تظهر أن الشبق خلال مدة العلاج 2 كان أقصر مقارنة مع المدة 1 ( $40 \pm 5.65$  مقابل  $46.4 \pm 8.29$  ساعة). متوسط عدد الجسيمات الصفراء يميل إلى أن يكون أعلى بكثير في أول مرحلة للعلاج مقارنة بالمرحلة الثانية ( $17.60 \pm 06.01$  مقابل  $11.4 \pm 7.16$  ،  $P = 0.1$ ). بالإضافة إلى ذلك، بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة كانت الاستجابة للتبييض أعلى في المرحلة 2 ( $08.33 \pm 5.03$  مقابل  $11.04 \pm 7.16$ ). متوسط عدد الهياكل التي تم جمعها مع عدد الأجنة التي ستنتقل يميل إلى أن يكون أقل بكثير في المعالجة 2 بالمقارنة مع المعالجة 1 : (الهياكل التي تم جمعها :  $09.83 \pm 3.97$  مقابل  $06.2 \pm 4.96$  ،  $P = 0.09$ ) (الأجنة القابلة للتحويل  $09.33 \pm 3.93$  مقابل  $5.8 \pm 4.43$  ،  $P = 0.06$ ) لدى النعاج أولاد جلال المعالجة الأولية بناقض GnRH يعزز من إنتاج الأجنة. ومع ذلك ، لوحظ وجود انخفاض في كفاءة الإنتاج عند تكرار المعالجة ب GnRH .

الكلمات الرئيسية: النعاج, أولاد جلال ، منبهات GnRH ، فرط الإباضة ، الجنين.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# INTRODUCTION

En Algérie, l'effectif total du cheptel ovin est estimé à 18,7 millions de têtes, et la part des ovins dans l'effectif global des ruminants est de 80 % [1]. Ainsi, de par son importance, il joue un rôle prépondérant dans l'économie et participe activement à la production des viandes rouges (MAP, 2004).

La race Ouled Djellal est la plus importante en terme d'effectif, elle constitue environ 58% du cheptel national. Ce type d'ovin aux membres forts est actuellement en pleine expansion, il est le plus intéressant par ses aptitudes tant physiques que productives (FAO, 2007). Cependant, le mode d'élevage traditionnel, basé sur un savoir faire limité et les croisements anarchiques entre les races favorisent la disparition progressive du pure noyau Ouled Djellal.

Les biotechnologies de la reproduction, en particulier la production *in vivo* d'embryons est le moyen le plus efficace pour préserver les races qui sont en voie de disparition. L'étape principale influençant la réussite de la production d'embryons est la superovulation, c'est une méthode d'induction d'une poly-ovulation qui se pratique par un traitement classique de synchronisation des chaleurs et de stimulation des fonctions ovariennes par une variété de préparation hormonale à activité gonadotrope. La FSH semble la préparation la plus utilisée car elle permet d'obtenir un taux élevé d'ovulation et des embryons de très bonne qualité [2]. La dose totale de FSH administrée varie de 16 à 21UA [3] et [4]. Cette variation de dose dépend du type de préparation commerciale de FSH et de la race [5].

En effet, l'inhibition des sécrétions endogènes de LH et FSH par administration d'un analogue de GnRH [6] ou d'antagoniste de GnRH [6] et [7] permet d'augmenter de 50% la réponse ovulatoire et de doubler le nombre d'embryons transférables par brebis traitée [8] et [9].

L'objectif de la présente étude est d'évaluer la répétition du prétraitement par un agoniste de la GnRH sur la production *in vivo* d'embryons chez la brebis de race Ouled Djellal.

## **CHAPITRE I**

# **LES TECHNIQUES ET FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS IN VIVO.**

## **I- INTRODUCTION:**

La production et la transplantation embryonnaire *in vivo* sont des techniques qui permettent d'accélérer le progrès génétique par une sélection et une multiplication accrue des individus remarquables. Utilisées chez plusieurs espèces animales, ces biotechnologies de la reproduction consistent à faire produire à une femelle donneuse un nombre élevé d'embryons que l'on puisse transférer chez des femelles receveuses dont le cycle sexuel a été synchronisé à ce lui de la donneuse [10].

## **II-Les techniques de production in vivo d'embryons :**

Les techniques de production et de transfert d'embryons *in vivo* comportent les étapes suivantes :

- Synchronisation des chaleurs.
- Induction de la superovulation.
- Fécondation (insémination artificielle et/ou saillie naturelle).
- Collecte, recherche et tri des embryons.
- Transfert et/ou conservation des embryons.

### **II-1. Synchronisation des chaleurs :**

Deux agents sont fréquemment utilisés pour la synchronisation des chaleurs dans les protocoles de superovulation chez les petits ruminants :

#### **II-1.1. Les Progestagènes :**

La progestérone ou ces analogues, dits, progestagènes [11]. Ces derniers, sont administrés soit oralement, ou bien sous forme d'implants sous-cutanés, CIDR® (Controlled Internal Drug-Releasing device) ou par moyens des éponges intravaginales [12], d'autres voies sont possibles tel que l'injection ou encore addition dans l'aliment [13].

De plus, différents principes actifs sont retrouvés selon les spécialités : les CIDR® contiennent de la progestérone pure sous forme d'un sel de silicate, les implants sous-cutanés contiennent du norgestomet et enfin les éponges vaginales peuvent contenir de l'acétate de fluorogestone (FGA) ou d'acétate de médroxyprogestérone (MAP) [14].

Ces produits exercent un feed-back négatif sur la sécrétion de LH et l'ovulation est donc inhibée [12]. Cependant, au retrait du traitement de progestérone ou de ses analogues, la croissance folliculaire, l'œstrus et l'ovulation sont obtenus au bout de 2 à 8 jours [11] et [12].

L'ovulation est normalement déclenchée 54h après la fin du traitement [15] et l'oestrus apparaît dans les 48h qui suivent le retrait [16].

### **II-1.2. Les prostaglandines :**

La maîtrise de la phase lutéale peut chez les femelles cyclées être obtenue en faisant appel à la prostaglandine F2 $\alpha$  seule. Si les PGF2 $\alpha$  agissent sur la durée de vie du corps jaune, elles n'ont pas d'effet direct sur la croissance folliculaire. Chez les petits ruminants, la prostaglandine n'induit la lutéolyse qu'entre le 5<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour du cycle. La progestéronémie diminue au cours des 24 heures suivant l'injection, l'oestrus apparaissant chez la brebis dans un délai de 38 heures en moyenne, l'ovulation survenant 93 $\pm$ 8 heures après l'injection de la prostaglandine [17].

Chez la brebis cyclée, l'induction et/ou la synchronisation de l'oestrus peut être obtenue par un traitement combinant progestagène et prostaglandine avec ou sans PMSG ou par une injection unique ou double de prostaglandine à 11 jours d'intervalle [17].

### **II-2. Induction de la superovulation :**

La super ovulation consiste à injecter des hormones gonadotrophiques à des femelles quelques jours avant l'oestrus pour obtenir au moyen de son action folliculostimulante une augmentation du nombre de follicule et une accélération de leurs croissance et leurs maturation [18].

Selon Chupin, 1988 [18], le principe de la superovulation est de réaliser un court circuit au niveau du cycle œstral, surtout les phénomènes de sélection et de dominance et d'amener jusqu'à l'ovulation des follicules qui sont privés de FSH et LH qui auraient subis le phénomène d'atrésie.

#### **II-2.1. Nature des traitements :**

Deux molécules sont fréquemment utilisables pour la stimulation folliculaire :

**II-2.1.1. PMSG :**

La PMSG est extraite du sérum de jument gravide entre le 42<sup>ème</sup> et le 100<sup>ème</sup> jours 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 [19]. En effet, c'est la première gonadotrophine utilisée pour obtenir une super ovulation, administrée en IM en une seule injection de 1000 à 2000UI, un ou deux jours avant le retrait de l'éponge. Cependant, cette gonadotrophine présente deux inconvénients [20] :

- ✓ Une activation prématurée de la méiose ovocytaire due à la forte activité de LH de PMSG
- ✓ Une modification des événements endocriniens favorables au transport des gamètes dans les voies génitale due à l'action prolongé de la PMSG (longue demi-vie).

En plus de l'utilisation répétée de la PMSG entraine l'apparition d'anticorps anti PMSG [21], ces effets conjugués peuvent expliquer les faibles performances obtenues avec la PMSG (2 à 3 embryons transférable en moyenne par donneuse) et son abondant au profit de FSH [20].

**II-2.1.2. FSH :**

Elle est obtenue à partir des extraits hypophysaires. Des études comparatives ont montré la supériorité des extraits hypophysaires porcins (FSHp) ou ovins (FSHo) en terme de production d'embryons aptes au transfert, mais aussi la nécessité de les administrer de façon séquentielle de 6 à 8 injections à 12h d'intervalle dans les 3 ou 4 derniers jours du traitement progestagène, la dernière injection ayant lieu 12h après le retrait du progestagène étant donné leur courte demi-vie (quelques heures).

En ce qui concerne la FSHp, elle peut être administrée en doses décroissantes et est enrichie en LHp (rapport FSH/LH de 0,3 à 0,4) lors des deux dernières injections réalisées à l'arrêt du traitement progestagène [5].

**II-3. La fécondation :**

Après synchronisation et superovulation, succède la méthode de lutte. Deux méthodes peuvent être appliquées, l'insémination artificielle et la saillie naturelle [5].

### II-3.1. Saillie naturelle :

Au cours de la saison sexuelle, elle est utilisée avec succès, la technique généralement employée est la monte en main. Elle débute dès l'apparition des chaleurs et consiste à appliquer deux à trois saillie de 12 heures d'intervalle. Mais cette technique n'est pas dénuée d'inconvénients :

- Il a été démontré que le transport et la survie des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles peuvent être perturbés après traitement progestatif associés à l'induction de la superovulation [22].
- En contre saison la faiblesse et l'absence de libido chez les mâles ne permet pas d'être sûr de leurs aptitudes à la saillie et du pouvoir fécondant de la semence qui est plus faible durant cette période [23].

### II-3.2. Insémination artificielle :

A cause de ses caractéristiques anatomiques, le col utérin de la brebis ne peut pas être franchi à l'aide du pistolet de l'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 **insémination intra-utérine**, ce type d'insémination est réalisé à l'aide d'un endoscope. Des faibles quantités du sperme **frais ou congelé** sont mises en place directement dans chaque corne utérine à l'aide d'un matériel spécifique [24].

La fertilité obtenue après IA cervicale avec de la semence congelée reste faible (10-20%). Seule la réalisation d'IA intra-utérine sous contrôle endoscopique permet d'obtenir des résultats permettant l'utilisation de la semence congelée (50-70%). Il apparaît donc que la congélation, en plus d'induire une mortalité cellulaire, elle diminue fortement l'aptitude des spermatozoïdes mobiles à traverser le col de l'utérus.

En effet, les résultats de production d'embryons varient en fonction du type de fécondation utilisé (cf tableau I)

**Tableau I:** Résultats comparatifs entre la saillie naturelle+insémination artificielle et la saillie naturelle seule [25].

Race ovine	Fécondation	Nombre d'embryons transférables	Nombre d'embryons viables	% d'embryons viables
Scottish blak	Saillie naturelle+IA	414	362	76,3
	Saillie naturelle	136	98	72
Welsh Mountain	Saillie naturelle+IA	373	302	80,5
	Saillie naturelle	254	186	73,2
Pooled data	Saillie naturelle+IA	847	664	78,4
	Saillie naturelle	390	284	72

#### II-4. La collecte d'embryons:

C'est une opération qui consiste à récolter l'ensemble des embryons produits par la brebis entre le 06 et le 08ème jour après le début de l'œstrus [26] de la façon la plus efficace et la moins traumatisante possible. Les embryons sont récoltés par ((lavages successifs)) des deux cornes utérines. Une solution physiologique (PBS) est injectée à l'une ou l'autre des extrémités de la corne utérine [26]. Le flux créé par l'injection de cette solution entraîne les embryons à l'extrémité opposée de la corne utérine ou ils sont récupérés par un cathéter, avec le milieu de collecte [5].

En raison de la difficulté de << franchir >> le col de l'utérus et de l'impossibilité de manipuler les cornes utérines par palpation rectale [24] la collecte des embryons ne peut se faire par les voies génitales naturelles [27] et [28]. Donc la récolte ne peut se faire que par laparotomie abdominale (collecte chirurgical) ou sous contrôle endoscopique (la collecte par

laparoscopie) [2]. Il a été observé que le taux de collecte obtenu par cette technique (endoscopie) est 10 à 15% inférieur à celui obtenu par la technique chirurgicale. La laparotomie médioventrale permet de collecter aisément 72% d'embryons. Elle est aussi très accessible étant donné le peu de matériel qu'elle nécessite. La technique laparoscopique fut développée afin d'améliorer les possibilités de répétition de la collecte chez les femelles donneuses permanentes [5]. La collecte laparoscopique, de maîtrise plus délicate, offre un rendement moyen de 62% [29].

#### **II-5. Examen et classement des embryons :**

La recherche et l'examen des embryons à la loupe binoculaire dans le liquide de récolte doivent être effectués. Après décantation du liquide de récolte ou bien après filtration, le décantât (ou filtrat).

Les critères d'appréciation de la viabilité des embryons sont exclusivement morphologiques. Les ovulations n'étant pas toutes synchrones, plusieurs stades embryonnaires peuvent être observés au cours d'une même récolte.

L'observation de l'intégrité de la zone pellucide, la taille et l'homogénéité de la masse cellulaire incluse dans celle-ci, la formation du blastocoele, du bouton embryonnaire et du trophoblaste permet de juger de la viabilité de l'embryon. Tous ces critères figurent dans la blastographie publiée par l'INRA-UNCEIA (1990) (Cf. tableau II). Certaines équipes rajoutent une classe 5 qui correspond aux ovocytes non fécondés.

**Tableau II** :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 comparables. -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 périvitellin.
2	Moyen	-Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomères sphériques au stade morula) ou des défauts bien précis comme : -nombreuses cellules échappées dans l'espace périvitellin, 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 apparait viable.
4	Mort ou dégénéré	-Arrêt de développement à un stade précoce. -Cellules dégénérées.

## II-6. Conservation des embryons :

La conservation des embryons récoltés sur un animal donneur ou obtenus par fécondation in vitro constitue une étape essentielle du transfert d'embryons. Cette conservation peut s'envisager à court ou long terme [17].

La cryoconservation permet la création de banques d'embryons au même titre que les banques de sperme utilisées en insémination artificielle. Elle facilite la mise en œuvre sur le terrain de la transplantation embryonnaire et permet un commerce d'embryons à l'échelle internationale, diminuant ainsi considérablement les frais de transport et de quarantaine par rapport à l'exportation des animaux adultes [30] et [31].

Deux techniques sont fréquemment utilisées : La congélation lente et la vitrification. La congélation ne doit être appliquée qu'à des embryons de qualité bonne à excellente. Les embryons de qualité inférieure verraient leur espérance de survie considérablement réduite après congélation. Il est conseillé de limiter le temps d'attente des embryons devant être congelés à deux ou trois heures [32].

### **III- FACTEURS DE VARIATION DE LA PRODUCTION IN VIVO D'EMBRYONS:**

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, 23% des brebis Lacaune et 10% des chèvres Alpine et Saanen ont moins de 5 ovulations après le traitement pFSH et par conséquent sont éliminées de la collecte d'embryons tandis que 17 à 20% des femelles traitées ont plus de 20 ovulations [6].

La variabilité est liée à des facteurs intrinsèques de l'animale aussi bien qu'extrinsèques [5] et [33].

#### **III-1. Les facteurs intrinsèques :**

##### **III-1.1 L'individu :**

La distribution des donneuses en fonction du nombre d'ovulation montre une importante variabilité de la réponse au traitement selon les individus [3].

##### **III-1.2 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 2). Les données disponibles sur le taux d'ovulation montrent que ce caractère est variable selon les races [34]. Pour la brebis Romney Marsh, Armstrong et Evans (1983), [35], constatent une plus faible réponse au traitement FSHp que pour la brebis Mérinos. Suite à l'administration de 16mg de FSHp, la réponse ovulatoire des brebis de race Lacaune est inférieure à celle des brebis prolifiques Romanov x Préalpes [36]. L'effet de race peut s'expliquer par le fait que les follicules des brebis prolifiques atteignent leur maturité à un diamètre inférieur à ceux des brebis non-prolifiques [37].

### III-1.3. L'âge :

L'âge de l'animal peut constituer un facteur limitant compte tenu du fait que le nombre de follicules qui quittent la réserve diminue avec celui-ci [19]. En revanche, les résultats rapportés par Forcada et al., 2000 [38]; Simonetti et al., 2007 [39]; Bartlewski et al., 2007 [40], la réponse ovulatoire est plus importante chez les brebis adultes que celle des plus jeunes

### III-1.4. Etat des ovaires:

L'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation ovarienne étant le facteur principal de variation de la réponse à FSH [41].

Chez la brebis superovulée, le nombre d'ovulations est positivement corrélé ( $r = 0,7$ ) au nombre de petits follicules (de 1-2 mm) [42] et négativement affecté par la présence de gros follicules ( $> 6$  mm) présents sur les ovaires au début de la stimulation gonadotrope [3] et [43] et [44] ou par la présence/absence de corps jaunes au début et/ou pendant le traitement de superovulation [43]. La qualité de la réponse va dépendre de l'importance de la réserve des follicules préantraux [19].

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 [45]. En effet, 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, soit environ 36 heures après le début des chaleurs. Les résultats sont encourageants puisque le rendement d'ovulation est de  $13,6 \pm 1,9$  avec le « Day 0 Protocol », contre  $10,4 \pm 1,9$  avec un protocole commencé plus tard lors du cycle [45].

## III-2. Les facteurs extrinsèques :

### III-2.1. La saison :

Chez les brebis de race Lacaune traitées avec FSHp en période d'œstrus saisonnier, le nombre moyen d'ovulation par femelle est inférieur à celui obtenu pendant la saison de reproduction [36]. Cette différence n'a pas été observée chez des chèvres laitières, bien que la qualité des embryons soit plus élevée dans la saison de reproduction [23].

### III-2.2. 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 [46] et [47].

Il a été constaté que les brebis souffrantes d'une sous-alimentation durant le traitement de superovulation pourraient présenter un effet de luteolyse prématurée des corps jaunes [48] et qui peut être aussi engendré par la sécrétion prématurée de PGF2. 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 [49].

### III-2.3. Le choix de l'hormone du traitement:

Le choix de l'hormone gonadotrope pour le protocole de superovulation est d'une importance capitale [35]. Il a été démontré que l'utilisation de la FSHp permettait l'obtention d'un grand nombre d'ovulation et d'embryons transférables supérieurs aux nombres obtenus par l'utilisation d'eCG [50].

Des études comparatives ont montré la supériorité des extraits hypophysaires porcins (pFSH) ou ovins (oFSH) en termes de production d'embryons aptes au transfert [20]. Un traitement cocktail, associant en une seule injection de FSH avec une dose modérée de eCG (400 à 800UI) a été utilisé avec succès chez les brebis Mérinos afin d'éviter les désavantages liés à la durée de l'activité biologique de chacune des gonadotrophines [51] et [52] et [53].

### III-2.4. Doses utilisées :

L'induction de la superovulation est tributaire de la dose de FSH administrée [18]. L'efficacité de la dose totale varie selon la préparation hormonale qui pourrait être déterminée à l'aide d'une courbe doses et réponse. Selon Baril et al ; 1993 [5], les doses les plus souvent utilisées sont comprises entre 16 et 20 mg [3]. Les résultats obtenus (en terme de taux de

production d'embryons) en utilisant les doses précédemment citées sont étroitement liées au génotype de la brebis donneuse.

### III-2.5. Répartition des doses et rapport FSH/LH :

Dans les conditions physiologiques, ce rapport évolue au cours du cycle, avec une diminution à l'approche de l'ovulation [54]. Par ailleurs, si le rapport FSH/LH est trop faible par excès de LH, l'ovulation se trouve prématurée et les résultats sont moins bons [55] ; inversement, si le rapport FSH/LH est trop faible par manque de FSH, l'œstrus est retardé et les résultats baissent [56]. L'activité FSH doit nettement prédominer sur celle de la LH en début de traitement (chez la brebis Lacaune un rapport FSH/LH < 2 affecte la qualité embryonnaire); un enrichissement en LH semble en revanche nécessaire en fin de traitement (FSH/LH < 0,4), conditionnant l'induction des ovulations [57]. Il convient donc, pour avoir les meilleurs résultats possibles, de bien contrôler l'évolution de ce rapport jusqu'à l'ovulation [9].

### III-2.6. La technique d'insémination utilisée :

La technique d'insémination, naturelle ou artificielle joue un rôle important sur le taux de fécondation des ovocytes, donc sur le rendement d'embryon transférable. 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 [20].

La fécondation des femelles fortement superovulées pose des difficultés particulières, liée non seulement au traitement mais aussi à la réponse ovarienne. En effet, Le passage des spermatozoïdes à travers le cervix est perturbé chez la brebis superovulée [35]. Cependant le dépôt de la semence 48 à 50h après le retrait d'éponge dans les cornes utérine permet des taux de fécondation élevés chez les donneuses ayant de moins de 30 ovulations [20].

## **CHAPITRE II**

### **FACTEURS D'AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION D'EMBRYONS IN VIVO.**

## **II-Introduction :**

Les faibles réponses au traitement de FSH chez les femelles superovulées (femelles ayant moins de 5 ovulations : 20 % chez les brebis ; 10% chez les chèvres ) constituent un facteur limitant de la transplantation embryonnaire [20]. Chez la brebis superovulée avec FSH, le nombre d'ovulations est positivement corrélé au nombre de petits follicules de 1-2 mm et négativement affecté par la présence de gros follicules présents sur les ovaires au début de la stimulation gonadotrope [3] et [43].

Comme la fin de la croissance des follicules est strictement dépendante de l'activité hypophysaire, il a été fait l'hypothèse qu'en inhibant les sécrétions endogènes de LH et FSH l'on devrait enrichir la classe de taille (1-2 mm) qui précède la dépendance vis à vis des gonadotrophines.

### **II-1. Les techniques inhibant les effets délétères du follicule dominant :**

#### **A. Début du traitement de superovulation en l'absence d'un follicule dominant:**

La comparaison des réponses chez les animaux pour lesquels le traitement de superovulation a commencé en présence ou en absence d'un follicule dominant montre que dans ce dernier cas le nombre moyen d'ovulations est fortement augmenté. Le suivi échographique pendant au moins 3 jours avant le début du traitement pour s'assurer de l'absence de follicule dominant au moment du début de traitement semble donner des résultats satisfaisants [58] et [59].

#### **B. Elimination du follicule dominant :**

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

##### **B.1. Méthodes physiques :**

Il s'agit de ponctionner le follicule dominant par aspiration transvaginale échoguidée chez la vache [60] ou sous laparoscopie chez la brebis [61]. Les résultats des différentes études testant l'efficacité de la ponction du follicule dominant sont plutôt encourageants. Cette ponction du follicule dominant est la plupart du temps bénéfique en terme de nombre total d'embryons collectés et d'embryons viables [59] , De Ruigh et Mullaart (1999) [62], Ede et al (1999) ] [63] sauf pour Shaw et Good (2000) [64] pour lesquels l'augmentation du nombre

total d'embryons collectés suite à l'ablation du follicule dominant ne s'expliquerait que par l'augmentation du nombre d'embryons non transférables.

## **B.2.Méthodes hormonales :**

### **1. Progestagènes et oestradiol 17-β (E17-β) :**

Elle consiste à éliminer le follicule dominant et la synchronisation de la vague folliculaire. BO et al (1995) [65] ont cherché, par un traitement hormonal associant implant de progestagènes et oestradiol 17-β (E17-β) à éliminer le follicule dominant et par-là même à provoquer l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire avant l'initiation du traitement de superovulation. Cependant, même après détermination du moment optimal d'administration de l'oestradiol, les résultats obtenus avec les animaux traités avec l'association progestagènes – oestradiol ne sont pas meilleurs que ceux obtenus avec les progestagènes seuls [66]. Malgré son intérêt théorique, l'ajout d'oestradiol dans les protocoles de superovulation ne paraît donc pas intéressant [60].

### **2. Utilisation de la GnRH:**

Depuis la découverte de la GnRH comme principal facteur hypothalamique régulant la libération des gonadotrophines, de nombreux travaux ont été entrepris pour synthétiser des analogues de ce décapeptide [67].

La synthèse de ces analogues a été orientée vers la synthèse d'agonistes permettant de mimer les stimulations hypothalamiques afin de maîtriser plus précisément la fertilité des espèces animales. La mise en évidence de l'effet inhibiteur paradoxal des agonistes administrés sur un laps de temps suffisant a remis en cause les perspectives d'utilisation des agonistes en termes de stimulation, mais a ouvert la voie à toutes les utilisations possibles de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans la maîtrise des fonctions de reproduction [68].

#### **2. 1.Définition de la GnRH :**

La GnRH, ou gonadolibérine, est une neuro-hormone peptidique de 10 acides aminés secrétée en continu et de manière pulsatile par l'hypothalamus. Elle agit sur la sécrétion alternée des hormones hypophysaires par les cellules gonadotropes [69].

La GnRH des mammifères est identique chez les bovins, ovins, porcins, primates, chien, homme [70] ainsi que chez les amphibiens [71].

L'intérêt clinique des analogues de synthèse de la GnRH porte d'une part sur la possibilité d'intervenir avec ces molécules de façon ponctuelle, par des injections intramusculaires ou intraveineuses afin de modifier à des instants précis le déroulement des cycles ovariens chez diverses espèces, mais une part importante de leurs applications est basée sur leur présence sur une longue durée dans l'organisme. Le phénomène de désensibilisation observé par des traitements au long terme avec des agonistes et le maintien d'une inhibition continue par les antagonistes nécessite des concentrations plasmatiques soutenues pendant de longues périodes. Le maintien de telles concentrations nécessite soit des injections répétées de petites doses, soit des injections plus espacées de doses massives [67].

## **2.2. Rôles physiologiques de la GnRH :**

Elle permet la croissance folliculaire par la FSH et favorise la synthèse de récepteurs à LH sur la membrane des cellules de la granulosa, eux-mêmes impliqués dans l'ovulation et la lutéinisation. Elle entraîne donc la formation d'un corps jaune fonctionnel et une forte synthèse de progestérone, favorable à la survie de l'embryon. Elle provoque une décharge brutale de LH qui agit comme un pic pré ovulatoire normal, avec ovulation du follicule dominant, lutéinisation puis initialisation de la vague folliculaire suivante dans les deux jours [72] et [73]. L'induction de l'ovulation se fait dans un délai constant entre les animaux, d'où son intérêt dans les protocoles de synchronisation des chaleurs et le traitement des animaux à ovulation retardée.

Injectées en phase lutéale, la GnRH et ses analogues favorisent les grandes cellules lutéales qui sont plus actives pour la synthèse de progestérone (effet lutéotrope) et moins sensibles à l'effet lutéolytique que les petites cellules (effet lutéoprotecteur) [74]. Elle a un rôle alors dans le maintien du corps jaune et de la gestation, car un fort taux de progestérone après l'ovulation favorise le développement embryonnaire [75].

De plus, la GnRH a un effet antilutéolytique en provoquant la lutéinisation des follicules présents sur l'ovaire. Elle fait chuter la sécrétion d'oestrogènes ce qui limite l'apparition des récepteurs endométriaux à l'ocytocine [73].

## **2.3. Effet de l'administration chronique des agonistes de la GnRH (Désensibilisation de l'hypophyse):**

Les analogues de synthèse sont des molécules de composition chimique voisine de celle de la molécule naturelle. Parmi ces molécules, on distingue des agonistes qui présentent une affinité pour le récepteur à la molécule naturelle et la capacité d'induire un effet observable

suite à l'interaction avec ce récepteur. Cette capacité est aussi appelée activité intrinsèque de l'agoniste ou efficacité. Les agonistes sont donc caractérisés par leur affinité pour un récepteur et par leur efficacité [76].

Les analogues ont pour le moment trois explications complémentaires de la désensibilisation [76] et [77].

- La diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules gonadotropes.
- L'absence de couplage entre les récepteurs et les seconds messagers intracellulaires du fait du phénomène de micro-agrégation et de saturation des seconds messagers.
- L'inhibition de la synthèse des gonadotrophines pendant cette période.

#### **2.4. Effet de l'administration des antagonistes de la GnRH (Inhibition de la sécrétion de la GnRH) :**

Les antagonistes sont caractérisés par une affinité pour les récepteurs comme les agonistes mais par une absence d'efficacité. Ils sont dits compétitifs lorsqu'ils se lient au même site de fixation que la molécule dont ils antagonisent les effets, ou non compétitifs lorsque leur interaction ne se fait pas sur le même site. Un antagoniste compétitif n'entre en compétition qu'en termes d'affinité avec la molécule naturelle alors qu'un antagoniste non compétitif intervient sur l'affinité et l'efficacité [76]. Les études de l'équipe de Kovacs *et al.*, (2001) [78] ont montré en comparant l'effet d'une administration ponctuelle de l'antagoniste à celui d'un dépôt de celui-ci sur des rattes stérilisées ou non. Ils ont abouti aux résultats suivants :

- L'administration d'un antagoniste de la GnRH induit un premier effet d'inhibition de la libération de LH par l'hypophyse.
- Puis une diminution de la concentration en LH dans les cellules gonadotropes (après quelques jours de traitement).
- Une diminution de la quantité d'ARNm des récepteurs à la GnRH dans les cellules gonadotropes.

#### **2.5. Utilisation de la GnRH en médecine humaine :**

Chez la femme, l'administration de GnRH ou analogue est utilisée dans la thérapie des cas d'hypogonadisme hypogonadotrope d'origine hypothalamique ou d'anovulation par hypopulsatilité, mais aussi dans les programmes de FIV [79]. Les principaux agonistes de la GnRH utilisés en médecine humaine sont Leuproréline, Buséréline, Goséréline, Trytoréline et Nafaréline. [80].

Les premiers analogues de la GnRH utilisés dans les programmes de fécondation in vitro ont été les agonistes sous formes d'injections quotidiennes ou d'injections de microcapsules. Le but du traitement était d'obtenir une inhibition totale de l'axe hypothalamo-hypophysaire afin de prévenir l'apparition du pic de LH et de provoquer celui-ci par une injection de hCG [79]. Mais plus récemment un protocole plus efficace utilisant un antagoniste de la GnRH, Cetorelix<sup>®</sup>, a permis d'obtenir de meilleurs résultats [82].

## 2.6. Utilisation de la GnRH en médecine vétérinaire :

### a. Chez la jument :

Chez la jument, quelques essais ont été effectués avec des agonistes de la GnRH. L'administration d'un implant de Buséréline le jour de l'ovulation (durée de relargage de 28 jours) n'apporte pas d'amélioration globale ni en nombre d'ovulations, ni en nombre d'embryons [82]. Une grande variabilité inter animaux quant aux effets «inhibiteurs» de l'agoniste, en est peut être responsable, cette dernière pouvant être attribuable à la forme d'administration sous-cutanée. Un traitement comparable avec implants de Deslorelin (deux implants de 2,1 mg, Ovuplant<sup>®</sup>) posés avant l'ovulation du cycle précédent, n'a pas non plus d'effet améliorateur sur la réponse ovarienne, en terme de nombre d'ovocytes collectés par jument (1,8 sans agoniste vs 1,3 avec agoniste) ou de proportion d'ovocytes récupérés par follicule ponctionné (25 % et 21 % respectivement) [83]. Cette proportion est très décevante par rapport aux autres espèces [84], [85] et [86].

### b. Utilisations chez les ruminants ;

#### b.1. Chez la vache ;

Il a été montré que l'injection d'agoniste de la GnRH quelque soit le moment du cycle, induisait l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire 3 à 4 jours après le traitement et éliminait les gros follicules par ovulation et lutéinisation [87].

Dans cette optique, Kohram et al., (1998) [87], ont injecté un analogue de la GnRH (Cystorelin<sup>®</sup>) 2 jours avant le traitement de superovulation. Bien qu'ayant augmenté la réponse ovarienne, le nombre d'ovocytes non fécondés ou d'embryons dégénérés était également augmenté. La survenue d'un pic de LH, 2 jours avant la superovulation compromettrait donc la capacité des follicules à ovuler et à produire des embryons viables.

### 1. Protocoles utilisant les agonistes de la GnRH :

L'utilisation des agonistes du GnRH permet d'empêcher les ovulations prématurées grâce à une désensibilisation hypophysaire réversible. L'administration d'un agoniste de GnRH induit initialement une libération de LH et FSH ("flare-up") puis l'effondrement de la sécrétion des gonadotrophines [2].

Utilisée seule, une injection de GnRH peut induire l'ovulation dans une population de brebis cyclées, par sécrétion de LH [93]. Cependant, l'inhibition des sécrétions endogènes de LH et FSH par administration pendant 14 jours d'un analogue de GnRH, permet de doubler le nombre de follicules de 1 à 2 mm avant le traitement FSH, la réponse ovulatoire est augmentée de 50% et le nombre d'embryons transférables par brebis traitée (10 embryons) est doublé par rapport aux donneuses superovulées en l'absence de prétraitement [9].

### 2. Protocoles utilisant les anti GnRH :

Ces molécules bloquent les récepteurs de GnRH de façon compétitive et n'entraînent pas de relargage initial de gonadotrophines évitant ainsi l'effet « flare up ». Les études chez l'animal et chez l'homme ont montré que l'administration de l'antagoniste entraîne une chute brutale des gonadotrophines et permet de prévenir ou d'interrompre le pic de LH, l'ovulation et la lutéinisation prématurée [94] et [95].

L'utilisation de ces produits se fait par un traitement de 11 jours avant l'administration de FSH [3] (cf. tableau III). Ils peuvent être également utilisés avec une injection unique 12h après le retrait des éponges [96]; dans ce cas les anti-GnRH sont chargés de retarder le pic de LH, sans l'inhiber (ce qui permet de prolonger la phase de recrutement et donc d'augmenter le nombre de follicules recrutés), jusqu'à l'injection de LH pour provoquer de façon exogène le pic préovulatoire.

**Tableau III :** Production d'embryons chez la brebis en fonction du prétraitement utilisé [6], [7] [97].

GnRH Utilisée	Régime d'injection	Rendement de la superovulation				Auteurs
		CJ	Œufs Collectés %	Embryons Transférables %	Embryons Transférables/ Brebis	
Anti GnRH	11 inj	20,6±10,2	76	85	12,0±7,8	[6]
Anti GnRH	03 inj	18,4±9.5	68	77	8,3±5,6	
Anti GnRH	01 inj	12,2±1,1	78	70,8	7,3±1,1	[7]
Analogue de GnRH	14 inj	15±7,8	64	46	5,7±6,3	[97]
	60 jours	14,4±7,2	68	71	5,7±5,2	

**PARTIE  
EXPERIMENTALE**

# OBJECTIFS

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. L'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation ovarienne étant le facteur principal de variation de la réponse à FSH, plusieurs approches visant à contrôler cette population folliculaire ont été étudiées. Parmi ces approches, une possibilité largement étudiée chez les ovins, consiste à accroître le nombre de follicules dans la classe de taille qui précède la dépendance de ces follicules vis-à-vis des gonadotrophines (1 à 2 mm), en inhibant les sécrétions endogènes de LH et FSH. Il semble qu'il est possible de freiner de façon réversible cette sécrétion des gonadotrophines soit par une désensibilisation hypophysaire au GnRH avec un agoniste administré pendant 2 semaines, soit plus directement par un antagoniste administré pendant 10 jours avant le début de la stimulation gonadotrope. Dans cette optique, nous avons visé par le biais de notre travail, évaluer dans le cadre de production d'embryons in vivo, l'effet de la répétition du prétraitement avec de la GnRH chez les brebis Olued Djellal sur:

- Le comportement d'oestrus et la réponse ovarienne
- Le taux de collecte, fécondation et la qualité des embryons

## **CHAPITRE I**

# **EFFET DE LA RÉPÉTITION D'UN PRÉTRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'ESTRUS ET LA RÉPONSE OVARIENNE**

**I- Lieu et période de l'expérimentation :**

Notre étude expérimentale c'est déroulée au niveau de la station expérimentale de l'université « Saad Dahleb » de Blida durant la période allant du 16 mars 2010 jusqu'au 23 mai 2010.

**II- MATERIELS ET METHODES :****II-1. Matériels :****II-1.1. Animaux :****II-1.1.1. Brebis :**

Dix (10) brebis donneuses de race Ouled Djellal ont été sélectionnées pour la réalisation de notre travail. Les renseignements relatifs à l'identification des brebis donneuses sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau I : Poids, âge et note d'état corporel (NEC) des brebis donneuses.**

	Brebis	Age (mois)	Poids (Kg)	NEC
<b>Lot 01</b>	B1	24	37	2.5
	B2	36	49	3
	B3	12	28	2
	<b>Moyenne ± écart type</b>	24±12	38±10,53	2.5±0.50
<b>Lot 02</b>	B4	42	50	3
	B5	24	55	3
	B6	72	57	3.5
	B7	30	47	2.5
	B8	36	45	2.5
	B9	24	46	2.5
	B10	48	43	2.5
	<b>Moyenne ± écart type</b>	39,42±16.91	49±5.25	2.78±0.39

Les brebis donneuses ont été réparties en deux lots :

- **Lot 1 : (témoin)** présente un âge moyen de  $24 \pm 12$  mois, un poids moyen de  $38 \pm 10,53$  kg et une note d'état corporel moyenne de  $2.5 \pm 0.50$ .
- **Lot 2 : (prétraité)** présente un âge moyen de  $39,42 \pm 16.91$  mois, un poids moyen de  $49 \pm 5.25$  kg et une note d'état corporel moyenne de  $2.78 \pm 0.39$ .

### II-1.1.2. Béliers :

Cinq béliers de race Ouled Djellal (D1, D2, D3, D4, D5) sont utilisés. Les renseignements relatifs à leurs identifications sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II :** Age, poids et note d'état corporel (NEC) des béliers.

Béliers	Poids (kg)	Age (ans)	NEC
<b>D1</b>	60	7,5	3
<b>D2</b>	74	5,5	3.5
<b>D3</b>	82	4,5	3.5
<b>D4</b>	51	4,5	2.5
<b>D5</b>	62	4,5	2.5
<b>Moyenne <math>\pm</math> écart type</b>	<b><math>65,8 \pm 12,21</math></b>	<b><math>5,3 \pm 1,30</math></b>	<b><math>3 \pm 0.50</math></b>

OD: Ouled Djellal

Les béliers de la race Ouled Djellal présentent un poids corporel moyen de  $65,8 \pm 12,21$  kg, un âge moyen de  $5,3 \pm 1,30$  ans et une note d'état corporel moyenne de  $3 \pm 0.50$ .

L'ensemble des animaux séjournait dans une bergerie sous un éclairage naturel et ont reçu de l'eau et du foin à volonté complétement avec 500g de concentré /jour/animal. Un déparasitage par l'administration d'Ivermectine<sup>ND</sup> et l'Albendazole<sup>ND</sup> a été réalisé deux mois avant le début de l'expérimentation.

**II-1.2. Matériel, appareillages et produits :**

Pour la réalisation de notre expérimentation, des appareils tels que l'échographe et l'endoscope ainsi que d'autres instruments et produits ont été utilisés.

**II-1.2.1. Appareillages:****II-1.2.1.1. Echographe :**

Nous avons utilisé un échographe de type pie médical 100 LC équipé d'une sonde bi fréquence 6/8 MHZ.

**II-1.2.1.2. Endoscope :**

Le matériel endoscopique utilisé comporte :

- Une optique à vision direct ( $0^\circ$ ), diamètre externe 6,5mm (STORS).
- Un générateur de lumière froide a intensité variable (STORS).
- Un câble de fibre optique (STORS).
- Une canule a piston et orifice pour l'insufflation d'aire (STORS).
- Une pompe avec filtre et commende de pompe au pied (STORS).
- Un trocart avec canule de 5,5mm recevant la pince a préhension (STORS).
- Un tuyau de connexion entre la pompe et le robinet d'arrivée de l'air, fixé sur le trocart recevant l'endoscope.
- Une pince a préhension aromatique.

**II-1.2.1. 3. Instruments :**

- Balance Marchal.
- Applicateur d'éponge vaginale.

**II-1.2.1. 4. Matériel de récolte du sperme et d'insémination:**

Le matériel utilisé pour la récolte et le contrôle du sperme est présenté ci-dessous :

- Vagin artificiel
- Plaque chauffante
- Lame, lamelle
- Lame de NEBAUER

- Pipette Pasteur
- Micropipette
- Microscope optique
- Bain-marie.
- Etuve.
- Lame, porte lame et rasoir
- Tube à essai.
- Pipettes graduées.
- Pistolet d'insémination artificielle
- Paillettes d'insémination

### II-1.2.2. Produits :

#### II-1.2.2.1. Hormones :

- **Eponge vaginale** : nous avons utilisé des éponges imprégnées de 40mg d'acétate de fluorogestone (FGA), ce produit est commercialisé sous le nom de (chronogest<sup>ND</sup>).
- **FSHp et LHp** : extrait hypophysaire porcin purifié (hormones produites par l'équipe du Pr BECKERS .FMV Liège -Belgique) (Stimufol<sup>ND</sup>).
- **GnRH** : agoniste de la GnRH (Buséréline) commercialisée sous le nom de (Suprefact<sup>ND</sup>).

#### II-1.2.2.2. Antibiotiques et autres produits :

- Pénicilline/streptomycine<sup>ND</sup> injectable et terramycine spray<sup>ND</sup> ont été utilisés pour éviter les surinfections et complications.
- Biocide, alcool chirurgical, alcool iodé, Bétadine, savon de Marseille.
- Eau distillée, Ovixcell, NaCl 0,9 %, alcool polyvinylique.
- Vaseline et gel a échographe.
- Alluspray<sup>ND</sup>
- Xylazine (Rompun<sup>ND</sup>), Xylocaine (Lidocaine 2%<sup>ND</sup>).

## II-2. Méthodes :

Notre protocole expérimental comporte les étapes suivantes :

1. Echographie.
2. Traitement de synchronisation et de superovulation .
3. Détection des chaleurs.
4. Récolte et conditionnement du sperme.
5. Fécondation (saillie et insémination artificielle).
6. Endoscopie.

### II-2.1. Echographie :

Pour la sélection des brebis vides, une échographie transrectale est réalisée en position debout et couchée comme décrite par KHAN (1994) [98].

Pour l'interprétation d'une image échographique nous avons considérés que :

- Les structures anéchogènes, apparaissent noires à l'écran (exemple : les liquides).
- Les structures hyperéchogènes, sont à l'origine d'une réflexion importante des ultrasons qui forment une image claire à l'écran (exemple : les os).
- Les structures hypoéchogènes, apparaissent relativement sombres gris foncées (exemple : les tissus).

### II-2.2. Traitements de synchronisation et de super ovulation :

#### II-2.2.1. Traitement de synchronisation des chaleurs :

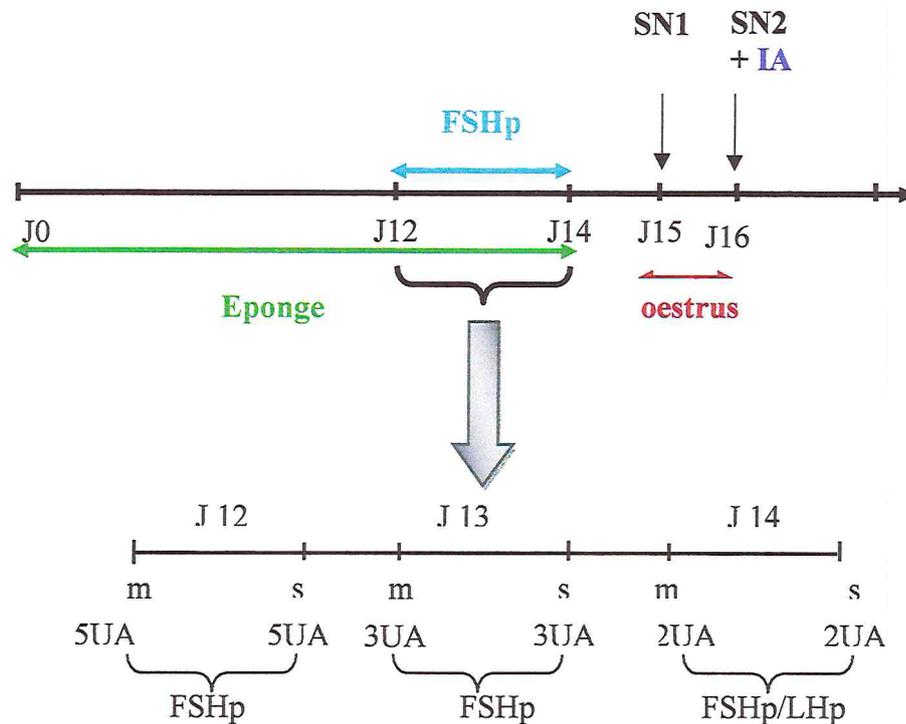
La synchronisation de l'oestrus a été obtenue chez l'ensemble des brebis par la mise en place d'éponges vaginales imprégnées de 40 mg d'Acétate de Fluorogestone (FGA) durant 14 jours.

#### II-2.2.2. Traitements de super ovulation :

Les brebis donneuses ont été réparties en deux lots :

- Lot 1 (témoin): n= 03 recevant 20 UA de FSHp.
- Lot 2 : n= 07 recevant comme deuxième prétraitement de la GnRH et 32 UA de FSHp (le premier prétraitement a été réalisé lors d'un travail précédent:[99]).

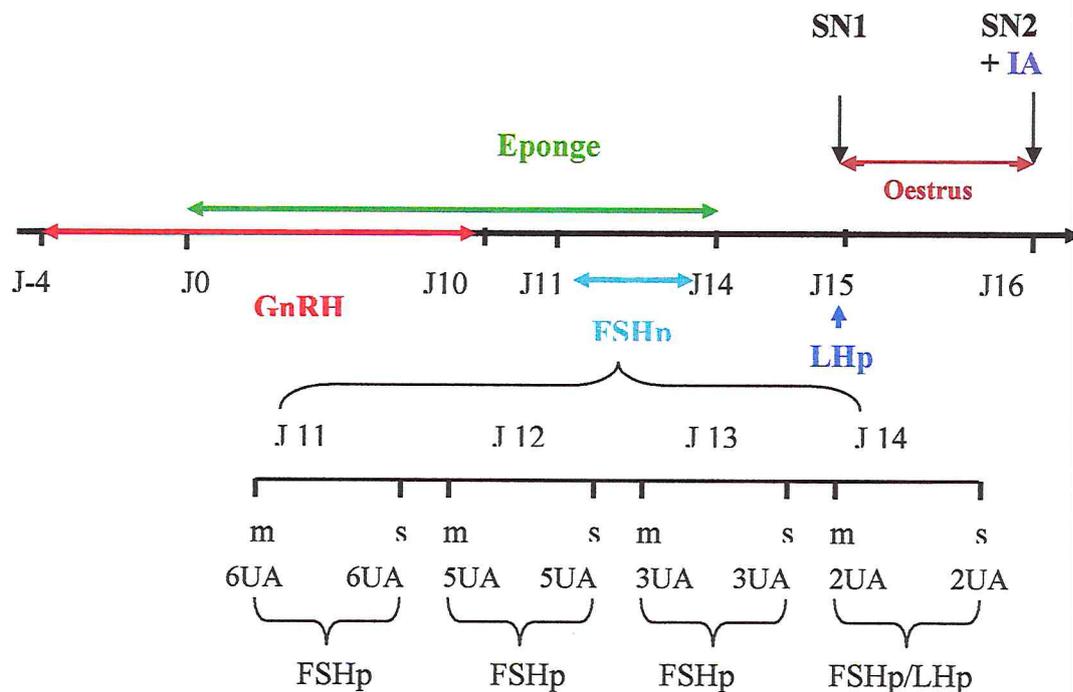
- ☒ Chez les brebis du Lot 1 : l'induction de la superovulation a été réalisé par l'administration d'une dose totale de 20 UA de FSH porcine répartie en 6 injections biquotidiennes (12 heures d'intervalle) et décroissantes, durant les trois derniers jours du traitement progestagène (cf. figure 1)



SN : saillie naturelle

Figure 1 : Protocole de synchronisation et de superovulation du lot 1.

- ☒ Chez les brebis du lot 2 : Une préparation de l'ovaire à l'induction de la superovulation a été réalisée par injection quotidienne (sous cutanée) de 40 µg d'agoniste de GnRH, pendant 14 jours. La superovulation a été induite par l'administration d'une dose totale 32 UA de FSH porcine, répartie en 8 injections biquotidiennes (12 heures d'intervalle) et décroissantes, durant les quatre derniers jours du traitement progestagène. L'ovulation a été induite par l'injection intraveineuse de 3 mg de LH porcine, 32h après le retrait de l'éponge vaginale (cf figure 01). Les brebis de ce lot 2 ont reçu le même traitement (GnRH/FSHp) 6 mois auparavant.



**Figure 2** : Protocole de prétraitement, synchronisation et de superovulation du lot 2.

- ☒ Le rapport FSH/LH a été modifié par addition de 60 µg et 90 µg de LH porcine, lors des deux dernières injections chez l'ensemble des brebis

#### II-2.4. Détection d'oestrus :

La détection de l'oestrus, à l'aide de béliers détecteurs entiers munis d'un tablier toutes les quatre heures, a débuté 12 heures après le retrait de l'éponge vaginale. Chaque brebis restant immobile au chevauchement était considérée comme étant en chaleur.

#### II-2.5. Récolte et conditionnement du sperme:

La récolte de sperme sur les cinq béliers entraînés a été réalisée selon la technique de Baril et al (1993), en suivant les principales étapes suivantes :

- Nettoyage et désinfection de la verge
- Préparation et lubrification du vagin artificiel
- Récolte de sperme en présence d'une brebis en chaleur
- Contrôle qualitatif et quantitatif du sperme (volume, motilité massale et individuelle, concentration)
- Dilution du sperme avec l'Ovixcell

- Mise en paillettes (0,25ml) de la semence diluée ( $100 \times 10^6$  spz)
- Conservation des paillettes à  $+ 15$  °C.

### II-2.6.Fécondation :

La fécondation a été obtenue par une double saillie monte en main à 12 heures d'intervalle, la première juste après l'injection de LHp des brebis superovulées, par des béliers reproducteurs à raison d'un mâle pour cinq brebis ; suivie d'une insémination in utero sous contrôle endoscopique avec  $100 \times 10^6$  spermatozoïdes, 52 heures après le retrait de l'éponge vaginale selon la technique décrite par Baril et al., 1993 [05].

### II-2.6. Endoscopie :

L'examen endoscopique a été réalisé juste avant la récolte des embryons selon la méthode décrite par (Baril et al., 1993) [05]. La technique consiste à faire deux incisions de la peau abdominale ventrale 5 à 7cm cranialement à la mamelle et 3 à 4cm latéralement de la ligne blanche, afin de pouvoir insérer deux trocarts:

- Un premier trocart de 7mm était d'abord mis en place pour pouvoir insérer l'optique de l'endoscope et insuffler de l'air stérile dans l'abdomen afin de créer un pneumopéritoine permettant ainsi une meilleure observation de l'appareil génital.
- Un deuxième trocart de 5mm était mis en place pour y insérer une pince atraumatique. Cette dernière permet la manipulation de la matrice et des ovaires.

Une fois l'ovaire (ovaire gauche ou droit) est visualisé, un dénombrement des corps jaunes été réalisé.

### III- ANALYSES DES DONNEES :

Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type. Pour la comparaison des moyennes, nous avons utilisé le test t de students (Logiciel SYSTAT, version 10).

**IV-RESULTATS :****IV-1. Comportement d'oestrus après induction de la superovulation :****IV-1.1.Comportement d'oestrus chez les brebis du lot 1:**

Les résultats de la détection des signes d'oestrus chez les brebis du lot 1 sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau III :** Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les brebis du lot 1.

	Brebis	IRE- début d'oestrus	IRE- fin d'oestrus	Durée d'oestrus
<b>Lot 1</b>	B1	16	60	44
	B2	20	60	40
	B3	20	56	38
	<b>Moyenne ± écart type</b>	<b>18,66±2,30</b>	<b>58,66±2,30</b>	<b>40,66±3,05</b>

**IRE :** Intervalle retrait d'éponge vaginale (heures)

Nos résultats montrent que le taux de synchronisation a été de 100 % pour le lot 1 et le début et la durée des signes d'oestrus ont été respectivement de 18.66±2,30 h et de 40,66±3,05h.

**IV-1.2.Comportement d'oestrus chez les brebis du lot 2 :**

Les résultats de la détection des signes d'oestrus chez les brebis du lot 2 sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV :** Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les brebis du lot 2.

	Brebis	IRE- début d'oestrus	IRE- fin d'oestrus	Durée d'oestrus
<b>Lot 2</b>	B4	20	56	36
	B5	20	68	48
	B6	-	-	-
	B7	20	56	36
	B8	20	56	36
	B9	-	-	-
	B10	16	60	44
	<b>Moyenne ±écart type</b>	<b>19,2±1,78</b>	<b>59,2±5,21</b>	<b>40±5,65</b>

**NB :** Les brebis B6, B9 n'ont pas présentées des signes d'oestrus.

Nos résultats montrent que le taux de synchronisation d'oestrus pour les brebis du lot 2 est de 71,42%. Le début et la durée des signes d'oestrus ont été respectivement de  $19,2 \pm 1,78$  h et  $40 \pm 5,65$ .

#### IV-1.3. Effet de la répétition du prétraitement sur le comportement d'oestrus :

Les résultats du comportement d'oestrus des différents traitements réalisés sont reportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau V :** Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les brebis du lot témoin, lors du premier prétraitement et deuxième prétraitement (Moyenne  $\pm$  écart type).

Lots	IRE- début d'oestrus	IRE- fin d'oestrus	Durée d'oestrus
Lot 1 (Témoin)	$18,66 \pm 2,30$	$58,66 \pm 2,30$	$40,66 \pm 3,05$
Lot 2 1 <sup>ier</sup> prétraitement	$16 \pm 2,82$	$62,4 \pm 6,06$	$46,4 \pm 8,29$
Lot 2 2 <sup>ieme</sup> prétraitement	$19,2 \pm 1,78$	$59,2 \pm 5,21$	$40 \pm 5,65$

Le traitement statistique des données a révélé que :

- ☒ Le début d'oestrus tend à être significativement précoce lors du premier prétraitement par rapport au deuxième prétraitement (1<sup>ier</sup> prétraitement :  $16 \pm 2,82$  vs  $19,2 \pm 1,78$ : 2<sup>ieme</sup> prétraitement,  $p = 0,06$ ), aussi, comparativement au 2<sup>ieme</sup> prétraitement la durée d'oestrus tend à être plus courte lors du 1<sup>ier</sup> prétraitement (1<sup>ier</sup> prétraitement :  $46,4 \pm 8,29$  vs  $40 \pm 5,65$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement,  $p = 0,1$ ).
- ☒ Aucune différence n'a été observée entre le lot témoin et le deuxième prétraitement concernant le début et la durée d'oestrus.

#### IV-2. Réponse ovarienne après induction de la superovulation :

##### IV-2.1. Réponse ovulatoire chez les brebis du lot 1:

Les résultats du dénombrement des corps jaunes chez les brebis du lot 1 sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau VI :** Réponse ovulatoire après induction de la superovulation chez les brebis du lot 1.

Brebis		Nombre de corps jaunes		Total/ Moyenne ± écart type
		OVG	OVD	
Lot 1	B1	04	09	13
	B2	03	06	09
	B3	02	01	03
<b>Moyenne ± écart type</b>		3±1	5.33±4.04	8.33 ±5.03

Nos résultats montrent que la réponse ovarienne chez le lot de brebis témoin est de 8.33 ±5.03 corps jaunes.

##### IV-2.2. Réponse ovulatoire chez les brebis du lot 2 :

Les résultats du dénombrement des corps jaunes chez les brebis du lot 2 sont présentés dans le tableau suivant:

**Tableau VII :** Réponse ovulatoire après induction de la superovulation chez les brebis du lot 2.

Brebis		Nombre de corps jaunes		Total/ Moyenne ± écart type
		OVG	OVD	
Lot 2	B4	06	04	10
	B5	08	08	16
	B7	02	01	3
	B8	02	05	7
	B10	10	11	21
	<b>Moyenne ±écart type</b>		05,6±3,57	05,8±3,83

Nos résultats montrent que la réponse ovarienne chez le lot de brebis prétraités est de  $11.4 \pm 7,16$  corps jaunes.

#### IV-2. 3. Effet de la répétition du prétraitement sur la réponse ovarienne:

Les résultats du dénombrement des corps jaunes lors des différents traitements réalisés sont reportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau VIII** : réponse ovulatoire chez les brebis du lot témoin, lors du premier prétraitement et deuxième prétraitement.

<b>Lots</b>	<b>Corps jaunes</b> Moyenne $\pm$ écart type
<b>Lot 1</b> <b>(Témoin)</b>	08.33 $\pm$ 5.03
<b>Lot 2</b> <b>1<sup>ier</sup> prétraitement</b>	17.60 $\pm$ 6.01
<b>Lot 2</b> <b>2<sup>ieme</sup> prétraitement</b>	11.4 $\pm$ 7,16

Le traitement statistique des données a révélé que :

- ☒ La réponse ovarienne tend à être significativement plus élevée lors du premier prétraitement par rapport au deuxième prétraitement (1<sup>ier</sup> prétraitement :  $17.60 \pm 6.01$  vs  $11.4 \pm 7,16$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement,  $p = 0.1$ ).
- ☒ Comparativement au lot témoin la réponse ovarienne a été plus élevée lors du 2<sup>ieme</sup> prétraitement, cette différence n'a pas été statistiquement significative (lot témoin :  $08.33 \pm 5.03$  vs  $11.4 \pm 7,16$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement).

## **CHAPITRE II**

### **EFFET DE LA RÉPÉTITION DU PRÉTRAITEMENT AVEC DE LA GNRH SUR LE RENDEMENT DE LA SUPEROVULATION.**

Cette partie de l'expérimentation comporte les opérations de récolte et conditionnement des embryons, elles ont été réalisées le 22<sup>ème</sup> jour après la mise en place des éponges vaginales, c'est-à-dire le 7<sup>ème</sup> jour après la saillie naturelle.

## **I-MATERIEL ET METHODES :**

### **I-1.Matériel:**

#### **I-1.1. Animaux :**

Les brebis utilisées sont les mêmes décrites dans le chapitre I (10 brebis donneuses de race Ouled Djellal).

#### **I-1.2. Instruments et produits :**

Les instruments et les produits utilisés sont les suivants :

- ❖ Sonde cannelée.
- ❖ Pince à champs.
- ❖ Bain marie.
- ❖ Tubes gradués (50ml).
- ❖ Champs de tissu.
- ❖ Flacons de récolte stériles.
- ❖ Rasoir et lame de rasoir.
- ❖ Pinces Bulldogs.
- ❖ Ciseaux et Forceps.
- ❖ Bistouri et lame.
- ❖ Seringues de 50ml.
- ❖ Porte-aiguille et aiguille de suture.
- ❖ Fil de suture non résorbable n°6, fil de suture résorbable " Vicryl décimale n°2 et 5 ".
- ❖ Sonde métallique à trois orifices.
- ❖ PBS.
- ❖ PGF2 $\alpha$  (Estrumate<sup>ND</sup>).
- ❖ Alcool iodé.
- ❖ Alcool chirurgical.
- ❖ Alluspray<sup>ND</sup>.
- ❖ Oxytetracycline injectable.

- ❖ Anesthésique local (Lidocaine<sup>ND</sup> 2%) et général (Rompun<sup>ND</sup>).
- ❖ Clamps vasculaires.
- ❖ Boîtes de pétrie carrées quadrillées.
- ❖ Petites boîtes de pétrie rondes.
- ❖ Une pipette en verre montée sur une seringue à insuline.
- ❖ Loupe binoculaire (Nikon<sup>ND</sup>) et microscope inversé (Hund<sup>ND</sup>).

## **I-2. Méthodes :**

### **I-2.1. Préparation des animaux :**

La préparation a commencé la veille du jour de récolte, et consiste à l'isolement et la mise en diète complète des brebis.

### **I-2.2. Récolte des embryons :**

Elle a été réalisée sept jours après la première saillie, par lavage des cornes utérines à l'aide d'une solution de PBS à 37°C. La récolte a été débutée après un examen endoscopique positif (présence de corps jaunes actifs et absence des adhérences).

#### **I-2.2.1. Préparation de la brebis :**

Après une contention de la brebis sur une table à plan inclinable, une tranquillisation a été réalisée par injection en IM de 0.1mg/kg de xylazine. L'anesthésie générale a été obtenue par l'administration en IV de 5.5mg/kg de kétamine .

La zone opératoire, s'étendant de la base de la mamelle à l'ombilic, a été nettoyée, rasée et désinfectée avec de l'alcool chirurgical et iodé. Ensuite le champ de tissu est fixé aux membres postérieurs.

#### **I-2.2.2. Technique de récolte :**

Après laparotomie sur la ligne blanche, les cornes utérines sont extériorisées par un forceps et les organites ovariens sont dénombrés. A l'aide d'un petit ciseau pointu, la corne utérine a été ponctionnée au niveau de la jonction utéro-tubaire et la sonde métallique munie d'un cathéter de collecte a été mise en place. Puis, 40ml de PBS à

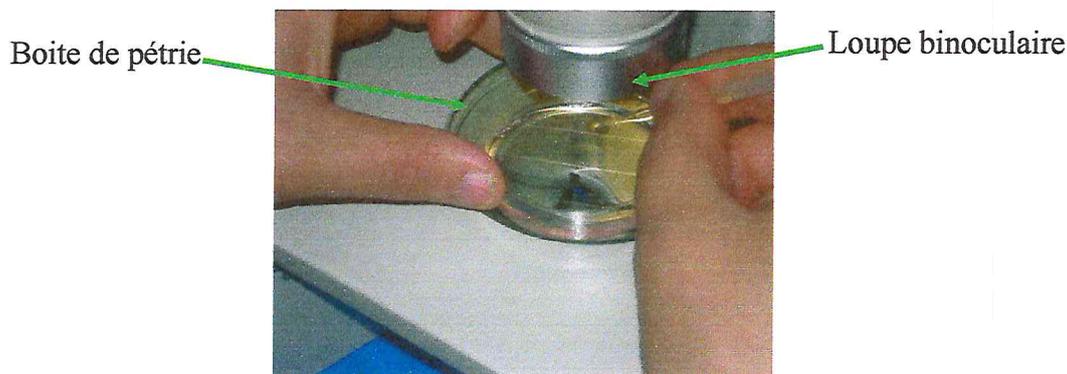
37°C ont été injectés à la base de la corne utérine (au niveau de la bifurcation), et le liquide est alors récupéré par la voie de retour dans un flacon en plastique stérile.

Après avoir retiré tout le matériel de collecte, une suture de la paroi abdominale a été effectuée par des points en croix avec le Vicryl<sup>®</sup> décimale 5, enfin la peau est suturée par des points simples avec du fil non résorbable (EP/6).

### I-2.3. Tri et sélection des embryons :

#### I-2.3.1. Recherche des embryons :

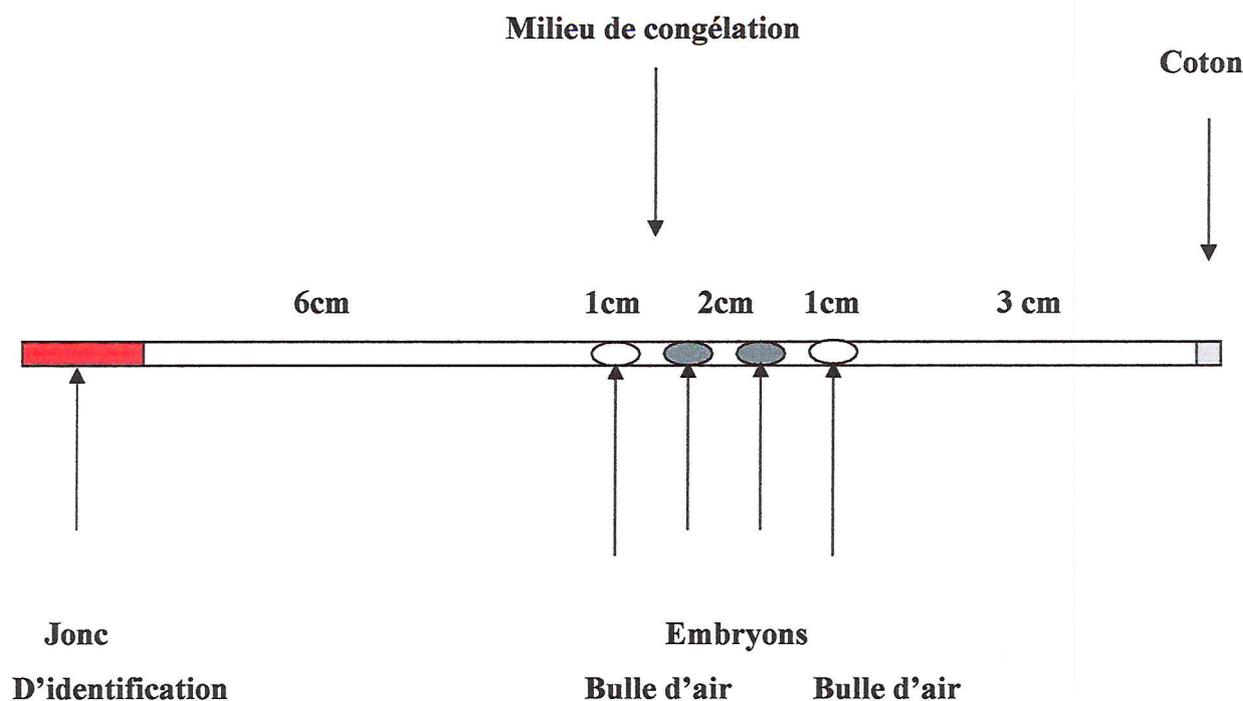
Dès la fin de la récolte, le flacon a été mis à décanter sur une surface stable, le surnageant été alors éliminé par siphonage, le reste du liquide a été versé dans une boîte de Pétri quadrillée pour procéder à la recherche des embryons, celle-ci est réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire (Cf. photo 3), les embryons ont été recherchés au grossissement ( $\times 40$ ), puis récupérés grâce à une micropipette, pour être déposés dans une petite boîte de Pétri ronde.



**Photo1 : Recherche des embryons sous une loupe binoculaire.**

#### I-2.3.2. Examen et conditionnement des embryons :

La qualité des embryons ainsi que leur stade de développement ont été déterminés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement $\times 60$ ), selon la nomenclature de l'IETS (1998). Dans un premier temps, les embryons à congeler (classe I et II) sont identifiés et lavés dans un milieu de conservation (milieu de conservation F1). Puis, les embryons sont conditionnés dans une paillette de 0.25ml (deux embryons par paillette (figure5)) dans un milieu de congélation à base d'éthylène glycol (IMV ZA 468 à 1.5 M d'éthylène glycol). La congélation a été réalisée à l'aide d'un biocongélateur programmable selon la méthode classique lente.

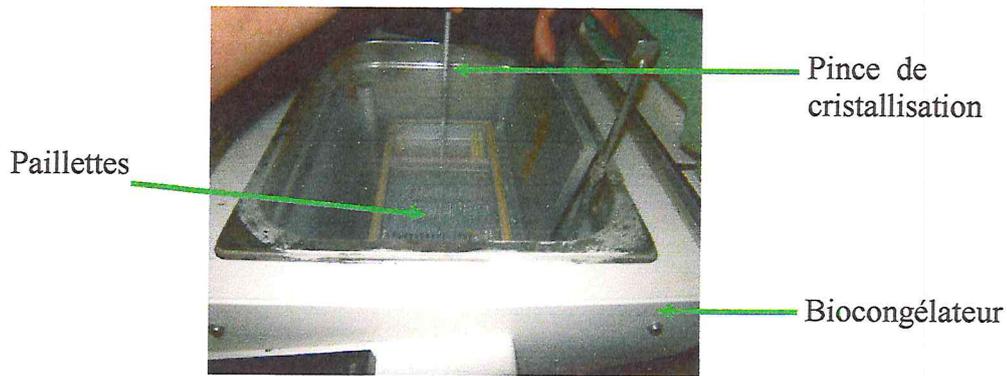


**Figure 3 : Schéma de montage des embryons en paillette pour une congélation.**

Après un temps d'équilibration de l'embryon en paillette dans la solution de cryoprotecteur, la méthode consiste à :

- Mettre de l'azote dans le coffret du biocongélateur.
- Mise en marche du biocongélateur, commutateur en AS.
- Transférer la paillette dans le coffret du biocongélateur et le refroidissement de l'embryon commence jusqu'à la température de  $-7^{\circ}\text{C}$  à raison de 1 à  $3^{\circ}\text{C}$  par minute.
- Maintenir l'embryon à  $-7^{\circ}\text{C}$  pendant 5 à 7 minutes pour stabiliser la paillette.
- Après avoir retiré la barre du seeding immergée dans l'azote liquide, procéder au seeding (cristallisation : Cf. photo 4) en appliquant la barre du seeding sur les paillettes des 2 extrémités.
- Passer le commutateur en PS, le refroidissement de l'embryon reprend pour une température de  $-30^{\circ}\text{C}$  à raison de  $0.3$  à  $0.6^{\circ}\text{C}$  par minute.
- A  $-30^{\circ}\text{C}$ , la paillette est plongée dans la cuve d'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$

Les embryons congelés sont transférés dans un container d'azote liquide.



**Photo 2 : Congélation des embryons: opération de la cristallisation.**

#### **I-2.4. Soins post-opératoires :**

Les brebis ont reçu pendant 3 jours des injections de pénicilline-streptomycine afin d'éviter les surinfections. Elles ont aussi reçu deux doses de PGF<sub>2</sub> à raison de 0,01mg/kg, le jour et le lendemain de l'intervention pour éviter toute éventuelle gestation. Des visites quotidiennes ont été faites pour s'assurer de l'état de santé des brebis et le bon déroulement de la cicatrisation des plaies et cela jusqu'à l'exérèse définitive des fils de suture non résorbables.

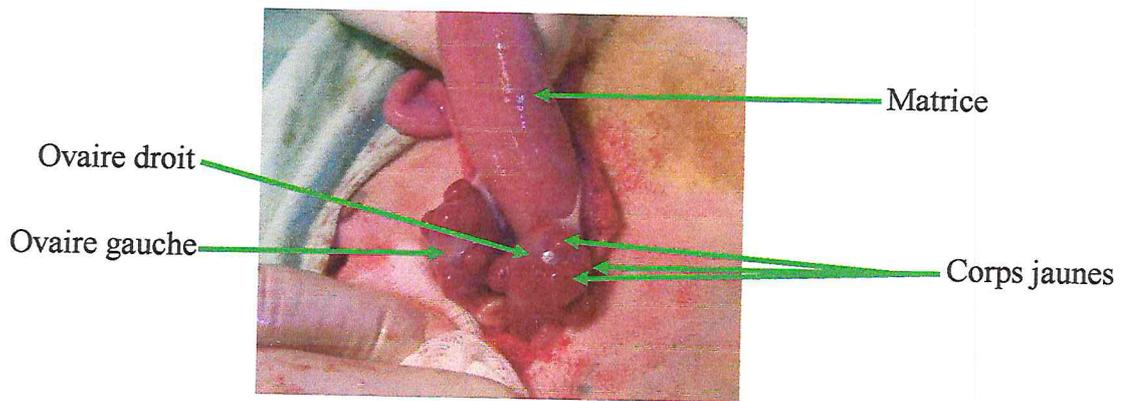
#### **II. ANALYSES STATISTIQUES :**

Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type, pourcentage. Pour la comparaison des moyennes, nous avons utilisé le test t de Student et le test de kh<sup>2</sup> (Logiciel SYSTAT, version 10).

#### **III - RESULTATS :**

##### **III -1. Dénombrement des corps jaunes :**

Le dénombrement des corps jaunes effectué sous endoscopie a été confirmé par extériorisation et examen des ovaires (photo 5).



**Photo 3 : Dénombrement des corps jaunes après extériorisation des ovaires.**

### III -2. Résultat de la récolte :

L'examen microscopique des liquides de récolte a révélé les résultats suivants :

#### III-2.1. Structures récoltées:

Les résultats de la récolte sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau IX : Structures récoltées chez les brebis du lot 1 et 2.**

Lots	Brebis	Nombre de structures Récoltées		Total /Moyenne ± écart type
		CD	CG	
Lot 1	B1	03	07	10
	B2	03	03	06
	B3	01	01	02
	Moyenne ± écart type	02,33±1.15	03,66±3.05	06±4
Lot 2	B4	02	02	04
	B5	06	05	11
	B7	01	00	01
	B8	01	02	03
	B10	03	09	12
	Moyenne ± écart type	2,6±2.07	3,6±3.50	6,2±4.96

Nos résultats montrent que chez les brebis du lot 1 et 2, le nombre moyen de structures récoltées est respectivement de 06±4 et 6,2±4.96.

**III-2.2. Taux de récolte :**

Les résultats relatifs aux taux de récolte des embryons sont rapportés dans les tableaux ci-dessous:

**Tableau X : Taux de récolte des embryons chez les brebis du lot 1 et 2.**

Brebis		Nombre de CJ	Nombre de structures récoltées	Taux de récolte (%)
Lot 1	B1	13	10	76.92
	B2	09	06	66.66
	B3	03	02	66.66
	Taux moyen			72
Lot 2	B4	10	04	40
	B5	16	11	68.75
	B7	3	01	33.33
	B8	7	03	42.85
	B10	21	12	51.14
	Taux moyen			54.38

Nos résultats montrent que chez les brebis du lot 1 et 2, le taux de récolte moyen est respectivement de 72 % et 54.38 %.

**IV- Classification des embryons :****IV-1. Qualité des structures récoltées :**

Les résultats de la classification des structures récoltées sont rapportés dans le tableau 09.

**Tableau XI :** Qualité des structures récoltées. Embryon dégénéré (D), Œuf non fécondé (NF),

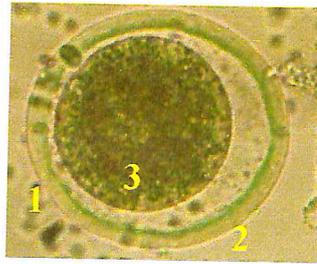
Brebis		Embryons				
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	
					D	NF
Lot 1	B1	05	03	01	01	00
	B2	03	02	00	01	00
	B3	01	00	00	00	01
Total		09	05	01	03	
Taux moyen (%)		50	27.78	5.55	16.67	
Lot 2	B4	03	01	00	00	00
	B5	06	02	02	01	00
	B7	01	00	00	00	00
	B8	02	00	01	00	00
	B10	06	02	03	00	01
Total		18	05	06	02	
Taux moyen (%)		58.07	16.13	19.35	06.45	

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que pour le :

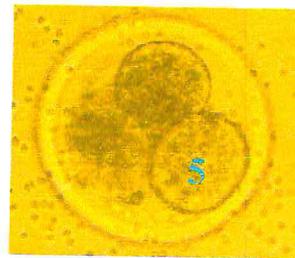
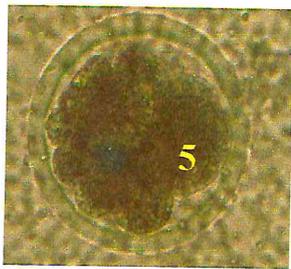
Lot 1: le taux des embryons de classe 1, 2,3, et 4 est respectivement de 50%, 27.78%, 5.55%, 16.67%.

Lot 2: le taux des embryons de classe 1, 2,3, et 4 est respectivement de 58.07%, 16.13%,19.35%, 6.45%.

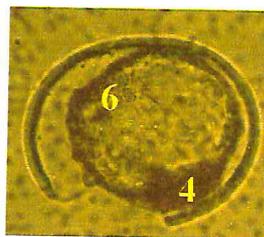
Les photos ci-dessous représentent des embryons de différentes classes :



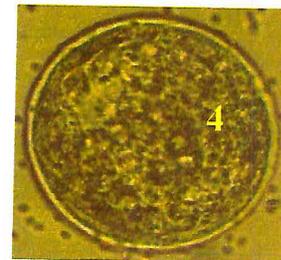
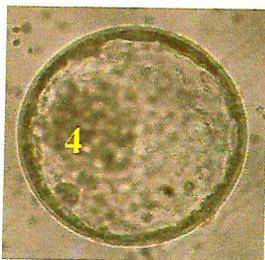
**Photo 4 : Ovocyte non fécondé de classe 4.**



**Photo 5 : Embryons dégénérés de classe 4.**



**Photo 6 : Blastocyste en expansion.**



**Photo 7 : Blastocystes de classe 1.**

(1) Zone pellucide ; (2) Espace périvitellin; (3) chromatine condensé;(4) Bouton embryonnaire. (5) Blastomères, (6) Trophoblaste, (7) Blastocœles.

**IV-2. Détermination du taux de fécondité :**

Les résultats du taux de fécondité sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XII : Taux de fécondité**

Lots	Structures récoltées		Taux de fécondité (%)
	Embryons	Ovocytes	
1	17	01	94.44
2	30	01	96.77
<b>Total</b>	47	02	95.91

Nos résultats montrent que le taux de fécondité est de :

- ❖ 94.44 % pour le lot 1.
- ❖ 96.77 % pour le lot 2.
- ❖ 95.91 % pour l'ensemble des brebis.

**IV-3. Détermination du taux des embryons transférables:**

Le tableau ci-dessous présente le taux des embryons transférables.

**Tableau XIII : Taux des embryons transférables**

Lots	Embryons Transférables		
	Nombre	Moyenne ± écart type	Taux (%)
1	15	05±4	83.33
2	29	05.8±4.43	93.54

Nous avons constaté que le taux d'embryons transférables est de:

- 83.33 % pour le lot 1.
- 93.54 % pour le lot 2.

**IV-4. Effet de la répétition du prétraitement sur le nombre de structures récoltées, taux de récolte, de fécondité et des embryons transférable :**

Les résultats taux de récolte, de fécondité, embryons transférable lors des différents traitements réalisés sont reportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XIV** : réponse ovulatoire chez les brebis du lot témoin, premier prétraitement et deuxième prétraitement.

<b>Lots</b>	<b>Nombre moyen des structures récoltées</b>	<b>Nombre moyen des Embryons transférables</b>	<b>Taux de récolte</b>	<b>Taux de fécondité</b>
<b>Lot 1 (Témoin)</b>	06±4	05±4	72	94.44
<b>Lot 2 1<sup>ier</sup> prétraitement</b>	09.83±3.97	09.33±3.93	57.28	98.30
<b>Lot 2 2<sup>ieme</sup> prétraitement</b>	06,2±4.96	05.8±4.43	54.38	96.77

Le traitement statistique des données a révélé que :

- ☒ Aucune différence n'a été observée entre le lot témoin et le lot 2 prétraité pour la deuxième fois en ce qui concerne : le nombre moyen des structures récoltées (06±4 vs. 06,2±4.96), le nombre moyen des embryons transférables (05±4 vs. 05.8±4.43), et le taux de fécondité (94.44%vs. 96.77%). Cependant le taux de récolte a été significativement différent entre les deux lots (72 % vs. 54.38 %,  $p \leq 0.05$ ).
- ☒ Chez les brebis du lot 2, le nombre moyen des structures récoltées et celui des embryons transférables tend être significativement plus faible lors du 2<sup>ieme</sup> prétraitement par rapport au 1<sup>ier</sup> prétraitement: (structures récoltées : 09.83±3.97 vs. 06,2±4.96,  $p = 0.09$ ), (embryons transférables : 09.33±3.93 vs. 05.8±4.43,  $p = 0.06$ ). Néanmoins aucune différence n'a été observée entre les deux traitements concernant, le taux de récolte (57.28 % vs. 54.38 %) et le taux de fécondité (98.30 % vs. 96.77 %).

# DISCUSSION

## I – EFFET DE LA REPETITION DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GnRH SUR LE COMPORTEMENT D’OESTRUS :

### I-1. Comportement d’œstrus :

#### I-1.1. lot témoin :

Nos résultats ont révélé que le taux de synchronisation de l’œstrus chez les brebis du lot 1 a été de 100% et le début d’œstrus a été observé en moyenne  $18.66 \pm 2,30$  h après le retrait d’éponge vaginale. Le début d’œstrus obtenu dans la présente étude a été précoce comparativement à celui décrit par José et *al.*, 2008 [100], qui rapportent une moyenne de 24h chez les brebis Pelibuey. En revanche notre résultat est semblable à celui rapporté par Baril et *al.*, 1992[101], où environ 85% des brebis de race Lacaune, traitées avec 20mg de FSHp, viennent en œstrus entre 16 et 28h après le retrait de l’éponge vaginale .

La durée d’œstrus obtenue dans le présent travail est en moyenne  $40,66 \pm 3,05$ h. Cette dernière est longue par rapport à celle décrite par WRIGHT et *al.*, 1976 [102] qui rapporte (34,4h), par contre elle est comparable à celle signalé par CORDIERO et *al.*, 2002 [103], ( $43 \pm 3.7$ h).

#### I-1.2. lots prétraités :

Nos résultats ont révélé que le début d’œstrus tend à être significativement précoce lors du premier prétraitement par rapport au deuxième prétraitement (1<sup>ier</sup> prétraitement :  $16 \pm 2,82$  vs  $19,2 \pm 1,78$ ; 2<sup>ieme</sup> prétraitement,  $p = 0.06$ ) et aucune différence n'a été observée entre le 2<sup>ier</sup> prétraitement et le lot témoin ( $19,2 \pm 1,78$  vs  $18.66 \pm 2,30$ ). La durée d’œstrus lors du 2<sup>ier</sup> prétraitement a été plus courte à celle du 1<sup>ieme</sup> prétraitement ( $40 \pm 5,65$  vs  $46,4 \pm 8,29$ h)

Les résultats obtenus dans la présente étude sont comparable à ceux décrits par Ben Said et *al.*, 2004 [97], qui ont rapporté un début d’œstrus de  $18 \pm 3.5$ h et  $21.6 \pm 3.5$ h après utilisation d’un agoniste de la GnRH. Aussi, la durée d’œstrus obtenue lors du prétraitement a été semblable à celle constatée par Lopez-Alonso et *al.*, 2003 [104], qui est de  $42.5 \pm 1.4$ h.

En effet, de nombreuses études (Torres et *al.*, 1987; Martemucci et *al.*, 1988 [105], Baril et *al.*, 1993 [05]) ont rapporté l’existence d’une relation étroite entre le début d’œstrus et le taux d’ovulation et par conséquent l’élévation importante du taux de sécrétion des œstrogènes, ce qui peut expliquer l’apparition précoce du comportement d’œstrus chez les brebis prétraitées (1<sup>ier</sup> prétraitement).

## II- EFFET DE LA REPETITION DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GnRH SUR LA REPOSE OVARIENNE :

### II-1. Lot témoin (lot 1) :

Dans la présent étude la réponse ovarienne obtenue chez les brebis du lot témoin est de  $8.33 \pm 5.03$  corps jaunes. Elle est proche de celle décrite par D'Alessandro *et al.*, 2005 [106]; José *et al.*, 2008 [100], qui rapportent une réponse de  $11.9 \pm 1.6$ CJ et  $10.73 \pm 1.42$ CJ respectivement.

Les différences dans les réponses de superovulation entre les races semblent être liées à la fois, à la préparation de FSH utilisée, la voie d'administration ou à la forte variabilité d'élimination de FSH décrite chez la brebis (McNeily 1987 [107]; Fry *et al.*, 1987 [108]; Ammoun *et al.*, 2006 [109]). Ces différences peuvent être aussi dues au fait que la FSH exogène été administrée avec la même dose à toutes les femelles indépendamment de leurs poids (Ammoun *et al.*, 2006 [109]).

La différence entre les races ovines peut être aussi en relation avec la prolificité de la race. Il a été constaté qu'après un traitement de superovulation, la réponse ovulatoire est très élevée chez les races suivantes : Romanov-Préalpes, Mérinos et de l'Ile de France que chez les brebis Préalpes et les brebis Romney Marsh (Torres et Cognié, 1984 [110]; Cognié *et al.*, 1986 [57]).

### II-2. lots prétraités (1<sup>ier</sup> prétraitement et 2<sup>ieme</sup> prétraitement):

Nos résultats montrent que le nombre moyen de corps jaunes tend à être significativement plus élevée lors du premier prétraitement par rapport au deuxième prétraitement (1<sup>ier</sup> prétraitement :  $17.60 \pm 6.01$  vs  $11.4 \pm 7.16$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement,  $p = 0.1$ ). De plus, nous avons constaté que comparativement au lot témoin la réponse ovulatoire a été plus élevée lors du 2<sup>ieme</sup> prétraitement (lot témoin :  $08.33 \pm 5.03$  vs  $11.4 \pm 7.16$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement).

Les résultats de la présente étude sont inférieurs à ceux obtenus par Cognié et Baril., 2002, qui ont obtenus des réponses ovariennes de  $20.6 \pm 10.2$  CJ et  $18.4 \pm 9.5$  CJ en utilisant un antagoniste de la GnRH. Par contre, ils sont légèrement supérieurs par rapport aux résultats de Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2003 [111], qui ont obtenus en moyenne  $9.6 \pm 0.9$ CJ après utilisation d'une dose unique d'anti-GnRH.

Nos résultats corroborent avec les résultats de Brebion et *al.*, 1992 [03]; Cognié et *al.*, 2003 [57], qui rapportent une augmentation de 50% de la réponse ovulatoire après utilisation d'un prétraitement à base d'agoniste ou d'antagoniste de GnRH lors du 1<sup>er</sup> prétraitement. En revanche, cette réponse diminue lors 2<sup>ème</sup> prétraitement.

Il est à noter qu'il existe une variabilité de la réponse ovarienne individuelle qui peut être attribuée à l'importance du taux de la réserve ovarienne en follicules primordiaux au moment où commence la stimulation exogène. Selon Monniaux et *al.*, 1983 [112]; Cognié et *al.*, 2003 [57]; Veiga – Lopez et *al.*, 2005 [113], il y a une forte corrélation entre la population folliculaire totale avant la superovulation et le nombre de structures lutéales dénombrées après le traitement de superovulation. En effet, le prétraitement avec de la GnRH modifie l'état de la population folliculaire par inhibition de la croissance folliculaire terminale (réduction du nombre de gros follicules) et augmentation du nombre de petits follicules [03] et [57], ce qui peut expliquer la différence de la réponse entre les lots de brebis prétraitées et non prétraitées dans la présente étude. Ainsi, la diminution de la réponse ovarienne lors du 2<sup>ème</sup> prétraitement peut résulter d'un développement d'anticorps anti fshp suite à l'induction répétée de la superovulation comme rapporté par Cognié et Baril (2002) [20].

### **III- EFFET DE LA REPETITION DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GnRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, TAUX DE FECONDITE ET LA QUALITE DES EMBRYONS :**

#### **III-1. Taux de récolte :**

##### **a. lot 1 (témoin) :**

Le taux de récolte obtenu chez les brebis non prétraitées (lot 1) est de 72% ce qui est supérieur par rapport aux résultats de Simonetti et *al.*, 2008 [114]; Leoni et *al.*, 2001 [115], qui rapportent des taux de 60.6% et 59.9% chez les races Corriedale et Sarda respectivement. Ainsi, notre résultat est nettement supérieur par rapport à celui rapporté par Rexroad et Powell (1991) [116], qui est de 39.4%. En revanche, ce taux est inférieur à celui décrit par D'Alessandro et *al.*, 2005 [106], qui rapportent des taux de 87.5±8.5% et 91.30% respectivement.

### b. lots prétraités :

Chez les brebis prétraitées, aucune différence n'a été observée entre les deux traitements concernant, le taux de récolte (2<sup>ième</sup> prétraitement : 54.38% vs 57.28% : 1<sup>ier</sup> prétraitement). Cependant, le taux de récolte obtenu chez le lot témoin est supérieur par rapport à celui obtenu dans le deuxième prétraitement (72 % vs. 54.38 %,  $p \leq 0.05$ ).

Notre résultat est proche de celui obtenu par Ben Said et *al.*, 2004 [97], qui ont rapporté un taux de 64%. Par contre, le taux obtenu dans la présente étude est inférieur à celui décrit par Cognié et Baril, 2002 [20], qui après utilisation d'un antagoniste de GnRH, rapportent des taux de récupération de 76% et 68% respectivement. De même notre résultat est nettement inférieur par rapport à celui obtenu par Gonzalez-Bulnes et *al.*, 2003 [111], qui trouvent un taux moyen de  $81.4 \pm 19.3\%$  après utilisation d'une dose unique d'antagoniste de GnRH. Le faible nombre d'œufs collectés obtenu chez les brebis prétraitées pourrait être due à des échecs dans le processus d'ovulation ou une altération lors du transport d'embryon de l'oviducte à l'utérus [113]. En effet, lors d'utilisation de traitements associant les progestagènes à la FSH, ces effets pourraient être exacerbés et les hauts niveaux de progestérone circulants induits pourraient détériorer le transport d'embryons à travers le tractus génital [117] et expliquer les différences entre les taux de récupérations à partir de l'oviducte et l'utérus [111].

## III-2. Taux de fécondité :

### a. lot 1 (témoin):

Le taux de fécondité obtenu chez le lot 1 est de 94.44 %, ce résultat est semblable à ceux décrits par Baril et *al.*, 2004 [06] et Yamada et *al.*, 1996 [118] qui ont obtenu des taux de fécondité de 90%, 92.9% respectivement. Cependant, notre résultat est supérieur par rapport à ceux obtenus par D'Alessandro et *al.*, 2005 [106]; Rexroad et Powell, 1991 [116]; Ramon-Ugald, 2008 [119], qui rapportent des taux de  $55.8 \pm 10.9\%$ , 64.3% et 64.2% respectivement.

### b. lots prétraités :

Chez les brebis prétraitées, aucune différence n'a été observée entre les deux traitements concernant, le taux de fécondité (2<sup>ième</sup> prétraitement : 96.77% vs 98.30 : 1<sup>ier</sup> prétraitement). Le taux de fécondité obtenu dans la présente étude (96.77%) est comparable à celui obtenu par Gonzalez-Bulnes et *al.*, 2003 [111], qui après utilisation d'une dose unique d'antagoniste

de GnRH obtiennent 100%. Toutefois, ce taux est légèrement supérieur à celui obtenu par Cognié et Baril, 2002 [20], qui ont décrit un taux de 90% en utilisant un traitement de 11 injections d'antagoniste de GnRH.

En effet, le taux de fécondation élevé obtenu dans notre travail chez les brebis superovulées avec ou en absence de prétraitement, pourrait être lié à l'utilisation combinée, au moment optimal, de la saillie et l'insémination intra-utérine [25]. Dans le cas du prétraitement avec de la GnRH, le taux de fécondation élevé pourrait aussi être lié à la bonne synchronisation des ovulations comme rapportées par les travaux de Cognié et *al.* (1999, 2003) [120] et [09]. De plus, le dépôt de la semence directement dans les cornes utérines sous contrôle laparoscopique chez les brebis superovulées, réduit les altérations massives des conditions de survie des spermatozoïdes lors de leur passage à travers le cervix [22].

### III-3. Qualité des embryons récoltés :

Aucune différence significative n'a été observée entre le lot témoin et le lot 2 prétraité pour la deuxième fois en ce qui concerne : le nombre moyen des structures récoltées ( $06 \pm 4$  vs.  $06,2 \pm 4,96$ ), le nombre moyen des embryons transférables ( $05 \pm 4$  vs.  $05,8 \pm 4,43$ ). Cependant, le nombre moyen des structures récoltées et celui des embryons transférables tend être significativement plus faible lors du 2<sup>ème</sup> prétraitement par rapport au 1<sup>er</sup> prétraitement: (structures récoltées :  $09,83 \pm 3,97$  vs.  $06,2 \pm 4,96$ ,  $p = 0,09$ ), (embryons transférables :  $09,33 \pm 3,93$  vs.  $05,8 \pm 4,43$ ,  $p = 0,06$ ).

Ces résultats montrent que non seulement, le prétraitement avec de la GnRH augmente le nombre des embryons transférables, il n'affecte pas la qualité des embryons récoltés, ce qui offre une similitude avec les observations décrites dans des études précédentes [120] et [97].

# CONCLUSION

Les méthodes de biotechnologie de la reproduction en particulier la superovulation et le transfert embryonnaire (MOET), sont des outils indispensables pour la mise en œuvre des programmes de conservation des espèces qui sont en voie de disparition, comme elles sont des méthodes de choix qui permettent d'accélérer les progrès génétiques. Chez les ovins, la variabilité de la réponse ovulatoire des donneuses reste un facteur limitant du développement du transfert embryonnaire. Néanmoins, un prétraitement par agoniste de GnRH semble améliorer la production d'embryons in vivo.

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que le nombre moyen de corps jaunes tend à être significativement plus élevée lors du premier prétraitement par rapport au deuxième prétraitement (1<sup>ier</sup> prétraitement :  $17.60 \pm 6.01$  vs  $11.4 \pm 7.16$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement,  $p = 0.1$ ). De plus, comparativement au lot témoin la réponse ovulatoire a été plus élevée lors du 2<sup>ieme</sup> prétraitement (lot témoin :  $08.33 \pm 5.03$  vs  $11.4 \pm 7.16$  : 2<sup>ieme</sup> prétraitement).

Chez les brebis prétraitées, aucune différence n'a été observée entre les deux traitements concernant, le taux de récolte (2<sup>ieme</sup> prétraitement : 54.38% vs 57.28% : 1<sup>ier</sup> prétraitement). Cependant, le taux de récolte obtenu chez le lot témoin est supérieur par rapport à celui obtenu lors du deuxième prétraitement (72 % vs. 54.38 %,  $p \leq 0.05$ ).

Aucune différence significative n'a été observée entre le lot témoin et le lot prétraité pour la deuxième fois en ce qui concerne : le nombre moyen des structures récoltées ( $06 \pm 4$  vs.  $06,2 \pm 4.96$ ), le nombre moyen des embryons transférables ( $05 \pm 4$  vs.  $05.8 \pm 4.43$ ). Cependant, le nombre moyen des structures récoltées et celui des embryons transférables tend être significativement plus faible lors du 2<sup>ieme</sup> prétraitement par rapport au 1<sup>ier</sup> prétraitement: (structures récoltées :  $09.83 \pm 3.97$  vs.  $06,2 \pm 4.96$ ,  $p = 0.09$ ), (embryons transférables :  $09.33 \pm 3.93$  vs.  $05.8 \pm 4.43$ ,  $p = 0.06$ ).

A la lumière des résultats obtenus, il en ressort que malgré l'amélioration de la réponse ovarienne observée lors prétraitement avec de la GnRH, une réduction de la réponse ovarienne et un très faible rendement de production d'embryons ont été constatés suite à la répétition de ce prétraitement. Il s'avère donc nécessaire de réaliser d'autres travaux afin d'apporter des explications à ce faible rendement obtenu lors de la répétition du prétraitement par un agoniste de la GnRH.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

01. **Atchemdi K.A. [2008]**. Impact des variations climatiques sur les prix des moutons sur le marché de gros de Djelfa (Algérie). *Cahiers Agricultures*, 17, 29-37.
02. **Brebion P., Bekers., Guerrin Y., Boomarov. [1991]**. High performane of boorola ×Romano ees as permanat embryo donors.In colloque INRA, major genes for reproduction in sheep. Colloque INRA n°57171-174, Edition INRA, Paris .
03. **Brebion P., Baril G., Cognie Y., Vallet J.C. [1992]**. Embryo transfer in sheep and goats. *Ann. Zootech.*, 41, 331-339.
04. **Tervit H.R., Gloud P.G. [1984]**. Deep-freezing sheep embryos. *Theriogenology*, 21 :268 abstr.
05. **Baril G., Brebion P., Chensé P. [1993]**. Manuel de formation pour le transfert embryonnaire chez la brebis et la chèvre. FAO, 115, ISSN 1014-1099.
06. **Baril G., ET Cognie. Y. [2004]**. Effet de prétraitement agoniste et antagoniste de GnRH sur la production d'embryons chez la brebis et la chèvre. *Renc.Rech.Ruminant*, 11.
07. **Lopez –Alonso., T. Encinas., A. Veiga-Lopez., R.M. Garcia-Garcia., M.J. Cocero B., J.M. Ros., A.S. Mcneilly., A. Gonzalez-Bulnes. [2005]**. Follicular growth, endocrine reponse and embryo in sheep superoulated with à single short-ating dose of GnRH antagonist ; *Theriogenology* 6G ).
08. **Brebion P., Cognié Y.[1989]**. 5ème Réunion AETE-Lyon, 8-9 septembre 1989, Abstract 106.
09. **Cognie Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P. [2003]**. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*; 59:171–88.
10. **Clement. [2006]**. Production et transfert d'embryons in vivo chez la chèvre de race boer, Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
11. **Gordon I. [1975]**. Hormonal control of reproduction in the sheep. *Proc. Br. Soc. Anim. Prod.* 4:79-93.
12. **Hansel w ., Convey E.M. [1983]**. Physiology of the estrus cycle. *J. Anim. Sci. Suppl.* 2, 5, 404-412.
13. **Courot M. Volland-Nail P. [1991]**. Productions animales. INRA Février 1991 volume 4 N° 1. Pages : 22, 23.
14. **Whitely NC., Jackson DJ. [2004]**. An update on oestrus synchronisation in goats: a minor species . *Journal of animal science*, p270-276.
15. **Walker S.K., Smith D.H., Seamark R.F. [1986]**. Timing of multiple ovulation in the ewe after treatment with FSH or eCG with or without GnRH, *J. Reprod. Fertil.* 77 : 135-142.

16. **Casamitijana P. [2006].** Synchronisation de la reproduction chez les ovins. Société Nationale Des Groupements Techniques vétérinaires, Fiche n°22.
17. **Hanzen C. [2009].** Maîtrise du cycle des petits ruminants. Université de Liège, Belgique, Cours de l'année.
18. **Chupin D. [1988].** Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. *Coli Soc Fr Etudes Fertil* 26, 2 13-232.
19. **Henzen. [2000].** « propédeutique et pathologie de la reproduction male et femelle » 2<sup>ème</sup> doctorat en médecine vétérinaire.
20. **Cognie Y., G. Baril [2002].** Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre ; *INRA, Prod. Anim.*, 15 (3), 199-207, *Physiologie de la Reproduction et des Comportements*, 37380 Nouzilly.
21. **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.
22. **Evans G., Armstrong D.T. [1984].** Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fertil*, 70 :47-53.
23. **Baril G., Vallet J.C. [1990].** Time of ovulation in dairy goats induced to superovulate with pFSH during and out of the breeding season. *Theriogenology*, 34 : 303-311.
24. **Evans G., Maxwell Wmc. [1987].** saramon s artificial insémination of cheep and gaots Sydney butterworths.
25. **Bari FY., Khalid M., Haresign W., Merrell B., Murray A., Richards RIW. [1999].** An evaluation of the success of MOET in two breeds of hill sheep maintained under normal systems of hill flockmanagement. *Anim Sci*;69:367-376.
26. **Vallet J.C., Casamijana P., Brebion., Perrin J. [1991].** Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryon chez les petits ruminants. *Recueil de médecine vétérinaire*, 167 :293-301.
27. **Mylne M.J.A., Mckelvey W.A., C Fernie K., and Matthews K. [1992].** Use transcervical technique for embryo recovery in sheep. *The Veterinary Record*, 16:450-451.
28. **Coorod S. A., Bowen J., Kraemer D. [1984]:** C. Non-surgical collection of ovine embryos. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> Ann. Convention of the American Embryo transfer. Assoc*,83-87.
29. **Youngquist R.S. [1997].** *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 1st edition. Philadelphia : WB Saunders Company ; 898p.

30. **Heymann,[1988]**. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod Biomed Online*. Jun;8(6):635-43.
31. **Guérin et al. [1996]**. MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER IN GOATS ; BY KHOBOSO CHRISTINA LEHLOENYA ; A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree ; PHILOSOPHAE DOCTOR ; In The Faculty of Natural And Agricultural Sciences ; Departement of Animal, Wildlife And Grassland Sciences ; University of The Free State Bloemfontein ; February 2008.
32. **Guignot F. [2005]**. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques, INRA, unité mixte de recherche physiologie, de la reproduction et de comportement, 37380 Nouzilly, INRA, Prod. Anim., 2005, 18 (1), 27.-35.
33. **Cognie Y. [1999]**. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51 :105-116.
34. **Gouhis. [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.
35. **Armstrong D.T., Evans G. [1983]**. Factors influencing success of embryo transfer sheep and goats, *Theriogenology*.19.p31-42.
36. **Torres S., Cognie Y., Colas G. [1984]**. Transfer of des embryons chez les ovins, IX journées de la recherche ovine et caprine, Edition INRA-Tovic-Spec, paris.215-239.
37. **Castongauy F., Dufour J.J., Laforest J.P., Deroy L.M. [1996]**. synchronisation de l'oustrus chez la brebis avec un analogue de la GnRH. *Recherche sur les ruminants*, 4-5.
38. **Forcada F., Abecia JA., Lozano JM. [2000]**. Repeated superovulation of height prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high quality embryos. Departamento de production animal y ciencia de los alimentos Universidad de Zaragoza Spain.
39. **Simonetti L., Forcada F., Rivera E.A., Carou N., Alberio R.H., Abecia J.A., Palacine. [2007]**. Simplified superovulatory treatments in corriedale ewes. Animal production school of agrarian science, National University of Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentine.
40. **Bartlewski P M., B D Alexander 1., W A King. [2007]**. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes ; department of biomédical sciences, ontario vétérinaire college, university of Guelph, Guelph, ontario NIG 2 WI, canada.

41. **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.
42. **Gibbons A., M I Cueto. [1995].** Transfencia de embriones en ovinos y caprinos. INTA EEA Regional Patagonia Norte.
43. **Gonzalez-Bulnes a., Santiago-Morino J., Cocero M., Souza C., Groom N., Garcia R., [2002].** Measurement of inhibin A and follicular status predicts the response of ewes to superovulatory FSH treatments. Theriogenology;57:1263-72.
44. **Bartelwski PM., Alexander BD., KING WA. [2008].** Ovarien and endocrine determinants of superovulatory responses in anoestrus ewes, departement of biomedical scienses, university of Guelph, Canada. Small Ruminants Research 75 210-216.
45. **Rubianes E., Menchaca A. [2003].** The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in gaots. Animal Reproduction Science, 78,217-287.
46. **Coop I.E. [1966].** Effet of Flushing on productive performances of ewes .J. Agri. Camb, 67 :305-323.Canaria, Spain and Physiology of Reproduction, Faculty of veterinary médecine, Liège, Belgique 2001.
47. **Khalidi G. [1984].** Variation saisonnière de l'activité ovarienne, du comportement d'œstrus et de la durée de l'anoestrus post-partum des femelles ovines de race Barbarine : influence du niveau alimentaire et de la présence de male. Thèse de doctorat d'état des sciences. Academie de Montpellier.
48. **Jabbour., H.N., Evans G. [1991].**Ovarian and endocrine reponse of merinos ewes to traitement with PMSG and/or FSHp. Anim.Reprod.Sci.26,93-106.
49. **Baril G., Casamitijana P., Perrin J., Vallet J.C. [1989].** Embryo production, freezing and transfer in angora, Alpine and Saanen goats. Zuchthgienne (berl).24,1001-115.
50. **Cognie. Y. [1984].** Comparaison de deux traitements de superovulation chez la brebis cité par J.C Vallet., Casamitijana.
51. **Ware C.B et Coll . [1985].** Research report. University College, Dublin.
52. **Moore N.W. [1974].** Multiple ovulation and ovum transfer in the goats. Proc. Aust. Anim. Prod., 10, 246.
53. **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.
54. **Bono. G., Caroli. F., Tamanini C., Abratel L. [1983].** Progesterone, oestrogen, LH, FSH, and PRL concentrations in plasma during the oestrus cycle in goat. Reprod. Nut. Devel., 23, 2 17-222.

55. **Murphuy B.D. [1984].** Viability in gonadotrophin preparation as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21 n°1, 117-125.
56. **Gonzalez Strangnaro C. [1984].** Reproduction des ruminants en zones tropicale. Colloque de l'INRA, 20 : 1.
57. **Cognie Y., Chupin D., Saumande J. [1986].** The effect of modifying the FSH/LH ration during the superovulatory treatment in ewes. *Theriogenology*, 25 (N°1), 186, 148.
58. **Huhtinen M., Rainio V., Aalto J., Bredbacka P., Maki-Tanila A. [1992].** Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. – *Theriogenology*, 37: 457- 463.
59. **Bungartz L., Niemann H. [1994]** Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy suitable for superovulation by a single ultrasound examination. – *J.Reprod.Fert.*, 101 : 583-591.
60. **Laurière. [2002].** Etude des facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache charolaise en clientele.
61. **Bister J.L. [2002].** FUNDP CRO Laboratoire de physiologie animale.
62. **De Ruigh L., Mulaart E. [1999].** Removal of dominant follicle of heifers prior .
63. **Ede P., Florin B., Khodja S., Ponsart C., Humblot P. [1999].** Effect of the puncture of the largest follicle on embryo yield after superovulation in dairy cattle. – *In : Proceedings 9<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 10-11 septembre 1999* : 148.
64. **Shaw D.W., Good T.E. [2000].** Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. – *Theriogenology*, 53 : 1521-1528.
65. **Bo G.A., Adams G.P., Caccia M., Martinez M., Pierson R.A., Mapletoft R.J. [1995].** Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. – *Anim.Reprod.Sci.*, 39 : 193-204.
66. **Yaakub H., O'callaghan D., Duffy P., Roche J.F., Boland M.P. [1996].** Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to treatment with gonadotrophin on superovulation, embryo yield and quality in beef heifers. - *In : Proceedings 12<sup>th</sup> AETE meeting, Lyon, 13-14 septembre* : 214.
67. **Kessler. [2001].** perspective d' utilisation des administrations chroniques d' agonistes et d'antagonistes de la GnRH en medecine veterinaire .
68. **Beffara. [2007]** Comparaison de l'efficacité du traitement de synchronisation des chaleurs Crestar□ classique avec celle d'un nouveau traitement combinant buséréline, implant Crestar□, prostaglandine F2α et eCG chez la vache allaitante.

69. **Germain.** [2009]. La double ovulation chez la vache.
70. **Beattie JL.** [1982]. Hypophysiotropic Releasing-Inhibiting Hormones. In Zaneled (LJD) and coll., Biochemistry of mammalian reproduction. 1ère Ed., JOHN WILEY and sons, NEW YORK. 287-296.
71. **King JA., Millar RP.** [1980]. Comparative aspects of LHRH structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology*, 106, 707-717.
72. **CHENAULT JR, KRATZER DD, RZEPKOWSKI RA, GOODWIN MC.** [1990]. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology*, 34, 81-98.
73. **Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ.** [1995]. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *J Anim Sci*, , 73, 3141-3151.
74. **Mee Mo, Stevenson JS, Alexander BM, Sasser RG.** [1993]. Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17 beta, pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and in vitro production of progesterone in dairy cows. *J Anim Sci*, 71, 185-98.
75. **Larson SF, Butler WR, Currie WB.** [1997]. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J Dairy Sci*, 80, 1288-1295.
76. **Clayton RN.** [1989]. Gonadotrophin-releasing hormone: its actions and receptors. *J. Endocrinology*, 120, 11-19.
77. **Hazum E., Conn PM.** [1988]. Molecular mechanism of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) action. I. the GnRH receptor. *Endocrine Reviews*, 9, 379-384.
78. **Kovacs M., Schally AV., Csernus B., Rekasi A.** [2001]. LHRH antagonist cetrorelix down regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LHRH by unreacting the stimulatory effect of endogenous LHRH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 1829-1834.
79. **SCHALLY AV, COMARU SCHALLY AM.** [1997]. Rational use of agonists and antagonists of LHRH in the treatment of hormone-sensitive neoplasms and gynaecologic conditions. *Advanced Drug delivery Reviews*, 28, 157-169.
80. **Chien YW.** [1992]. Systemic delivery of peptide-based pharmaceuticals, in: J. Swarbrick (Ed.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* 50, Novel Drug Delivery Systems, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 631-745.
81. **Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, Ziegler D, Taieb J, Selva J, Frydman R.** [1994]. The single or dual administration of the GnRH antagonist Cetrorelix in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertility and Sterility*, 62, 468-476.

82. **Dippert K.D., Hofferer S., Palmer E., Jasko D.J., Squires E.L. [1992].** Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary. *Theriogenology*, 38, 695-710.
83. **Scoggin C.F., Meira C., McCue P.M., Carnevale E.M., Nett T.M., Squires E.L. [2002].** Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology*, 58, 151-164.
84. **Guillaume D., Bruneau B., Briant C. [2002].** Comparison of the effects of two GnRH antagonists on LH and FSH secretion, follicular growth and ovulation in the mare. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42, 251-264.
85. **Briant C., Ottogalli M., Morel M., Guillaume D. [2003].** Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 24, 305-322.
86. **Briant C., Ottogalli M., Guillaume D. [2004].** Attempt to Control of the day of ovulation in cyclic pony mares by associating a GnRH antagonist with hCG. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 27, 165-178.
87. **Kohram H., Bousquet D., Durocher J., Guilbault L.A. [1998].** Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. *Theriogenology*. 49, 1165-1174.
88. **Laizeau. [2003].** Facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache laitière de race monbéliarde.
89. **Brebion.P, Beckers JF, Guerin Y, Boomarov. [1990].** High performance of Booroola x Romanov ewes as permanent embryo donors. In colloque INRA, major genes for reproduction in sheep.
90. **Briois M., Belloc J.P., Brebion P., Guerin Y., Congnie Y. [1992].** 8th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1,132 (Abstract).
91. **Briois M., Belloc J.P., Evans g., Guerin Y, Cognie Y. [1993].** 9th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1,162 (Abstract).
92. **Fishel SB., Edwards RG., Purdey JM., Steptoe PC., Webster J., Walters E., Cohen J., Fehilly C., Hewitt J., Rowland G. [1985].** Implantation, abortion, and birth after in vitro fertilization using the natural menstrual.
93. **Ricordeau G., Bouillon J., Gaillard A., Lajous A., Lajou D. [1984].** Modalité et caractéristiques de la reproduction chez les caprins. Aspect génétique. *B.T.I.*, 391, 367-383.
94. **Frydman R., Cornel C., De Ziegler D., Taieb J., Spitz IM., Bouchard P. [1991].** Prevention of premature luteinizing hormone and progesterone rise with a GnRH antagonist Nal-Glu in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*, 56: 923-27.

95. Frydman R., Cornel C., DE Ziegler D., Taieb J., Spitz IM, Bouchard P. [1992]. Spontaneous LH surge can be reliably prevented by the timely administration of a GnRH antagonist (Nal-Glu) during the late follicular phase. *Hum Reprod*; 7: 930-33.
96. Baril G., Pougnaud J.L., Freitas V.F.J., Leboeuf B., Saumande J. [1996]. A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotrophin surge in superovulated goats. *Therio.*, 45 : 697-706.
97. Ben Said S, Touze, J.L. Baril, G. Beckers, J.F et Cognié, Y. [2004]. Long-term exposure to GnRH agonist does not modify the sheep ovarian response to a superovulation FSH treatment. Proceedings of the Symposium on Reproduction in Small Ruminants .Reproduction Fertility and Development, 16 (4) 510.
98. Khan [ 1994]examen échographique de la brebis et de la chèvre.In: Atlasde diagnostic échographique.Edition maloine, paris,186-210.
99. Bellahoues M, Harrounine N [2010]. Effet de la dose de FSHp et d'un prétraitement par un agoniste de GnRH sur la production d'embryons chez la brebis de race Ouled Djellal.
- 100.José H.C., J. Ricardo Ake Lopez, Juan Carlos K.V., Gary L.W., Jorge Alfredo Q.F. [2008]. Repuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con acidos grasos poliinsaturados. *Tec Pecu Méx.*, 46 (2) :107-117.
101. Baril G., Remy B., Leboeuf B., Vallet J.C., Beckers J.F., Saumande J. [1992]. 8th Sci. Meet. of Europ. Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 126(Abstract).
- 102.Wright, Rw.Jr. ,G.B. Anderson. , P.T. Cupps . ,M. Drust and G.E Bradford. [1976]. In vivo culture of embryos from adult and preubertal ewes .*J.Amitos. Sci.*42.912.
- 103.Cordeiro MF., Lima-Verde JB., Lopes-Junior ES., Teixeira IA. [2002]. embryo recovery rate ewes subjected to succissive superovulatory treatments with pFSH. Laboeratory of physiologie and control of reproduction, faculty of veterinary, state university, of Ceara, Avenue Paranjana 1700, Fortaleza CE 60740-000.
- 104.Lopez-Alonso C, Encinas T, Garcia-Garcia RM, Veiga-Lopez A, Ros JM, Gonzalez-Bulnes A. [2003]. Modification of follicular status in sheep treated with single short-acting doses of GnRH antagonist. *Reprod Abstr*; 30:71 [abstract].
- 105.-Martemucci G, Totoda F, Manchisi A, Lacalandra G, Gambacorta M. [1988]. Risposta al trattamento di superovulazione con PMSG in pecore di razza Gentile di puglia e altamura fecondità successiva a trapianto di embrioni. *Zoot. Nutr. Anim.* 14 :165-172.
106. D'Alessandro A.G, Martemucci G, and Taibi L. [2005]. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the pFSH administration treatment regimen, and

insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, volume 63, Issue 6, 1764-1774.

107. **Mc Neilly, A.S., Fraser, H.M., [1987].** Effect of gonadotrophin releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J Endocrinol* 115, 273–282.

108. **Fry R.C., Clark I. J., Cummins J.T., Bindon B.M., Piper, L. R., Cahill L.P. [1987].** The half life of follicle stimulating hormone in ovary intact and ovariectomized Boorola and control Merino ewes. *J. Reprod. and Fert*, 82: 611-615.

109. **Ammoun, I., T. Encinas., A. Veiga-Lopez., J. M. Ros., I Contreras., P.Gonzalez-Anover., M. J. Cocero., A. S. MC Neilley., And A. Gonzalez-Bulnes. [2006].** Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. *Theriogenology* 66:896-905.

110. **Torres S., Cognie Y., Colas G. [1984].** Transfert des embryons chez les ovins. IX journées de la recherche ovine et caprine, Ed .INRA-Tovic-Spec, Paris, 215-239.

111. **Gonzalez-Bulnes A., Rosa Mari GG., Vanesa C., Julian S., Carmen A., Veronica D., Antonio L., Jesusa F., Tresguerres, Mari J. [2003].** Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in réponse to superovulatory FSH treatments in ewes. *Dept de reproduction animal, INRA, AVDA. Reprod. Nutr. Dev.*43, 17-28 17 INRA, EDP Science.

112. **Monniaux D., Chupin D., Saumande J. [1983].** Superovulatory responses of cattle. – *Theriogenology*, 19: 55-81.

113. **Veiga-Lopez A., Gonzalez-Bulnes A., Garicai-Garicai R.M., Dominguez V., Cocero MJ. [2005].** The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, 63,1973—1983.

114. **Simonitti.LF. Forcarda O.E; Rivera N, Carour.H; Alberio J, A.Abecia., I.PALACIN. [2008].** Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes; *Animal production. School of agrarian sciences, National University of Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentine; Animal Reproduction Science* 104 227—237.

115. **Leoni G. Bogliolo L., Pintus P., Ledda S., Naitana S. [2001].** Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.*41 :239-246.

116. **Rexroad JR C. E., and A. M. Powell L. [1991].** FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *J Anim Sci* 69:246-251.

117. **Crisman, R.O., McDonald, L.E., Thompson, F.N., [1980] .** Effects of progesterone or estradiol on uterine tubal transport of ova in the cow. *Theriogenology*13,141–54.

118. Aki Yamada[1996], Mayuko K, Yoshio T, Aio M and Yuak FU ; Effect of single or multiple injection of follicle stimulating hormone combined with pregnant mare serum gonadotropine on superovulatory response, and normal and freeable embryo in wethers. Laboratory of animal genetic and reproduction, Hiroshima University of agriculture and veterinary medicine, 080, Japan. Journal of reproduction and development, vol. 42, No 2.

119. Ramon-Ugalde JP, Folch J, Cocero MJ, Pina-Aguilar RE, Alabart JL. [2008]. Centre of ovine selection and reproduction, technical institute of Conkal, Yucatan, Mexico.

120. Cognié Y. [1999]. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology, 51 (1), 105-116.