

479THV-2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA

Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques

Département des sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Docteur
vétérinaire

Thème :

**Essai de transfert des
embryons congelés chez la
brebis race Hamra et Ouled
Djellal**

Présenté par :

Mr. BENAÏSSA ABDERRÉZAK

Mlle. ALI ABBAS FATIMA ZOHRA

Devant le jury:

Mr. HARKAT. S

Président

Mr. YAHIA. A

Examineur

Mr. GHARBI. I

Promoteur

2011-2012

Remerciements

Avant tous nous remerciant le Dieu le tout puissant d'avoir guidé nos pas et nous avoir donné le courage pour faire ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur Dr Gharbi J, du département des sciences vétérinaire (ZISDB), pour ces conseils, ces encouragements et son aide, et un grand remerciement pour lui pour bien vouloir nous encadrer et nous diriger durant notre stage.

A notre président jury,

Nous tenons à vous remercier Mr. Harkat S, Enseignant de département des s. vétérinaire d'avoir accepter présidé notre jury.

A nos examinateur,

Nous tenons à vous remercier Mr. Yahia A d'avoir accepter examiné notre travail.

Un grand merci pour Dr Adel. D et toute l'équipe de la station expérimentale.

Nos remerciements le plus sincère à tous nos enseignants qui ont assurés notre formation et toutes les personnes qui ont contribué de pré ou de loin à l'élaboration de ce mémoire

Abderrezak et Fatima Zohra

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère
maman toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.*

*Mon très cher père à qui m'adresse au ciel les vœux les plus
ardents pour la conservation de leur santé et de leur vie.*

*A mes chers frères : Mohamed, Yacine, Tarek et leurs femmes
Rabab, Selma et Hanane.*

A ma chère sœur Djamila et son mari Nabil.

A mes chères sœurs : Leila, Zineb, et Chahrazed.

A mes chères nièces : Fatima, Ghizlane, et Kholoud

*A mes chers neveux : Youcef, Ghanou, Rayan, Sami,
Abdenmour, Mohamed, et Wassim*

A tous mes amis(es)

A tous mes collègues de la promotion 2006/2011

Et en particulier, mon binôme Fatima Zohra.

Abderrezak .

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A

Mon Père, ELHADJ

En vous, je vois un père dévoué à sa famille. Votre présence en toute circonstance m'a maintes fois rappelé le sens de la responsabilité.

A

Ma Mère, AICHA

En vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le bonheur de ses enfants.

Merci pour tous.

A

Ma chère sœur NASSIMA

Pour leur amour et leur soutien quotidien.

A

Mes frères

MOHAMED, BOUMEDIEN, KARIM, et AMINE

Pour leurs aides et leurs soutiens affectifs.

A

AMINA et RABIEA

Pour être assez sympa et mignonnes.

A

Mes neveux et nièces

KHALED, OUSSAMA et ABOUBAKER

YASMINE, HOUDA et MERIEM

A

Toute ma famille.

A

Mes amies

AMEL, ASMAA, SARA, FOUZIA, KHEIRA, et KARIMA

FATIMA ZOHRA

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	I
Dédicace.....	II
Dédicace.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures.....	V
Liste des photos.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Résumé.....	VIII
Summary.....	IX
الملخص	X
INTRODUCTION.....	1

LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE:

CHAPITRE I:

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

I. Physiologie du cycle œstral chez la brebis.....	2
I.1. Ovogenèse.....	2
I.2. Folliculogenèse.....	2
I.2.1. Notion d'une vague folliculaire.....	2
I.2.2. Notion de recrutement.....	2
I.2.3. Notion de sélection.....	2
I.2.4. Notion de dominance.....	2
a) Follicule primordial.....	3
b) Follicule primaire.....	3

à

c) Follicule secondaire «antrum».....	3
d) Follicule tertiaire.....	3
e) Follicule préovulatoire.....	3
f) Follicule de De Graaf.....	4
g) Les follicules atrésiques.....	4
I.3. L'ovulation.....	5
II. Le cycle sexuel de la brebis.....	5
II. 1. Les différentes phases du cycle oestrien.....	6
II. 1.1. La phase folliculaire ou la phase œstrogénique.....	6
a. Le pro-œstrus.....	6
b. L'œstrus (ou chaleurs).....	6
II. 1.2. Phase lutéale ou la phase progestéronique.....	6
a. Le métœstrus ou post-œstrus.....	7
b. Le dicestrus ou ancestrus.....	7
II. 2. Contrôle hormonal du cycle.....	7
II.2.1. Hormone hypothalamique (GnRH).....	7
II.2.2. Hormones hypophysaires (hormones gonadotropes LH et FSH).....	7
a. FSH (Follicule Stimulating Hormon).....	7
b. LH (Luteinizing Hormon).....	8
II.2.3. Les hormones ovariennes.....	8
a. Les œstrogènes.....	8
b. La progestérone.....	9
II.2.4. Les Hormones de l'utérus.....	9
a. La prostaglandine.....	9
III. La fécondation.....	10
IV. La progestation.....	10
V. La segmentation.....	10

VI. La gestation proprement dite.....	10
---------------------------------------	----

CHAPITRE II:

Synchronisation de l'œstrus et transfert d'embryons chez la brebis

I. Synchronisation de l'œstrus.....	12
I.1. La progestérone et progestagènes.....	12
I.2. Les produits lutéolytiques.....	12
II. Transfert d'embryon.....	13
II.1. Transfert des embryons frais (sans préservation).....	13
II.2. Transfert d'embryons préalablement conservés ou congelés.....	14
II.2.1. La cryoconservation des embryons.....	14
a. Technique de congélation lente.....	14
b. Technique de vitrification.....	15
II.3. Les méthodes de transfert.....	15
II.3.1. Transfert chirurgical.....	15
II.3.2. Transfert laparoscopique.....	15
II.4. Facteurs de réussite du transfert.....	17
a. Le stade de développement embryonnaire.....	17
b. La qualité des embryons.....	18
c. Le nombre d'embryons transférés	18
d. Le délai de réalisation de transfert	18
e. Transfert unilatéral ou bilatéral.....	18
f. La synchronisation donneuses/receveuses.....	18
g. La réponse ovulatoire de la receveuse.....	18
h. La sélection des animaux.....	18

OBJECTIFS

LA PARTIE EXPERIMENTALE:

CHAPITRE I:

Synchronisation des chaleurs

I. Lieu et période de l'expérimentation.....	20
II. Matériel et méthodes.....	20
II.1 Matériel.....	20
II.1.1 Animaux.....	20
a. Les brebis.....	20
b. Les béliers.....	21
II.1.2 Appareils et produits.....	21
a. Appareils.....	21
• Matériel échographique.....	21
• Matériel de synchronisation des chaleurs.....	22
b. Produits.....	22
II.2 Méthodes.....	22
II.2.1 Examen échographique.....	22
II.2.2 Protocole de synchronisation des chaleurs.....	23
II.2.3 Détection de l'œstrus.....	23
III. RESULTATS.....	24
III.1. comportement d'œstrus.....	24

CHAPITRE II:

Evaluation de la réponse ovarienne et transfert embryonnaire

I. Matériel et méthodes.....	27
I.1 Matériel.....	27
I.1.1 Animaux.....	27

I.1.2 Appareils, instrument et produits.....	27
A. Appareils et instruments.....	27
• Matériel endoscopique.....	27
• Matériel chirurgical.....	28
B. Matériel du transfert et de décongélation des embryons.....	28
C. Produits.....	28
I.2 Méthodes.....	28
I.2.1 Préparation des brebis.....	28
I.2.2 Examen laparoscopique et dénombrement des corps jaunes.....	28
I.2.3 Transfert des embryons.....	29
I.2.4 Soins poste opératoire.....	31
I.2.5 Diagnostique de gestation.....	31
II. Résultats du dénombrement ^{ds} <u>du corps jaune</u>	31
III. Détermination de taux de gestation.....	32
DISCCUSION	35
CONCLUSION	37
ANNEXES	
REFERENCS BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES TABLEAUX :

- *Partie bibliographique :*

Tableau I : Résultats de transfert laparoscopique (embryons frais ou congelés)..... 16

Tableau II: Fertilité (%) des brebis mettant bas (nombre de receveuses) après transfert laparoscopique ou chirurgical..... 16

- *Partie expérimentale :*

Tableau III : Race, âge, poids, et note d'état corporel des brebis receveuses..... 20

Tableau IV : début, fin, et durée des signes d'œstrus chez les brebis..... 24

Tableau V : Réponse ovulatoire chez les brebis..... 32

Tableau VI : Taux de gestation..... 33

LISTE DES FIGURES :

- *Partie bibliographique :*

Figure 1: Principales étapes du développement d'un follicule ovarien.....4

- *Partie expérimentale :*

Figure 2: Protocole de la synchronisation des chaleurs chez les brebis receveuses.....23

Figure 3 : Distribution des débuts d'œstrus chez les brebis de race H.....25

Figure 4 : distribution des débuts d'œstrus chez les brebis de race OD.....25

LISTE DES PHOTOS :

Photo 1 : matériel échographique.....	21
Photo 2 : La détection des chaleurs.....	23
Photo 3: Pinces à préhension.....	27
Photo 4: matériels endoscopique.....	27
Photo 5: Générateur de lumière froide à intensité variable.....	27
Photo 6 : examen laparoscopique pour l'évaluation de l'état des ovaires.....	29
Photo 7 : ovaire avec des corps jaune.	29
Photo 8 : l'extériorisation de la corne utérine.....	30
Photo 9 : injection des deux embryons dans l'extrémité de la corne utérine.....	30
Photo 10 : soins poste opératoire.....	31

LISTE DES ABREVIATION:

ARN: acide ribo-nucleique.

CIDR: Controlled Internal Drug-Releasing device.

CJ: corps jaune.

COCs: complexe ovocyte-cumulus

eCG: equine Chorionic Gonadotropin.

FGA: acétate de fluorogestone.

FSH: Follicule Stimulating Hormon.

H: Hamra.

OD: Ouled Djellal.

ND: nom déposé.

GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormon.

ICSH: interstitiel cell stimulating hormone.

IM: Intra Musculaire.

LH: Luteinizing Hormone.

MAP: acétate de médroxyprogestérone.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PGF2 α : prostaglandine F2alpha.

PMSG : Pregnent Mare Serum Gonadotrophin.

UI : Unité Internationale.

ZP: zone pellucide.

Résumé :

La conservation des embryons ovins récoltés sur un animal donneur ou obtenus par fécondation in vitro constitue une étape essentielle du transfert d'embryons. En effet, cette présente des avantages économiques, sanitaires et génétiques. L'objectif du présent travail a été un essai de maîtrise et d'application du transfert des embryons congelés.

Vingt-cinq (25) brebis receveuses de race Ouled Djellal et Hamra ont été synchronisées par la pose des éponges vaginales imprégnées de 40mg de FGA, pendant 14 jours. Le jour du retrait des éponges 500 UI de PMSG a été administrés en IM chez toutes les brebis. Six jours après l'apparition des chaleurs un examen endoscopique a été réalisé pour déterminer le nombre de corps jaunes et le transfert des embryons congelés.

Les résultats obtenus dans la présente montrent que le taux de synchronisation des chaleurs a été de 100% chez les brebis receveuses de race (H) et de 84,21% chez celles de race (OD). La réponse ovarienne moyenne a été de : $1,33 \pm 0,81$ CJ chez la race (H) et $1,46 \pm 0,63$ CJ chez la race (OD). L'examen échographique, nous a permis de révéler un taux de gestation de 23.52%.

Il en ressort que malgré le faible taux obtenu lors du transfert des embryons congelés, ce résultat est très encourageant pour une expérience faite pour la première fois en Algérie.

Mots clés : Brebis, Hamra, Ouled Djellal, embryons, congélation, transfert.

Summary :

The conservation of sheep embryos harvested from a donor animal or obtained by in vitro fertilization is an essential step of embryo transfer. Indeed, this has economic benefits, health and genetics. The objective of this work was a test of mastery and application of the transfer of frozen embryos.

Twenty-five (25) recipient ewe breed Ouled Djellal and Hamra were synchronized by the application of vaginal sponges impregnated with 40 mg of FGA for 14 days. On the day of sponge removal, 500 IU of PMSG was administered IM in all sheep. Six days after the onset of heat an endoscopic examination was performed to determine the number of corpora lutea and the transfer of frozen embryos.

The results obtained in the present show that the rate of synchronization of oestrus was 100% in ewes bred recipients (H) and 84.21% for those race (OD). The average ovarian response was: 1.33 ± 0.81 in the CJ of race (H) and 1.46 ± 0.63 in the CJ of race (OD). Ultrasound examination, we revealed a pregnancy rate of 23.52%.

It shows that despite the low rate obtained during the transfer of frozen embryos, this result is very encouraging for an experiment for the first time in Algeria.

Keywords: Sheep, Hamra, Ouled Djellal, embryo freezing and transfer.

INTRODUCTION

Introduction

Le mouton a toujours été et continue d'être la ressource préférentielle et principale des protéines animales. En effet, Le cheptel ovin occupe une place importante dans l'économie nationale, l'effectif est composé d'environ 18,9 millions têtes (50) et la viande ovine assure 61% de la production nationale des viandes rouges (51).

La race Ouled Djellal est la plus importante en termes d'effectif, elle constitue environ 58% du cheptel national. Ce type d'ovine aux membres forts est actuellement en pleine expansion, il est le plus intéressant par ses aptitudes tant physiques que productives (28). Cependant, la race Hamra est considérée comme la meilleure race à viande en Algérie, en raison de sa bonne conformation bouchère (finesse de son ossature et la rondeur de ses lignes) (51).

Au cours des quatre dernières décennies, des changements notables dans la composition raciale des troupeaux ont été observés (5). En effet, 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 de ces deux races. Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des mesures visant leur préservation.

Les biotechnologies de la reproduction, et en particulier la transplantation et la congélation des embryons, sont les moyens les plus intéressants. L'induction d'ovulation multiples et la transplantation embryonnaire (MOET) a tout fois permet une avenir plus pratique pour parvenir a multiplier la descendances des femelles a haut potentiel génétique et a conserver des races en danger d'extinction (29). En effet, 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 (41).

Aujourd'hui, grâce aux énormes progrès réalisés, la cryoconservation des embryons fait partie des biotechnologies de pointe. Les avantages économiques, sanitaires et génétiques apportés par cette technique sont très importants pour les éleveurs et les sélectionneurs (36).

Dans cette optique, nous avons visé par le biais de ce modeste travail, une maîtrise de la technique du transfert des embryons congelés chez les principales races ovines.

LA PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

RAPPELLE SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA

REPRODUCTION CHEZ LA BREBIS

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

I. Physiologie du cycle œstral chez la brebis:

I.1. Ovogenèse:

L'ovogenèse est l'ensemble des processus qui transforment la cellule germinale initiale ou ovogonie, diploïde ($2n$ chromosomes), en une cellule apte à être fécondée, l'ovocyte, (ovocyte secondaire ou ovule), haploïde (n chromosomes). Ce processus est discontinu, il débute au cours de la vie fœtale et se termine à la sénilité. La maturation de l'ovocyte comprend quatre étapes distinctes relativement indépendantes: La croissance de l'ovocyte, La constitution des réserves d'ARNs, La reprise de la méiose (maturation nucléaire) et Transformation finale de l'ovocyte (maturation cytoplasmique) (67).

I.2. Folliculogenèse:

La folliculogenèse est un phénomène continu, s'étend depuis la sortie du follicule primordial de la réserve jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation. Avant d'aborder les différentes étapes que passe le follicule primordial, nous tentons de définir quelques notions relatives à la folliculogenèse :

I.2.1. Notion d'une vague folliculaire: La vitesse de croissance des follicules n'est pas constante, car la courbe de distribution de taille de tous les follicules d'un ovaire à un instant donné montre plusieurs maximums (classes), d'où la notion de vagues folliculaires (67).

I.2.2. Notion de recrutement: C'est l'entrée en croissance terminale de groupes de follicules gonadodépendants.

I.2.3. Notion de sélection: C'est un processus par lequel parmi les nombreux follicules recrutés, seul un nombre de ces derniers arriveront au stade préovulatoire. Il correspond à la taille où apparaissent les récepteurs en LH sur la granulosa.

I.2.4. Notion de dominance: Correspond à la régression des follicules en croissance (recrutés) et le blocage du recrutement d'autres follicules. Ces deux effets sont exercés par le follicule dominant.

Quand un follicule s'échappe de la réserve des follicules primordiaux et commence sa croissance, celle-ci continuera jusqu'à ce que le follicule subisse l'atrésie ou ovule (67) :

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

Le follicule primordial passe par plusieurs étapes à savoir (Cf. figure 1):

a) **Follicule primordial:** À la naissance la femelle possède un grand nombre de follicules primordiaux (47). Ils sont très petits, se trouvent à la périphérie de l'ovaire. Leurs noyaux sont appelés: vésicules germinatives. Chaque follicule primordial est formé d'un ovocyte entouré par une seule couche de cellules épithéliales aplaties (47), Il se transforme en follicule intermédiaire puis en follicule primaire lorsqu'il présente une couche de cellules cuboidales et en follicule secondaire à partir de 2 couches de cellules de granulosa (67).

b) **Follicule primaire:** L'ovocyte en prophase de la méiose est en croissance et entouré d'une couche de cellules folliculaires de forme cubique : les cellules granuleuses. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise, et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse : la zone pellucide .Elle est constituée à 95% de trois glycoprotéines organisés en longs filaments interconnectés, appelés ZP1, ZP2, ZP3. La ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par la ZP1. Seule la ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique. (74).

c) **Follicule secondaire «antrum»:** Il est entouré de plusieurs couches cellulaires folliculeuses (47), leurs mitoses sont intenses. L'antrum est un liquide sécrété par les cellules de la granulosa. Il renferme des protéinases et des peptidases qui jouent un rôle important dans l'ovulation (47). Cette étape se caractérise par une accumulation de réserves cytoplasmiques et un début de constitution de la thèque interne. Quelques observations permettent de penser qu'au cours de la première étape (avant la formation de l'antrum), le déterminisme de la croissance est surtout intra-ovarien, alors qu'au cours de la seconde (à partir de la formation de l'antrum jusqu'à l'ovulation), il est surtout gonadotrope (67).

d) **Follicule tertiaire :** Le stade tertiaire correspond à la phase de recrutement. Le follicule antral est composé de plusieurs couches de cellules de thèque, d'une membrane basale, d'un épithélium stratifié, de cellules de la granulosa et d'un complexe ovocyte-cumulus (COCs). La zone pellucide entourant l'ovocyte est maintenant devenue complète (9).

e) **Follicule préovulatoire :** Les mitoses diminuent au niveau des cellules folliculeuses. Le follicule s'approche de l'apex (surface de l'ovaire). Les thèques s'amincissent et les cellules du cumulus oophorus commencent à se dissocier (1).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

f) **Follicule de De Graaf** : C'est un follicule mûr qui subit plusieurs modifications parmi elles: augmentation de volume et disparition des mitoses. L'ovocyte n'est entouré que d'une seule couche de cellules folliculeuses : la corona radiata.

La thèque interne est une glande endocrine à prédominance cellulaire, contenant des capillaires et des cellules thécales stéroïdogènes stimulées par la LH. Le follicule de De Graff, réceptif aux hormones sexuelles de l'hypophyse, peut alors devenir sécrétoire (70).

La thèque externe à prédominance fibreuse (comprenant des fibres conjonctives, des cellules mésenchymateuses et des vaisseaux) est très mince (70), ses cellules sont porteuse de récepteurs à la FSH, transforment en œstrogènes les androgènes produits par la thèque interne (32).

g) **Les follicules atrésiques**: En effet, tous les follicules qui ont entamé leur croissance avant la puberté sont voués à l'atrésie (dégénérescence par apoptose) avant d'atteindre le stade antral. Il y a donc une perte très importante de cellules germinales qui réduit considérablement le stock non renouvelable de cellules germinales disponibles au début de la puberté pour assurer la reproduction de l'espèce (31).

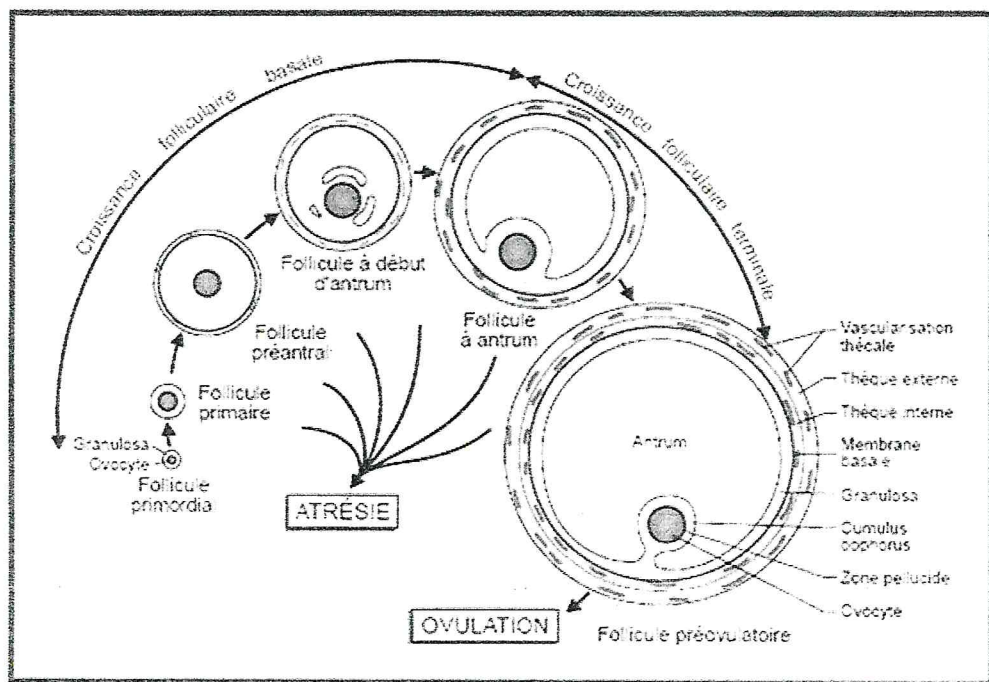


Figure 1: Principales étapes du développement d'un follicule ovarien (55).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

I.3. L'ovulation :

C'est un phénomène mécanique de rupture de la paroi folliculaire qui est déclenché par le pic de LH. Cette décharge ovulatoire est suivie d'un changement profond de la stéroïdogènes et d'une élévation de la synthèse des prostaglandines dans le follicule. L'ovulation se produit brutalement, sous la pression du liquide folliculaire et par suite de l'activation d'une enzyme protéolytique située dans la paroi (sous l'influence de la FSH et de la LH) (65).

L'ovulation est spontanée chez la brebis (25), elle est simple ou multiple (64) et libère 1 à 3 ovocytes. Elle se produit dans la 2^{ème} moitié de l'œstrus entre la 20^{ème} (20) et la 30^{ème} ou la 40^{ème} heure après le début de rut. L'ovule non fécondé se dégénère au niveau de l'oviducte (20).

II. Le cycle sexuel de la brebis :

Pendant la saison de reproduction, l'activité sexuelle se manifeste par le fait que les brebis viennent régulièrement en chaleurs. L'intervalle entre chaleurs constitue le cycle sexuel qui comprend le cycle ovarien et le cycle œstrien. Ce dernier correspond à l'intervalle entre deux œstrus où entre deux périodes de chaleurs consécutives (23).

Les cycles durent en moyenne 17 jours (11) et (23), avec une variabilité de 14 à 19 jours (11). Les chaleurs sont assez longues de 2 à 3 jours (64). Cependant, en période de transition entre l'anœstrus et la saison sexuelle (à la fin de l'été), des cycles courts de moins de 12 jours sont fréquemment observés (11).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

II. 1. Les différentes phases du cycle oestrien:

II. 1.1. La phase folliculaire ou la phase œstrogénique:

a. Le pro-œstrus:

Il dure 3 à 4 jours, et représente la période de transition entre la fin d'un cycle et le début du cycle suivant (11).

b. L'œstrus (ou chaleurs):

C'est la période pendant laquelle la femelle accepte le chevauchement, elle est hormonodépendante (25). La durée de l'œstrus varie avec : l'âge de l'animal (plus longue chez les adultes que chez les antenaises et les agnelles), la race (les races prolifiques ont des chaleurs plus longues), la saison (maximum en octobre-novembre), le climat (les températures élevées sont défavorables), l'alimentation (flushing) (23), le taux d'ovulation, la présence du mâle (25), les individus (64), le statut physiologique (lactation) et l'état corporel (11).

La durée des chaleurs varie de 18 à 72 heures (11), elles peuvent durer plus longtemps en cas d'ovulation double ou multiple (47) et se manifestent en plus grand nombre de minuit à midi que de midi à minuit (20). L'ovulation survient 24 heures après le pic de LH (25).

La détection des chaleurs est très difficile chez l'espèce ovine (11), et (23) puisque les manifestations de l'œstrus sont peu visibles et passent facilement inaperçues (47), elle nécessite absolument le bélier. La recherche et l'acceptation du bélier sont beaucoup plus constatées chez les brebis que chez les agnelles, d'où l'intérêt qu'il y a séparation entre les brebis et les agnelles pour la lutte (64). La tête est tournée vers le mâle si celui-ci se trouve derrière elle ; des bêlements plus fréquents si le mâle est absent. La brebis va présenter des mouvements rapides de la queue (11), et elle reste immobile au chevauchement (11)

II. 1.2. Phase lutéale ou la phase progestéronique:

Cette phase dure de 14 à 16 jours. L'ovocyte se trouve dans l'oviducte où aurait lieu la fécondation. Dans ce cas le corps jaune persiste tout en produisant constamment de la progestérone (23).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

a. Le méœstrus ou post-œstrus:

C'est la période de transformation métaplasique des follicules rompus en corps jaune fonctionnel. Elle dure 2 jours (70). La femelle retrouve son calme (76).

b. Le diœstrus ou anœstrus:

C'est la période de régression du corps jaune (54) c'est-à-dire la période de repos sexuel qui correspond à la lutéolyse. Elle est de l'ordre de 10 à 12 jours (70).

II. 2. Contrôle hormonale du cycle :

II.2.1. Hormone hypothalamique (GnRH) :

Le rôle principal de l'hypothalamus est la sécrétion de GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormon) (13) initiateur et régulateur fondamental de la fonction reproductrice chez les animaux (7). Le mode d'action de la GnRH est doublé; d'une part elle entraîne une libération rapide et transitoire des gonadotrophines (FSH, LH), et d'autre part, elle exerce une stimulation à long terme sur la synthèse de ces hormones (13). Donc elle est déversée dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire, pour gagner son site d'action, l'hypophyse (38).

II.2.2. Hormones hypophysaires (hormones gonadotropes LH et FSH) :

a. FSH (Follicule Stimulating Hormon) :

C'est une glycoprotéine, synthétisée par l'antéhypophyse, responsable de la croissance des follicules ovariens (63), c'est-à-dire elle assure la croissance d'un follicule sélectionnable en follicule préovulatoire. Aussi, elle prépare l'action de LH par fragilisation de la membrane du follicule de De Graaf et stimule la sécrétion d'œstrogènes (59) par les cellules de la granulosa (31). La sécrétion de FSH existe sous deux formes, une sécrétion basale continue tout au long du cycle et une sécrétion cyclique caractérisée par les pics au moment des chaleurs et l'ovulation (24). Cette sécrétion de FSH est inhibée par l'inhibine, les follistatines (peptides sécrétés par les cellules de la granulosa) et l'œstradiol (31).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

- Rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (en dehors de la période préovulatoire).

b. La progestérone :

La progestérone est sécrétée essentiellement au niveau des ovaires par les cellules lutéales mais elle peut être sécrétée en faibles quantités par les cellules granuleuses des follicules ovariens elle est également sécrétée par l'unité fœto-placentaire. Sa sécrétion est sous le contrôle de la LH (7). Les niveaux les plus élevés de la progestérone pendant la phase lutéale sont associés à un taux d'ovulation plus élevé (12).

Elle conditionne :

- Le blocage des ovulations cycliques par rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire;
- La sensibilisation du système nerveux à l'action des œstrogènes pour l'induction du comportement d'œstrus;
- Le début et le maintien de la gestation. Donc, sa diminution aboutit à l'avortement ou à l'accouchement (62).

II.2.4. Les Hormones de l'utérus :

La prostaglandine :

La prostaglandine F₂α de faible poids moléculaire (environ 300 Daltons) n'est pas un stéroïde, mais un dérivé de l'acide arachidonique (7). Elle est sécrétée par l'utérus en réponse à l'ocytocine d'origine lutéale (31). La PGF₂α présente dans le follicule pré ovulatoire, permet la rupture de la paroi du follicule au moment de l'ovulation.

Elle déclenche la régression du corps jaune ou lutéolyse et sa disparition se produit vers la fin du cycle, si la femelle n'est pas gestante (7).

La PGF₂α par sa double action: lutéolytique (lyse du corps jaune) et musculotrope, permet le contrôle du cycle (maîtrise), de la gestation (avortement) et de la parturition (induction) (30).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

III. la fécondation:

C'est la fusion des gamètes mâle et femelle après une succession d'évènements dans les voies génitales femelles (46). Cette fusion aboutit à la formation d'une cellule unique : le zygote (ou embryon de stade 1 cellule) (54), elle se fait 3 à 4 heures après l'ovulation.

IV. La progestation:

La progestation dure environ 20 jours. Pendant cette période l'œuf mène une vie libre (23) tout en effectuant une migration, une répartition dans l'utérus et une segmentation. La nidation ou l'implantation marque la limite entre deux phases de la gestation: la progestation et la gestation proprement dite (70).

V. La segmentation:

C'est le processus de division de l'œuf en nombreuses cellules (blastomères) qui forment la morula (70). Dans la morula on distingue 2 types de cellules inégaux:

Des petites cellules à la périphérie : Micromères et des grandes cellules centrales : Macromères (46). La morula migre vers l'utérus par trois mécanismes à savoir les mouvements des cils de l'épithélium tubaire, le flux du liquide péritonéal causé par les mouvements péristaltiques de la musculature de la trompe (54) ; (70). Au stade blastula, les Micromères ont donné une couche périphérique, annexielle de l'œuf (couche trophoblastique ou trophoblaste), tandis que les macromères ont constitué le bouton embryonnaire. A ce stade cet embryon est désigné par le terme de blastocyste (70). Cette période de pré-implantation dure environ 3 semaines chez la brebis (54).

VI. La gestation proprement dite :

C'est l'état d'une femelle qui porte son ou ses petits depuis la nidation jusqu'à la parturition (70) avec des transformations intéressantes non seulement le tractus génital (y compris la mamelle) mais aussi la totalité de l'organisme (47). La durée varie avec la race, la parité et la taille de la portée (15), elle est en moyenne de 145-146 jours. Mais pour une même race, elle peut varier de 8 jours d'une brebis à l'autre (2).

Rappels sur la physiologie de la reproduction chez la brebis

En conclusion, une parfaite connaissance de la physiologie de la reproduction chez la brebis et surtout le mode d'action des différentes gonadotrophines ainsi que leur chronologie d'apparition, permet de mieux comprendre et particulièrement de mieux maîtriser le control artificiel du cycle.

CHAPITRE II:

SYNCHRONISATION DE L'ŒSTRUS ET TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LA BREBIS

I. Synchronisation de l'œstrus :

Deux agents sont fréquemment utilisés pour synchroniser l'œstrus dans les protocoles de production et transfert des embryons chez les petits ruminants :

I.1. La progestérone et progestagènes:

La progestérone ou ces analogues, dits, progestagènes (34). Ces derniers, sont administrés soit oralement, ou bien sous forme d'implants sous-cutanés, ou par moyens des éponges intra-vaginales et des CIDR® (Controlled Internal Drug-Releasing device) (39), d'autres voies sont possible tel que l'injection ou encore addition dans l'aliment (19)

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) (73).

Ces produits exercent un feed-back négatif sur la sécrétion de LH et donc l'ovulation est inhibée (39). 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 (37); (39). L'ovulation est normalement déclenchée 54 h après la fin du traitement (72) et l'apparition de l'œstrus se fait dans les 48h qui suivent le retrait (14).

I.2. Les produits lutéolytiques :

Il est possible de synchroniser l'œstrus par la lutéolyse des corps jaunes. La prostaglandine (PGF₂α) et ses analogues possédant une action lutéolytique (44) donc la synchronisation des ovulations est basée sur le fait que l'ovulation se produit environ 60h après la chute des taux de progestérone. Si les brebis sont en cycle, on peut arrêter la sécrétion de progestérone en administrant des (PGF₂α) : l'ovulation est déclenchée 60 à 70h après (69).

L'utilisation des prostaglandines se réalise uniquement sur des brebis cyclées ou ayant eu une phase progestative (14) c'est à dire les brebis qui sont en début ou en fin de cycle ne répondent pas au traitement (69). Deux injections à 10 ou 14 jours d'intervalle de 4 mg de PROSOLVIN® permettent de synchroniser l'œstrus 36 à 48 h après l'injection. Après, elle permet un retour en chaleurs de 90% des brebis synchronisées (14).

II. Transfert d'embryon :

La transplantation embryonnaire est une méthode de reproduction artificielle dont le principe revient à transférer avant l'implantation les embryons générés par une femelle donneuse (mère génétique) chez des femelles receveuses (mères porteuses) qui en assurent le développement jusqu'au terme (6).

La transplantation embryonnaire permet d'augmenter le nombre de descendants par femelle ayant un haut potentiel génétique. Elle est donc un outil de choix tant pour la création que la diffusion du potentiel génétique. Pour tous les échanges de gènes, la voie du transfert embryonnaire est plus économique et surtout très sécurisante sur le plan sanitaire. L'embryon transféré au stade morula ou blastocyste bénéficie d'une protection naturelle contre les agents infectieux constitués par la zone pellucide (18). Cette méthode permet également de sauvegarder les espèces en voie d'extinction (6).

II.1. Transfert des embryons frais (sans préservation) :

Les opérations de transfert doivent être effectuées le plus rapidement possible, après collecte (moins de 4 heures) (71).

Le transfert des embryons est effectué dans l'utérus d'une receveuse dont l'œstrus a été préalablement synchronisé avec celui de la donneuse par traitement hormonal. On rappellera ici que dans le cas d'une synchronisation par une source exogène de progestagènes, cette source doit être retirée 12h plus tôt chez les receveuses que chez la donneuse (75).

II.2. Transfert d'embryons préalablement conservés ou congelés :

II.2.1. La cryoconservation 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 (40).

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 (42) ; (35).

a. Technique de congélation lente :

La congélation lente, est une technique de cryoconservation dont le principe est l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon. Elle est d'ailleurs aussi appelée « à l'équilibre » (35).

Elles donnent des résultats très reproductibles et qui sont à peine inférieures à ceux obtenus après transfert des embryons frais environ 10 à 15% de moins (37). Elle se déroule selon les étapes suivantes :

- équilibrer l'embryon dans sa solution de PBS.
- conditionner la solution PBS-glycérol renfermant l'embryon dans une paillette de 0.25 ml.
- Transférer la paillette dans le biocongelateur, où elle va refroidir jusqu'à -7°C à la vitesse de 1 à 3°C par minute et maintenue pendant 5 à 7 minutes à cette température pour la stabiliser.
- Cristallisation par seeding. Pour ce fait on heurtera la ou les paillettes ou le liquide de refroidissement au moyen d'une pince par exemple.
- la paillette est refroidie de -7°C à -35°C à raison de 0.3 à 0.6°C par minute. La paillette est plongée dans l'azote liquide à -196°C (40).

b. Technique de vitrification :

Technique de non équilibre à la différence de la congélation lente ; elle permet d'éviter au maximum la formation des cristaux de la glace au cours du refroidissement en transformant la phase liquide du cytoplasme cellulaire en phase solide encore appelée «état vitreux» (36).

Ces techniques sont loin d'être utilisées sur le terrain. Par contre elles sont pratiquées en laboratoire en routine, sur des embryons bovins et ovins notamment, afin de tester les différentes conditions de production in vitro d'embryons (61), également pour des embryons issus de clonage (58).

II.3. Les méthodes de transfert :

Il existe différentes méthodes de transfert chez les petits ruminants : le transfert chirurgical (laparotomie), le transfert sous contrôle endoscopique, le transfert semi-endoscopique et le transfert par voie cervicale, cette dernière ne peut être utilisée chez la brebis à cause du canal cervical (6)

II.3.1. Transfert chirurgical :

La préparation de l'animal et son anesthésie / tranquillisation sont les mêmes que celles de collecte chirurgicale. L'abord utérin se fait par une laparotomie au niveau de la ligne blanche. Une fois repéré, l'utérus est manipulé de sorte à pouvoir observer les 2 ovaires et déterminer celui qui porte un corps jaune fonctionnel (75). On placera les embryons dans le dernier tiers supérieur de la corne ipsilatérale au corps jaune. Une fois les embryons transférés, l'utérus est remis en position physiologique et la paroi abdominale est suturée (71).

II.3.2. Transfert laparoscopique :

Selon Youngquist (1997) cette technique se résume à :

- Mettre l'animal en décubitus dorsal avec la tête placée vers le bas, puis création d'un pneumopéritoine en insufflant du CO₂.

Synchronisation de l'œstrus et transfert d'embryons chez la brebis

- Incisions de la peau 2 à 3 cm de part et d'autre de la ligne blanche cranialement à la mamelle : une incision servira à l'introduction de l'optique et l'autre pour une pince atraumatique qui permet de saisir la corne ipsilatérale au corps jaune fonctionnel repéré.
- Ponctionner la paroi utérine avec une aiguille de 14 gauges juste cranialement à la pince atraumatique.
- Dépôt des embryons dans la lumière utérine à l'aide d'une pipette en verre reliée à une seringue à insuline.
- A la fin de l'intervention, on procède à la suture des 2 incisions de la paroi abdominale.

À la suite au transfert de 2 embryons frais par receveuse synchronisée la fertilité est comprise entre 70 et 80%; la survie des embryons chez les receveuses fertiles étant de 80%, la survie moyenne de l'embryon frais transféré est de 65% (cf. tableau). Pour un embryon décongelé et jugé viable, la survie globale est de 50-55% (71).

Tableau I : Résultats de transfert laparoscopique (embryons frais ou congelés)
(43).

Embryons	Nb de brbis	Tx de gestation %	Tx d'agnage %
Frais	18	38.90	33.30
Conglés	19	26.30	26.30

Tableau II: Fertilité (%) des brebis mettant bas (nombre de receveuses) après transfert laparoscopique ou chirurgical (10).

Type de transfert	Fertilité	
	Embryons frais	Embryons congelés
Laparoscopique	80 (46)	90 (20)
Chirurgical	88 (25)	45 (11)

II.4. Facteurs de réussite du transfert:

Afin que le transfert se réalise dans les meilleures conditions de survie des embryons, il est nécessaire de respecter quelques facteurs physiologiques qui interviennent dans le taux de réussite du transfert qui sont :

a. Le stade de développement embryonnaire:

En ce qui concerne les transferts en frais, (49) n'observent pas d'influence significative du stade de développement de l'embryon sur la réussite du transfert. Pour les embryons congelés, (8) ont observé l'évolution de la morphologie d'embryons au stade morula ou blastocyste après dépôt dans une solution de glycérol 1,4M et équilibration une quinzaine de minutes. Après une forte diminution du volume des cellules, l'aspect redevenait similaire à celui que les embryons avaient avant l'immersion dans le glycérol. Cependant, les morulas ont montré plus de modifications à l'échelle cellulaire (zone pellucide endommagée, blastomères éparpillés) que les blastocystes, et le taux de gestation obtenus après congélation et décongélation était plus faible pour les morulas (46,2%) que pour les blastocystes (54,2%). (8) ont observé que la survie in vitro après décongélation dans un bain à 30°C était meilleure pour les blastocystes que pour les morulas (84,5% contre 49,5%, $p < 0,01$). Par contre, le taux de gestation après transfert était comparable pour les deux stades d'embryons.

(37) n'a pas non plus trouvé de différence significative entre les taux de gestation obtenus après transferts d'embryons de différents stades, dans une étude réalisée aux Etats-Unis et portant sur plus de 14000 embryons transférés. Par contre, dans une autre étude qu'il a réalisée aux Pays-Bas, il a mis en évidence que les jeunes

blastocystes donnaient un taux de gestation supérieur à celui obtenu avec des morulas ou des blastocystes plus tardifs. Ces résultats ont été obtenus pour un même mode de congélation et décongélation utilisant du glycérol comme cryoprotecteur.

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

b. La qualité des embryons: C'est le principal facteur de réussite. La survie des embryons ne présentant aucun défaut visible est toujours significativement supérieure à celle d'embryons de moindre qualité (6). Néanmoins, il n'y a pas de différence au niveau du taux de survie entre les embryons classés comme ayant une qualité « bonne » et ceux ayant une qualité « excellente » (6).

c. Le nombre d'embryons transférés : Le maximum est de 2 embryons par receveuse. Cependant, il fut observé qu'il n'y avait pas d'avantage à transférer deux embryons par rapport à un seul, le pourcentage de survie étant quasiment le même (4).

d. Le délai de réalisation de transfert : Si on transfère les embryons en frais, le délai séparant la collecte de la remise en place chez les receveuses ne devrait pas excéder 2 heures. Pour les embryons cryopréservés, le délai entre décongélation et transfert doit être réduit au minimum, soit environ 20 à 30 minutes.

e. Transfert unilatéral ou bilatéral : Les embryons sont généralement transférés du côté ipsilatéral à l'ovaire présentant le plus grand nombre de corps jaunes fonctionnels. Le site de dépôt des embryons ne semble pas être un facteur majeur du taux de réussite du transfert (66).

f. La synchronisation donneuses/receveuses : Meilleure est la synchronisation entre donneuse et receveuse, meilleur est aussi le taux de réussite du transfert.

g. La réponse ovulatoire de la receveuse : La qualité des corps jaunes doit être prise en compte. Des receveuses présentant des corps jaunes ayant un développement trop tardif sont refusées.

h. Le sélection des animaux : différents critères conduisent à la décision d'inclure ou d'exclure des animaux dans un programme de transfert embryonnaire.

➤ **La race :** les animaux choisis doivent être adaptés à l'environnement où a lieu le transfert, facilement disponibles et à un coût raisonnable (26).

➤ **L'état général des animaux :** on ne choisira pas des animaux trop maigres, chétifs ou à l'inverse trop gras en général être de mauvaise receveuses (état corporelle inférieur à 1,5 ou supérieur à 4) (26)

➤ . **L'examen de l'appareil génital** : l'animal ne doit pas être gestant, ce qui peut arriver s'il a subi un transfert peu de temps auparavant ; il se peut en effet qu'un animal manifeste des chaleurs en cours de la gestation, ce qui peut conduire à une erreur de diagnostic (26)

OBJECTIFS

Objectif

Le transfert d'embryon consiste à transplanter dans une femelle porteuse (appelée receveuse) un embryon issu d'une autre femelle (dite donneuse). Chez les petits ruminants, cette méthode de biotechnologie constitue un des moyens les plus rapides pour améliorer le potentiel génétique de production, la multiplication rapide des animaux de haute valeur génétique et la réduction de l'intervalle entre générations.

En effet, la méthode de congélation des embryons est intégrée aux programmes de superovulation étant donné les nombreux avantages présentés tant du point de vue zootechnique (inutilité de synchronisation des donneuses), que commercial (exportation plus aisée) ou génétique (banque d'embryons d'animaux d'élite, conservation d'espèces en voie de disparition) voire scientifique (études biochimiques et cryobiologiques fondamentales). Elle permet de dissocier dans l'espace et dans le temps la production et le transfert des embryons.

Toute fois, l'extension du transfert d'embryons nécessite la résolution de nombreux problèmes biologiques et techniques, notamment la mise au point de la congélation des embryons.

A cet effet, l'objectif visé par notre étude a été :

- ✓ D'essayer de vérifier la réussite de la conservation des embryons préalablement produits *in vivo*.
- ✓ La maîtrise de la transplantation des embryons congelés chez la race Hamra et Ouled djellal .

LA PARTIE

EXPERIMENTALE

CHAPITRE I:

SYNCHRONISATION DES CHALEURS

Synchronisation des chaleurs

I. Lieu et période de l'expérimentation :

Notre expérience s'est déroulée durant la période du 27 octobre 2010 jusqu'au 17 mai 2011 au niveau de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb de Blida.

II. Matériel et méthodes :

II.1 Matériel :

II.1.1 Animaux :

a- Les brebis :

Vingt-cinq (25) brebis receveuses d'embryons ont été utilisées dont six (6) de race Hamra (H) et dix neuf (19) de race Ouled Djellal (OD).

Tableau III : Race, âge, poids, et note d'état corporel des brebis receveuses.

Brebis	Race	Age (mois)	Poids (kg)	Note d'état corporel
R 01	H	12	29	2
R 02		12	35	2,5
R 03		30	50	3,5
R 04		24	60	4
R 05		24	42	3
R 06		24	46	3,5
Moyenne± écart type		21±7,34	32,33±11,00	03,08±0,73
R 07	OD	12	27	2
R 08		13	31	2,5
R 09		15	36	3
R 10		18	35	3
R 11		24	50	3,5
R 12		18	49	3,5
R 13		42	65	4
R 14		24	31	2,5
R 15		36	55	3,5
R 16		36	52	3,5
R 17		48	68	4
R 18		12	40	3
R 19		30	58	3,5
R 20		24	54	3,5
R 21		30	61	4
R 22		36	43	3
R 23		24	59	3,5
R 24		42	63	4
R 25		42	58	3,5
Moyenne± écart type		27,68±11,44	38,44±16,15	3,31±0,55

Synchronisation des chaleurs

Le poids moyen, l'âge moyen et la note d'état corporel moyenne des brebis receveuses sont respectivement de :

- $21 \pm 7,34$; $32,33 \pm 11,00$ et $03,08 \pm 0,73$ chez la race Hamra.
- $27,68 \pm 11,44$; $38,44 \pm 16,15$ et $3,31 \pm 0,55$ chez la race Ouled djellal.

b- Les béliers :

Trois béliers ont été utilisés pour la détection des chaleurs:

- Deux (2) béliers de race Ouled Djellal présentaient un âge moyen de six ans (6), et un poids moyen de soixante-cinq (65) kg.
- Un (1) bélier de race Hamra présentait un âge de trois ans et demi (3,5) et un poids de cinquante cinq (55) kg.

L'ensemble du cheptel (brebis et béliers), en plus de la mise au pâturage, recevait une alimentation constituée d'une ration de base «foin d'avoine» et d'une ration complémentaire a base de «concentré». Le déparasitage a été réalisé auparavant avec des antiparasitaires IVOMEC^(ND) et ALBENDAZOLE^(ND).

II.1.2 Appareils et produits :

a- Appareils:

• Matériel échographique :

- Un échographe de type pie médicale pourvue d'une sonde bifréquence 6/8 MHz.
- Un tube en PVC.

Un échographe de type pie médicale

Une sonde bifrequence fixée à un support en (PVC)

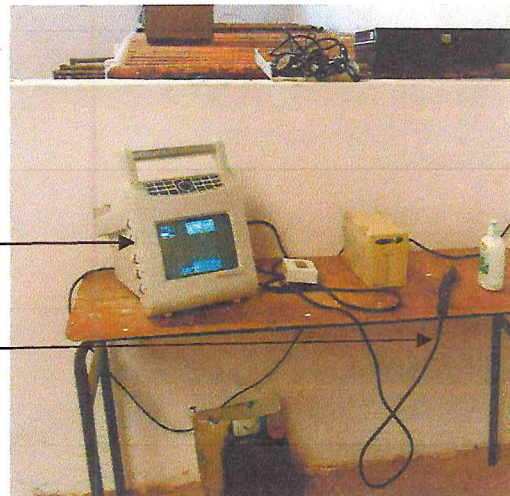


Photo 1 : matériel échographique

- **Matériel de synchronisation des chaleurs :**

- Un applicateur d'éponge vaginale.

- b- Produits :**

- **Eponges vaginales :** nous avons utilisé des éponges vaginales, imprégnée chacune de 40mg d'acétate de fluorogestone (FGA).

- **PMSG (eCG) :** (Pregnent Mare Serum Gonadotrophin) conditionné dans des boites contenant des flacons de lyophilisat (1000 UI) et des flacons de solvant, ce produit est commercialisé sous le nom de SYNCROPART^(ND).

- **Antibiotiques, désinfectant et stérilisant :** Nous avons utilisés de la terramycine (sous deux formes, injectable et spray). savon, alcool chirurgical, Bétadine et biocide.

- **Lubrifiant :** vaseline et gel.

II.2 Méthodes :

La première étape du travail a été la sélection des brebis vides grâce a un examen échographique juste avant le début du protocole de synchronisation.

II.2.1 Examen échographique :

Les brebis vides ont été sélectionnées après deux examens échographiques a un intervalle d'un mois, et pour cela nous avons utilisé les deux voies : 1-transrectale et 2-transabdominale, comme décrites par (45). Pour la première voie, les brebis ont été examinées en position couchée et debout. La sonde bifrequence 6/8 MHz a été fixée à un support en (PVC) ce qui permet l'introduction de la sonde et sa manipulation externe. Pour la deuxième voie, transabdominale, les brebis ont été examinées en position debout. La sonde enduite de gel est appliquée en avant de la mamelle de préférence à droite, orientée dorso-caudalement, et pressée modérément sur la paroi abdominale. L'utérus non gravide, a été visualisé en avant de l'apex de la vessie. L'échogénicité de sa paroi est homogène et grossièrement granuleuse. Dans le cas où l'animal était gestant, il était possible de voir la vésicule embryonnaire (zone anéchogène). Les embryons et les placentomes apparaissent comme de petites zones échogènes à la surface de l'endomètre.

Synchronisation des chaleurs

II.2.2 Protocole de synchronisation des chaleurs :

Le traitement progestatif a débuté le 14 Mars 2011. Il consistait en la mise en place de l'éponge vaginale imprégnée de 40 mg de FGA pendant 14 jours. L'éponge pulvérisée avec de la terramycine a été mise dans le tube de l'applicateur et poussée au bout de ce dernier par le poussoir. Après, immobilisation de la brebis et désinfection de sa vulve, l'applicateur a été introduit jusqu'au fond du vagin, tout en évitant le traumatisme du méat urinaire. L'éponge était ainsi mise en place et l'applicateur pouvait être retiré soigneusement laissant le fil entre les deux lèvres vulvaires. Une injection de 500UI de PMSG a été effectuée le jour du retrait de l'éponge vaginale. Le protocole de synchronisation des chaleurs est illustré dans la figure n° 2:

Pose éponge △	Retrait éponge+PMSG △	△	Transfert d'embryon △
J0	J14	Détection d'œstrus J16	J22

Figure n° 2: Protocole de la synchronisation des chaleurs chez les brebis receveuses.

II.2.3 Détection de l'œstrus :

La détection de l'œstrus a été débutée 12 heures après le retrait de l'éponge vaginale. Elle a été réalisée à l'aide d'un bélier muni d'un tablier, à raison d'une heure d'observation chaque 4 heures et jusqu'à la disparition des signes d'œstrus. Toute brebis restant immobile lors du chevauchement a été considérée comme étant en chaleur.

Un bélier muni d'un tablier ●

Brebis en chaleur ●

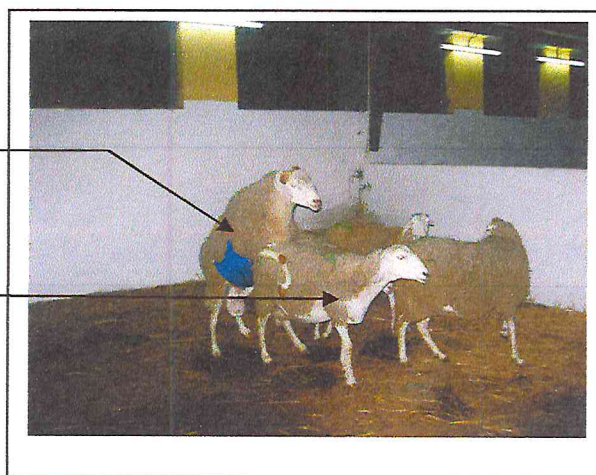


Photo 2 : La détection des chaleurs

Synchronisation des chaleurs

III. RESULTATS :

III.1. comportement d'œstrus :

Les résultats de la détection d'œstrus chez les brebis receveuses sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau IV : début, fin, et durée des signes d'œstrus chez les brebis.

Brebis		Chaleurs (heures)		
		Début	Fin	Durée
H	R01	40	72	32
	R02	32	60	28
	R03	36	68	32
	R04	32	64	32
	R05	40	72	32
	R06	36	68	32
Moyenne± écart type		36±3,57	67,33±4,67	31,33±1,63
OD	R07	36	68	32
	R08	40	72	32
	R09	/	/	/
	R10	28	68	40
	R11	36	68	32
	R12	48	72	24
	R13	/	/	/
	R14	32	60	28
	R15	36	68	32
	R16	32	68	36
	R17	36	72	36
	R18	40	76	36
	R19	40	72	32
	R20	36	64	28
	R21	/	/	/
	R22	48	76	28
	R23	40	72	32
	R24	32	68	36
	R25	32	68	36
Moyenne± écart type		37±05,56	69,5±04,09	32,5±04,09

Nos résultats montrent que le taux de synchronisation des chaleurs a été de 100 % et 84,21% chez la race H et OD respectivement.

Synchronisation des chaleurs

En effet, les signes d'œstrus ont débuté en moyenne $36 \pm 3,57$ Heures chez les brebis H et $37 \pm 05,56$ chez les brebis de race OD, alors que la durée moyenne d'œstrus a été de $31,33 \pm 1,63$ ET $32,5 \pm 04,09$ heures chez les brebis H et OD respectivement. Cependant, les brebis R09, R13 et R21 n'ont pas présenté des signes d'œstrus.

Les figures ci-dessous représentent la distribution des débuts d'œstrus chez les deux races.

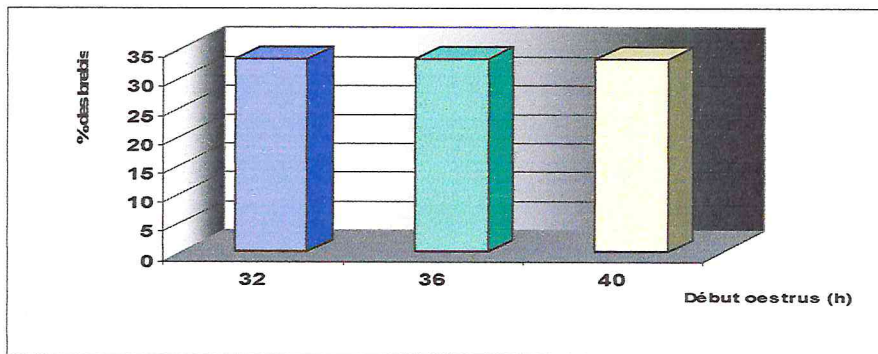


Figure 3 : Distribution des débuts d'œstrus chez les brebis de race H.

Les résultats de la figure ci-dessus montrent que le pourcentage des brebis venant en œstrus à 32h, 36h et 40 h est de 33,33 % chez les receveuses de race H.

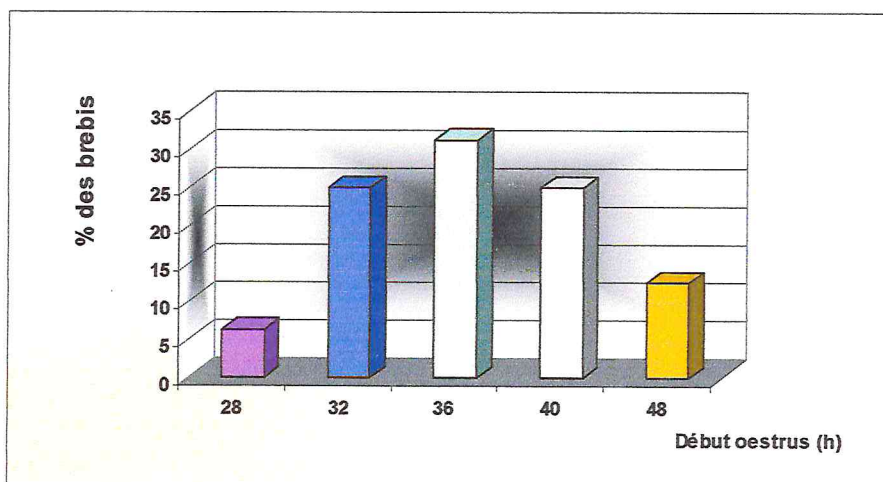


Figure 4 : distribution des débuts d'œstrus chez les brebis de race OD.

Synchronisation des chaleurs

Les résultats de la figure ci-dessus montrent que chez les receveuses de race OD le pourcentage des brebis venant en œstrus à :

- 28h est de 6.25 %
- 32h est de 25 %
- 36h est de 31,25%
- 40 h est de 25 %
- 48h est de 12.5 %.

CHAPITRE II:

ÉVALUATION DE LA RÉPONSE OVARIENNE ET TRANSFERT EMBRYONNAIRE

Ce chapitre présente les différentes étapes permettant le dénombrement des corps jaunes et le transfert des embryons chez les brebis receveuses.

I. Matériel et méthodes :

I.1 Matériel :

I.1.1 Animaux :

a- Les brebis :

Les brebis utilisées sont les mêmes décrites dans le premier chapitre.

I.1.2 : Appareils, instruments et produits :

A. Appareils et instruments :

• Matériel endoscopique :

- Une table de contention inclinable.
- Endoscopie a vision direct (0%), diamètre 6.5mm (STORZ).
- Générateur de lumière froide à intensité variable (STORZ).
- Câble de fibre optique (STORZ).
- Trocart avec canule de 7mm (STORZ).
- Trocart avec canule de 5mm (STORZ).
- Pince à préhension atraumatique.
- Tuyau de connexion.

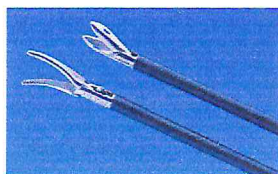
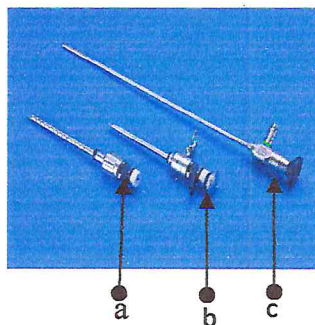


Photo 3: Pincettes à préhension atraumatique.



- a. Trocart avec canule de 7mm
b. Trocart avec canule de 5mm
c. Endoscopie a vision direct.

Photo 4: matériels endoscopique



Photo 5: Générateur de lumière froide à intensité variable.

Evaluation de la réponse ovarienne et transfert embryonnaire

• Matériel chirurgical :

- Rasoir et lames rasoirs.
- Lames de bistouri et porte lame.
- Porte aiguilles et aiguilles.
- Champs en tissu.
- Pincés de fixation.
- Pincés hémostatiques.
- Ciseaux, forceps.
- Fil de suture résorbables et non résorbables.

B. Matériel du transfert et de décongélation des embryons :

- Pistolet d'insémination intra utérine.
- Plaque chauffante, thermomètre.
- Paillettes de 0.25 ml contenant les embryons congelés (Containers d'azote liquide).

C. Produits :

- **Antibiotiques, désinfectants et stérilisants** : nous avons utilisé de la terramycine (sous deux formes, injectable et spray); savon, alcool chirurgicale, Bétadine et biocide.

- **Anesthésie locale et Tranquillisant**: Xylocaïne (2%), Acépromazine.

I.2 Méthodes :

I.2.1 Préparation des brebis :

La préparation des brebis a débutée la veille du jour de transfert, elle a consisté à la mise en diète totale de 24heures avant l'opération du transfert.

I.2.2 Examen laparoscopique et dénombrement des corps jaunes:

Le transfert des embryons a été précédé d'un examen laparoscopique, afin de repérer l'ovaire porteur du corps jaune fonctionnels

Evaluation de la réponse ovarienne et transfert embryonnaire

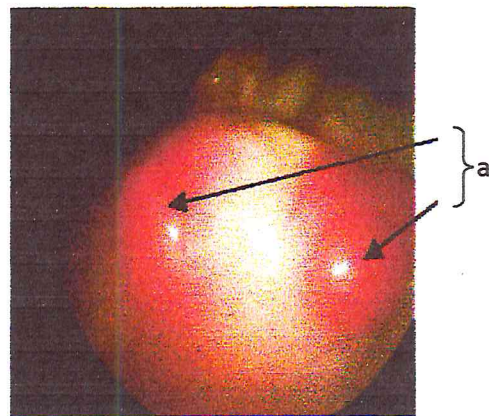
Le jour de l'intervention, la brebis a été tranquilisée avec de l'acépromazine et la région abdominale ventro- caudale juste cranialement de la mamelle a été rasée, nettoyée et désinfectée avec de l'alcool chirurgical et la Bétadine. La brebis a été ensuite installée en position dorsale sur une table inclinable et le champ en tissu a été mis sur le site opératoire. Une anesthésie locale « Xylocaine » a été injectée niveau des régions d'incision et d'insertion des trocars.

Un trocart de 7 mm muni d'une canule a été introduit au niveau de la première incision abdominale, permettant ainsi l'insertion de l'endoscope à vision direct (l'optique), l'insufflation de l'air stérile et la création d'un pneumopéritoine.

Un trocart de 5 mm a été introduit au niveau de la deuxième incision, afin d'insérer une pince atraumatique ou le pistolet d'insémination afin de permettre la manipulation et le dénombrement des corps jaunes



Photo 6 : examen laparoscopique pour l'évaluation de l'état des ovaires



a. Corps jaune fonctionnels

Photo 7 : ovaire avec des corps jaune

I.2.3 Transfert des embryons :

Une fois que l'examen laparoscopique a été positif (présence de corps jaune fonctionnels sur les ovaires), la deuxième phase débuta avec une incision de 2 à 3 cm au niveau de la ligne blanche. Visualisée par endoscopie, l'extrémité de la corne

Evaluation de la réponse ovarienne et transfert embryonnaire

utérine épsilatéral du corps jaune, a été saisie puis extériorisée de l'abdomen à l'aide d'un forceps.

Pour le transfert des embryons congelés, nous avons utilisé des embryons récoltés lors des essais de production d'embryons chez des brebis de race H et OD (travaux de PFE réalisés en 2009 et 2010).

La paillette a été décongelée dans de l'eau tiède ayant une température comprise entre 34°C et 37°C, puis elle a été montée dans un pistolet d'insémination. Par la suite, une ponction a été réalisée au niveau de l'extrémité de la corne utérine à l'aide d'une aiguille de 18 gauge ; permettant ainsi l'insertion du pistolet d'insémination et l'injection du contenu de la paillette (les deux embryons)

La corne utérine a été remise dans la cavité abdominale. La paroi abdominale, puis la peau a été suturée respectivement par des points simples et en "x" avec un fil résorbable et non résorbable.



Photo 8 : l'extériorisation de la corne utérine

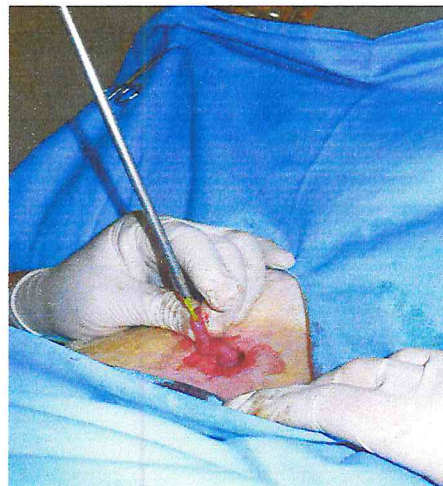


Photo 9 : injection des deux embryons dans l'extrémité de la corne utérine

I.2.4 Soins poste opératoire :

La plaie opératoire a été pulvérisée avec de la terramycine en spray. Afin d'éviter d'éventuelles surinfections une injection en IM de la terramycine a été réalisée pendant trois jours,



**Photo 10 : soins
poste opératoire**

1.2.5 Diagnostique de gestation :

Cinquante jours après le transfert des embryons, un examen échographique des brebis a été effectué pour déceler d'éventuelles gestations (selon même technique décrite dans le chapitre 01).

II. Résultats du dénombrement du corps jaune :

Les résultats de l'évaluation de la réponse ovulatoire chez les brebis receveuses sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau V : Réponse ovulatoire chez les brebis.

Race	Brebis	Nombre de corps jaune		
		OVG	OVD	Total
Race	R04	0	1	1
	R05	0	1	1
	R06	1	2	3
Moyenne ± écart type		0,33±0,54	1,33±0,75	1,66±0,81
OD	R07	1	0	1
	R08	2	0	2
	R10	2	0	2
	R11	2	0	2
	R12	0	1	1
	R14	0	1	1
	R15	0	1	1
	R16	2	1	3
	R18	0	1	1
	R19	2	0	2
	R20	1	0	1
	R22	1	0	1
	R23	0	2	2
	R24	0	1	1
	R25	1	0	1
Moyenne ± écart type		0,93±0,88	0,53±0,63	1,46±0,63

Nb : La brebis R01, R02, R03, R17 ont présentées des adhérences ce qui a empêché la visualisation des ovaires et le transfert des embryons.

Nos résultats montrent que la réponse ovarienne moyenne est de :

- 1,33±0,81 corps jaunes chez les brebis de race H
- 1,46 ± 0,63 corps jaunes chez les brebis de race OD.

III. Détermination du taux de gestation :

Les résultats du diagnostic de gestation sont rapportés dans le tableau suivant :

Evaluation de la réponse ovarienne et transfert embryonnaire

Tableau VI : Taux de gestation.

Brebis	Nombre d'embryons transférés	Dgc de gestation	
H	04	02	gestante
	05	02	vide
	06	02	vide
Taux de gestation		33.33%	
OD	07	02	vide
	08	02	gestante
	10	02	gestante
	12	02	vide
	14	02	vide
	15	02	vide
	16	02	vide
	18	02	vide
	19	02	vide
	20	02	gestante
	22	02	vide
	23	02	vide
	24	02	vide
25	02	vide	
Taux de gestation		21.42%	
Taux moyen		23.52%	

Evaluation de la réponse ovarienne et transfert embryonnaire

Le diagnostique de gestation chez les dix sept brebis receveuses a révélé que :

- 13 brebis ont été vides soit un taux de 76.48%.
- 04 brebis ont été gestantes soit un taux de 23.52%

DISCUSSION

En effet, selon (27) l'utilisation de la PMSG a la fin d'un traitement progestatif augmente le taux d'ovulation chez la brebis. Cependant, la dose de la PMSG utilisée varie, selon la saison, la race des brebis, la parité et le niveau de production laitière (71). Il nous semble que la dose 500U1 est la plus adéquate pour ce type de race car les taux d'ovulation et de synchronisation obtenus sont très satisfaisants.

3- Transfert des embryons congelés :

Les receveuses ont présentés un taux de gestation de 23.52 %, des taux équivalent a 20%, et 24.3% 26.3% qui ont été obtenus par (10), (56) et (43); respectivement, suite à un transfert de deux embryons/brebis. Ce taux est nettement inférieur à ceux obtenus par (71), qui rapportent un taux de 50%.

La survie des embryons ne présentant aucun défaut visible est toujours significativement supérieure à celle d'embryons de moindre qualité (6). En effet, les embryons de qualité inférieure verraient leur espérance de survie considérablement réduite après congélation. Toute fois, il est à signaler que le jugement visuel des embryons donne une estimation très imparfaite de leur viabilité réelle (10).

Il semble que le faible taux de survie obtenu après le transfert des embryons est peut être du au dépassement du temps limite d'attente des embryons .Selon, (6) il est conseillé de limiter le temps d'attente des embryons devant être congelés ou transférer en frais chez les receveuses à deux ou trois heures.

En fin, d'autres facteurs peuvent réduire le taux de survie des embryons. De faible taux de survie des embryons ont été enregistrés chez les jeunes femelles, comparées à des femelles adultes (22). Aussi, l'alimentation et le stress thermique n'ont pas seulement un effet sur le nombre et la qualité des ovulations, mais aussi sur la survie des embryons (22).

Discussion

En effet, selon (27) l'utilisation de la PMSG a la fin d'un traitement progestatif augmente le taux d'ovulation chez la brebis. Cependant, la dose de la PMSG utilisée varie, selon la saison, la race des brebis, la parité et le niveau de production laitière (71). Il nous semble que la dose 500U1 est la plus adéquate pour ce type de race car les taux d'ovulation et de synchronisation obtenus sont très satisfaisants.

3- Transfert des embryons congelés :

Les receveuses ont présentés un taux de gestation de 23.52 %, des taux équivalent a 20% et 24.3% qui ont été obtenus par (10) et (56) respectivement, suite à un transfert de deux embryons/brebis. Ce taux est nettement inférieur à ceux obtenus par, (43); (71), qui rapportent des taux de 26.3% et 50%.

La survie des embryons ne présentant aucun défaut visible est toujours significativement supérieure à celle d'embryons de moindre qualité (6). En effet, les embryons de qualité inférieure verraient leur espérance de survie considérablement réduite après congélation. Toute fois, il est à signaler que le jugement visuel des embryons donne une estimation très imparfaite de leur viabilité réelle (10).

Il semble que le faible taux de survie obtenu après le transfert des embryons est peut être du au dépassement du temps limite d'attente des embryons .Selon, (6) il est conseillé de limiter le temps d'attente des embryons devant être congelés ou transférer en frais chez les receveuses à deux ou trois heures.

En fin, d'autres facteurs peuvent réduire le taux de survie des embryons. De faible taux de survie des embryons ont été enregistrés chez les jeunes femelles, comparées à des femelles adultes (22). Aussi, l'alimentation et le stress thermique n'ont pas seulement un effet sur le nombre et la qualité des ovulations, mais aussi sur la survie des embryons (22).

CONCLUSION

Conclusion

Notre étude à porter sur l'une des méthodes de biotechnologie de la reproduction animale les plus récentes "Le transfert d'embryons", c'est une technique qui permet une accélération des progrès génétiques, l'augmentation des effectifs de haute valeur génétique et la préservation des races.

La transplantation embryonnaire est constituée d'une succession d'étapes techniques bien distinctes. En effet, le personnel impliqué dans la réalisation pratique des opérations du transfert devrait avoir une parfaite maîtrise à chaque étape de la chaîne, synchronisation des donneuses et des receveuses ; recherche, tri et conservation et le transfert des embryons.

En effet, les résultats obtenus dans la présente montrent que :

- Le taux de synchronisation des chaleurs a été de 100% chez les brebis receveuses de race (H) et de 84,21% chez celles de race (OD),
- La réponse ovarienne moyenne après injection d'une dose de 500 UI de PMSG a été de: $1,33 \pm 0,81$ CJ chez la race (H) et $1,46 \pm 0,63$ CJ chez la race (OD) et il semble que cette dose soit adéquate pour les deux type de race.
- Le transfert des embryons congelés chez les 17 brebis receveuses, nous a permis de révéler un taux de gestation de 23.52% , ce qui est très encourageant pour une expérience faite pour la première fois en Algérie.

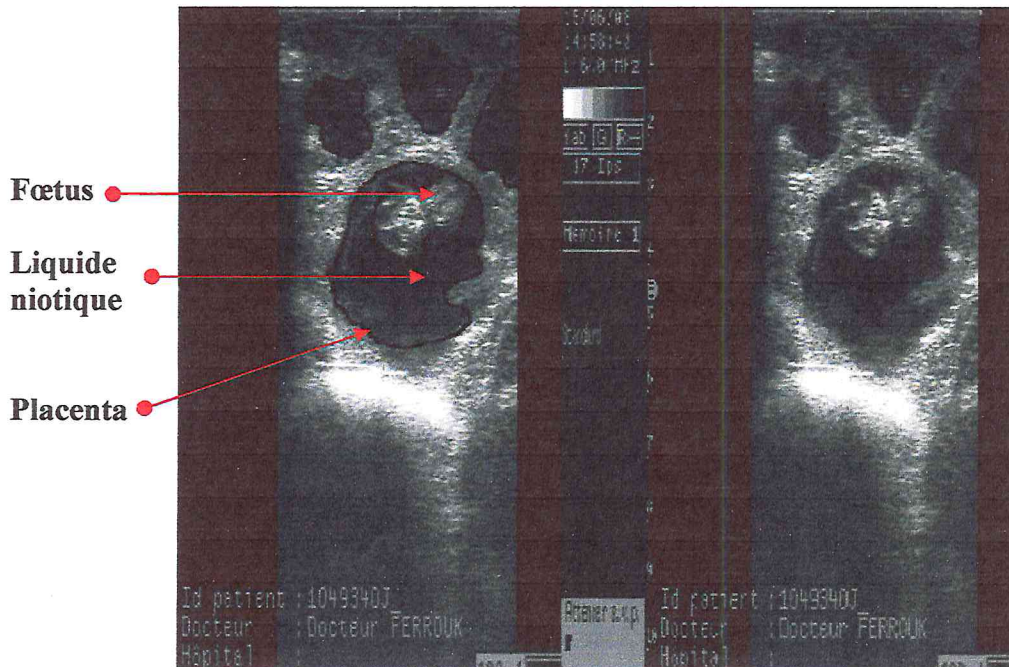
Il en ressort que pour réussir un transfert d'embryons, il faut prendre en considération tout les facteurs qui sont susceptible d'influencer ce dernier ; tel que les facteurs relatifs à l'embryon (la qualité et le stade développement de l'embryon, mode de conservation de et de congélation et de décongélation de l'embryon), et ceux relatifs à la receveuse (Les antécédents des animaux, la parité, l'état général des animaux, la nutrition et le mode de synchronisation des chaleurs)

A la lumière des résultats obtenus, Il s'avère nécessaire de réaliser d'autres travaux afin d'apporter des explications à ce faible taux obtenu lors du transfert des embryons congelés.

ANNEXES



-a-



-b-

Photo (a, b) : images échographiques du fœtus.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Anonyme 1** : <http://www.refer.org.ma/ovirep/cours2/gametes.htm>.
2. **Anonyme2** : <http://membres.lycos.fr/jbdemars/embryo/frames/gamet.htm>.
3. **AKOZ M. ; BULENT B. ; MEHEMET B.A. ; SULEYMAN D. (2006)**. Induction of multiple births in akkaraman cross-bred sheep synchronized with short duration and different dose of progesterone treatment combined with PMSG outside the breeding season. *Bull vet ins Pulawy* 50,97-100.
4. **ARMSTRONG D.T., EVANS G. (1983)**. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 19, 31-42
5. **AYACHI. (2002)**. élevage en chiffe, *Edition Intervet International Pages: 06, 07, 105*
6. **BARIL G., BREBION P., CHESNE P. (1993)**. Manuel de formation pour le transfert embryonnaire chez la brebis et la chèvre. *FAO, 115, ISSN 1014-1099*
7. **BOUKHLIQ R. (2005)**. Cours en ligne sur la reproduction ovine. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II département de reproduction animale
8. **BRACKE C. ; NIEMANN H. (1995)** New aspects in the freezing of embryos from livestock. In: *Comptes rendus de la 11ème réunion de l'A.E.T.E.* Hannover, 8, 9
9. **BRAW-TAL. ; YOUSSEFI. (1997)**. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the reprod of bovine ovary. *J. reprod Fertil* 109,165-71.
10. **BREBION P., BARIL G., COGNIÉ Y., VALLET J.C.** Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann Zootech*, 1992, 41: 331-339.
11. **BROERS P. (1994)**. Abrégé de reproduction animale. *Edition Intervet International B.V.. Pages: 06, 07, 105, 106, 109, 114, 116, 119.*
12. **CAHILL L.P.; SAUMANDE J.; RAVALT J.P.; BLANC M.; THIMONIER J. (1981)** .Survival of multiple pregnancies induced in the ewe following treatment with pituitary gonadotrophins. *J. Reprod. And Fert.*, 62: 141-150.
13. **CARATY A. ;EVANS M. ;THEIRY J.C. ;MALPAX B.;CHEMINEAU P.(1997)**. Contrôle central de la sécrétion des gonadotrophines par les neurones à GnRH.P :225-239.
14. **ESCOUFLAIRE P. (1998)**. La palpation des ovaires chez la vache. Sensation et interprétation, *journée nationale des GTV. Tours 27,28, et 29 mai 1998* : 29-31

14. **CASAMITJANA PHILIPPE. (2006).** Synchronisation de la reproduction chez les ovins. Novembre, Société Nationale Des Groupements Techniques Vétérinaires, Fiche n°22.
15. **CHEMINEAU P.; BARIL G.; LEBOEUF B.; MAUREL M.C.; ROY F.; PELLICER-RUBIO M. (1999).** Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 54: 129-142.
16. **COGNIE Y ET PELLETIER J. (1976).** Preovulatory LH relee and ovulation dry and lactating ewes after prostagen and PMSG treatment during the seasonal anoestrus. *Anim. Biol. Bioph.* 16, p529-536.
17. **COGNIE Y. (1984).** Comparaison de deux traitements de superovulation chez la brebis citée par J.C Vallet et Casamijana.
18. **COGNIE Y, BARIL G. (2002).** Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre. *INRA Prod. Anim*, 15 (3), 199-207
19. **COUROT M. ; VOLLAND-N.P. (1991).** Productions animales. *INRA Février volume 4 N° 1. Pages: 22, 23.*
20. **CRAPLET C. ; THIBIER M. (1980).** Le mouton. *Edition Vigot.* P: 160-266.
21. **DERIVEAU J. ; ECTORS F. (1989).** reproduction chez les animaux domestiques ; vol I. *académie Louvain-la-Neuve, pp : 57-506.*
22. **DRIANCOURT M.A. ; AVDI M. (1993)** effect of the physiological stage of the ewe on the number of follicles ovulating following hCG injection. *anim. reprod. Sci.* 32 :227-236.
23. **DUDOUET C. (2003).** La production du mouton. 2^{ème} édition. *Edition France agricole.* P: 60-263.
24. **DUPOUY J.P. ; BOISON J. ; DESCHAUX P. ; LEGRAND C. ; PICON L.O. (1992).** Hormones et grandes fonctions. Tome 1 .Edition Marketing, Paris.
25. **E.S.A.K. TUNISIE (1998).** Maîtrise de la reproduction et l'insémination artificielle des ovins. Actes du cours national organisé par E.S.A.K (Ecole supérieure d'Agriculture du Kef) du Tunisie en collaboration avec l'O.E.P. 24-29. P: 07-37.

26. **ESCOUFLAIRE P. (1998).** La palpation des ovaires chez la vache. Sensation et interpretation, *journée nationale des GTV. Tours 27,28, et 29 mai 1998* : 29-31
27. **EVAN G. ; ROBERSON T.J. (1980).** The control of the fertility in sheep : endocrine and ovarian reponse to prostagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J. agric. Sci.* 94
28. **FAO (2007).** Étude de diagnostic des systèmes de production. *Food and Agriculture Organisation*, 96p
29. **FERNANDEZ ET RUIZ MATAS, (2003) :** *Physiologie of the estrous cycle. J. Anim. Sci (Suppl).*
30. **FONTAINE M.; CADORE JP. (1995).** VADE MECUM du vétérinaire. Edition Vigot, p 1672.
31. **GAYRARD V. (2007).** Physiologie de la reproduction des mammifères. Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse. Septembre, P :68.
32. **GILBERTE B. ; GEANINE D. ; CAROLE D. ; RAYMONDE G. ; ROLAND J. ; ANDRE LLH. ; LUIS M. ; I GISELE R. (2005).** Reproduction des animaux d'élevage. Deuxième édition EDCAGRI.
33. **GILLES RAYMOND. (2006).** Physiologie Animale.
34. **GORDON I. (1975).** Hormonal control of reproduction in the sheep. *Proc. Br. Soc. Anim. Prod.*, 4: 79-93.
35. **GUERIN ET AL. (1996).** multiple ovulation and embryo transfer in goats ; by khoboso christina lehloenya ; a thesis submitted in partail fulfillment of the requirements for the degree ; philosophae doctor ; in the faculty of natural and agricultural sciences; department of animal, wildlife and gassland sciences; u niversity of the free state bloemfontein; february2008.
36. **GUIGNOT F. (2005).** Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Productions Animals*), 18: 27-35.
37. **HALSER, (2001).** Multiple ovulation and embryo transfert in goats: by KHOBOSO
38. **HANSEL W. (1971).** Survival and gonadotrophine responsivence of luteal cells invitro. *method in reprod cell biol pp 295-317.*
39. **HANSEL W. ; CONVEY E.M. (1983).** Physiologie of the estrous cycle. *J.annim. sci (suppl)* 57 :104-412.

40. **HANZEN.(2009)**. La reproduction d'embryons in vivo dans l'espèce bovine. Prof ch. Hanzen. Université de liège
41. **HANZEN.(2010)**. La reproduction d'embryons in vivo dans l'espèce bovine. Prof ch. Hanzen. Université de liège
42. **HEYMAN Y. ; VINCENT C. (1988)**. Transplantation les embryons qui viennent du froid. *Biofuur n° 69. P38-42.*
43. **ISHIDA N. ; JUNG YEON-GIL. ; ITAGAKI R. ; OKADA M. ; OGISO T. ; ISHIKAWA D. ; FUKUI Y.(1999)**. Non-surgical transfer of fresh or frozen-thawed ovins embryos by laparoscopy. *J. reprod. Dev. 45 :289-293.*
44. **ISHWAR A.K., MEMON M.A. (1996)**. Embryo transfer in sheep and ewes and fewer recovered ova and fertilized embryos goats. *a review. Small Ruminant Res, , 19: 35-43.*
45. **KAHN.** (1994) examen échographique de la brebis et de la chèvre. In : atlas de diagnostic échographique. Edition maloine, Paris, 186-210.
46. **KAYOUACH. (2004)**. Cours de physiologie de la reproduction. *Département des sciences vétérinaire, Elkhroub, Constantine,*
47. **KOLB E. (1975)**. Edition Vigort et frères, Physiologie des animaux domestiques. Paris,. Pages: 623-667.
48. **LASTER D.B. ; GLIMP H.A.(1974)** influence of breed on reponse to exogenous hormone in estrous ewe. *J. anim. Sci. 1129-1135.*
49. **LINDNER G.M.; ANDERSON G.B.; BONDURANT R.H.; CUPPS P.T.; GOEMANN G.G. (1983)**. septembre, 101-111
50. **M.A.D.R. (2006)** élevage en chiffe, service de suivit et de l'évaluation, direction de l'élevage, Ministère de l'Agriculture et du développement rurale
51. **M.A.P. (2004)**. Ministère de l'agriculture et de la pêche (direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information).
52. **MARTAL J. (1985)** les biotechnologies de la reproduction animale in "biotechnologie" René SCRIBAN. 626-794. Edition TEC & DOC
53. **MAUER R.E. ;REVENAL P. ; JOHNSON E.S. ; MOYER R.H. ;HIRIATA A. ;WHITE W.F. (1972)**. Levels of luteinizing hormon in sera of ewes near the time of oestrus as determined by radioimmunossay. *J. anim. Sci*

54. **MENOUBA S. (2003).**Cours d'embryologie. *Département des sciences vétérinaire, Elkhroub, Constantine.*
55. **MONNIAUX D. ; MONDON. ; PEPIN B. ; MONGET P. (1999).** L'atreire folliculaire, un gaspillage programme. *Medecin/science* 15 : 157-606.
56. **NAOHISA I.; YEON-GIL J. ; RYOKO I. ; MIDORI O. ; TOMOE E. ; DAISUKE I. ; YUTAKA F. (1999).** Non-surgicaltransfer of fresh or frozen-thawed ovines embryos by laparoscopy. *Laboratory of animal genetics and reproduction, obihiro university of agricultureand veterinary meicine, Japan. Reprod. Dev.* 45 :289-293.
57. **OKADA A. ; KAWADA S.J. ; MIYAMOTO A. ; FUK Y. ;(2000).** Incidence of abnormal corpûs in superovulated ewes. *J. reprod. Fertil. Dev.* 46,6. *Protocol for superovulation of ewess J Anim Sci.* 69 :246-251.
58. **PEURA T.T., LANE M.W., LEWIS I.M., TROUNSON A.O. (2001).** Development of bovine embryo-derived clones after increasing rounds of nuclear recycling. *Mol. Reprod. Dev.*, 58, 384-389.
59. **RIENTORT.(1995).** Abrège .*Physiologie Animal 2 : Les grandes fonctions.*
60. **RIESENBERG S. ; MEINECK S.T. ; MEINECK B.(2001).** Ultrasonic study of follicular dynamis following superovulation in germain merino ewes ; *theriogenology* 55 :847-865.
61. **RIZOS D.; WARD F.; BOLAND M.P.; LONERGAN P. (2001).** Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, 56, 1-16.
62. **ROUX M. (1986).** Alimentation et conduite de troupeau ovin .*Technique Agricole*,3-18.
63. **RUCKEBUSCH Y. (1981).** Edition MALOINE S.A. *Physiologie et pharmacologie thérapeutique animales.* 2ème édition. pages :239 ,241,242,243,244,245,246,248,265 .
64. **SOLTNER D. (2001).**Zootechne générale Tome I. La reproduction des animaux d'élevage. *Collection sciences et techniques agricoles.* 3^{ème} édition. p: 29, 39, 41, 67,75.
65. **STOLKOWSKI J. (1974).** Endocrinologie des vertébrés. *Edition Paris librairie VUILBERT.* Pages: 107-178.
66. **SUGIE T.;SOMA T.;TSUNODA AND MIZOUCHI K.(1989).** Survival rates of the embryo during transfer in farm animals.

67. **THIBAUT. ; LEVASSEUR M.C. (1979).** La fonction ovarienne chez les mammifères. *Edition MASSON, Paris, P: 09-42.*
68. **THIBAUT C. ; LEVASSEUR M.C. (2001).** La reproduction chez les mammifères domestiques et l'homme.
69. **TIBARY A., MANAR S. (1988).** Factors affecting estrus synchronization in two Moroccan breeds of sheep. *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1: 462.*
70. **VAISSAIRE J.P. (1977).** Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et du laboratoire. *Edition Maloine S.A. Paris.*
71. **VALLET J.C., CASAMITJANA P., BREBION P., PERRIN J. (1991).** Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Recueil de Medecine Vétérinaire, 167 : 293-301.*
72. **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
73. **WHITLEY N.C.; JACKSON D.J. (2004)** An update on estrus synchronization in goats: a minor species. *Journal of Animal Science, 82: 270-276.*
74. **YANAGIMACHI R. (1994)** mammalian fertilization In: Knobil, E Meill, JD. (Eds) the physiology of reproduction, second edition laven press ltd, New York, 189-317 (In Drion et al 2000).
75. **YOUNGQUIST R.S. (1997).** Current Therapy in Large Animal Theriogenology. *1st edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 898p*
76. **ZIDANE K. (1999).** Suivie clinique et histologique des paramètres de la reproduction chez la brebis. *Thèse en vue d'obtention du grade de magister en médecine vétérinaire.*