



326THV-2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

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

Université SAAD DAHLEB DE 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 d'un prétraitement par un agoniste de GnRH
sur la production in vivo d'embryons chez la brebis
de race Ouled Djellal.*

Réalisé par :

M^r : DJEBALA Salem.

M^r : TAOURI Aziz.

Encadrés par :

M^r : GHARBI I.

Jury composé de:

Président:

M^r : AIT BELKACEM. A

Maître assistant A (USDB)

Examineurs:

M^r : ADEL. D

M^r : HARKAT. S

Maître assistant A (USDB)

Maître assistant B (USDB)

Promoteur: M^r : GHARBI.I

Maître assistant A (USDB)

ANNEE UNIVERSITAIRE 2009/2010

SOMMAIRE

| | |
|-----------------------------|-----|
| Sommaire..... | I |
| Remerciements | V |
| Dédicaces..... | VI |
| Liste des figures..... | VII |
| Liste des tableaux..... | IX |
| Liste des photos..... | XI |
| Liste des abréviations..... | XII |
| Résumé..... | XIV |
| Abstract..... | XV |
| Introduction générale..... | 1 |

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES TECHNIQUES DE PRODUCTION ET DE TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LA BREBIS

| | |
|--|----|
| I. Introduction..... | 02 |
| II. La synchronisation des chaleurs | 02 |
| a. La progestérone et progestagènes..... | 02 |
| b. Les produits lutéolytiques | 03 |
| III. la super ovulation | 03 |
| III.1. La nature des hormones induisant la super ovulation | 03 |
| III. 1. 2. Les extraits hypophysaires (FSH p, FSH o) | 04 |
| III.1.2. Les extraits extra hypophysaires | 04 |
| IV. La fécondation | 05 |
| IV.1. Saillie naturelle | 05 |
| IV.2. Insémination artificielle | 06 |

| | |
|---|----|
| V. Collecte d'embryons | 07 |
| V.1. Technique chirurgicale | 07 |
| V.2. Technique laparoscopique | 08 |
| VI. Recherche, tri et classification des embryons | 08 |
| VII. Devenir des embryons | 10 |
| VII.1. Transfert des embryons | 10 |
| VII.1.1. Transfert chirurgical | 10 |
| VII.1.2. Transfert laparoscopique | 11 |
| VII.1.3. Facteurs de réussite du transfert embryonnaire | 12 |
| VII.2. La cryoconservation des embryons | 13 |

CHAPITRE II: LIMITES ET AMELIORATION DE LA PRODUCTION *IN VIVO* D'EMBRYONS CHEZ LES OVINS:

| | |
|--|----|
| I. 1. Les limites de la production <i>in vivo</i> d'embryon | 14 |
| I.1.1. Facteurs intrinsèques | 14 |
| I.1.2. Facteurs extrinsèques | 16 |
| I. 2. Amélioration de la production <i>in vivo</i> d'embryon chez la brebis..... | 18 |
| I. 2. 1. Utilisation de la GnRH | 18 |

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SURLE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

| | |
|--|----|
| I- LIEU ET PERIODE DE L'EXPERIMENTATION..... | 21 |
| II- MATERIEL ET METHODES | 21 |
| II.1. Matériel | 21 |
| II.1.1. Animaux | 21 |
| II.1.2. Instruments, appareillages et produits | 23 |
| II.1.2.1. Appareillages..... | 23 |
| II.1.2.2. Produits | 24 |
| II.2. Méthodes | 25 |
| II.2.1. Echographie | 25 |

| | |
|---|----|
| II.2.2. Traitement de synchronisation et de super ovulation | 25 |
| II.2.2.1. Synchronisation des chaleurs | 25 |
| II.2.2.2. Traitement de super ovulation | 26 |
| II.2.3. Détection d'œstrus..... | 27 |
| II.2.4. Récolte et conditionnement du sperme..... | 27 |
| II.2.5. Fécondation | 28 |
| II.2.6. Endoscopie | 28 |
| III. ANALYSES DES DONNEES | 28 |
| IV. RESULTATS | 29 |
| IV.1. Comportement d'œstrus chez les brebis donneuses | 29 |
| IV.2. Comportement d'œstrus chez les brebis receveuses | 30 |
| IV.3. Réponse ovarienne aux traitement de synchronisation et de superovulation | 31 |
| IV.3.1. Réponse ovulatoire après traitement de superovulation chez les brebis receveuses | 31 |
| IV.3.2. Réponse ovulatoire après traitement de synchronisation chez les brebis donneuses..... | 32 |

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GnRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION, QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

| | |
|--|----|
| I. Matériel et méthodes | 34 |
| I.1. Matériel | 34 |
| I.2. Méthodes | 36 |
| I.2.1. Préparation des animaux | 36 |
| I.2.2. Récolte des embryons | 36 |
| I.2.3. Tri et sélection d'embryons | 37 |
| I.2.4. Transfert d'embryons | 38 |
| I.2.5. Soins post opératoire | 39 |
| I.2.6. Diagnostique de gestation | 39 |
| II. Analyses statistiques | 39 |

| | |
|--|----|
| III. RESULTATS | 40 |
| III.1. Dénombrement des corps jaunes..... | 40 |
| III.2. Résultat de la récolte | 40 |
| III.2.A. Structures récoltées | 40 |
| III.2. B. Taux de récolte..... | 41 |
| IV. Classification des embryons | 41 |
| IV.1. Qualité des structures récoltées | 41 |
| IV.2. Détermination du taux de fécondité | 43 |
| IV.3. Détermination du taux d'embryons transférables | 44 |
| V. Résultats du transfert embryonnaire | 44 |
| V.1. Détermination du taux de gestation..... | 44 |
| V.2. Taux de viabilité | 45 |
| DISCUSSION | 46 |
| CONCLUSION..... | 50 |

Remerciements

Au terme de cette modeste étude, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements à Dr GHARBI Ismail (notre promoteur) pour ses conseils, sa disponibilité et pour tous les efforts qu'il a déployés.

Nous remercions également, le président Mr AIT BELKACEM.A qui nous a fait honneur d'accepter de juger ce modeste travail.

Aussi, nous nous permettons d'exprimer tout notre respect aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur d'apprécier ce travail, Mr ADEL. D et Mr HARKAT. S

Nous tenons à remercier le Dr FERROUK.M, Dr DECHICHA. A pour leur assistance dans la réalisation de la partie expérimentale.

En fin nous remercions le directeur et le personnel de la station expérimentale de l'université de Blida pour nous avoir facilité la tâche dans la réalisation de la partie expérimentale

Merci...

DJEBALA S

TAOURI A

Dédicace

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

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

Spécialement mes cher parents, mes frères (Hakim, Lyes, sa femme et son petit enfant), mes sœurs (Lynda, Lila, leurs maris et enfants, Dalila) et à toute ma famille.

À mes amis et amies

À mes copains de chambre, Zoheir et Mahmoud

À mon binôme Aziz et sa famille

Je leurs dédie ce travail en signe de reconnaissance et de respect.

DJEBALA S.

Dédicace

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

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

Spécialement à ma mère, à mon adorable mère, à celle qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour t'être sacrifiée pour que tes enfants grandissent et prospèrent. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de l'âge, de la santé, de la vie, au bien-être de tes enfants. Enfin ! Merci tout simplement d'être... ma mère.

A mon père, le symbole de la bonté, c'est toi qui m'as défini le sens de cette vie.

*A mes frères (Kamel et sa femme Rabéa, Samir ; merci d'être toujours à mes cotés), mes sœurs (Djamila, Baya, et Nadia), ma grand-mère je la souhaite et longue vie, ainsi à toute la famille **TAOURI** et **KADI**.*

À mes amis de l'enfance (SAID, FARID, AZIZ, AHMED, YUCEF, SALIM) et tout mes amis et amies.

À mes copains de chambre Zoheir et Mahmoud

À mon binôme Salem et sa famille

À toutes personnes qui m'aiment ; sans les citer ; je dédie ce travail en signe de reconnaissance et de respect.

TAOURI A

LISTE DES FIGURES

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|---|----|
| Figure 1 : protocole de synchronisation des chaleurs chez les receveuses..... | 25 |
| Figure 2 : protocole de traitement de super ovulation des brebis du lot 1..... | 26 |
| Figure 3 : protocole de prétraitement par la GnRH et de super ovulation du lot 2..... | 27 |
| Figure 4 : Distribution des débuts d'oestrus chez les brebis du lot 1..... | 30 |
| Figure 5 : Distribution des débuts d'oestrus chez les brebis du lot 2..... | 30 |
| Figure 6 : Distribution des débuts d'oestrus chez les brebis receveuses..... | 31 |
| Figure 7 : Schéma de montage des embryons en paillettes pour une Congélation..... | 38 |
| Figure 8 : Embryons de différentes classes | 43 |

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : résultats comparatifs entre la saillie naturelle+insémination artificielle et la saillie naturelle seule..... | 07 |
| Tableau 2 : classification des embryons selon leurs qualités | 09 |
| Tableau 3 : Fertilité et taux de mise bas après un transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis selon le type d'embryon utilisé | 11 |
| Tableau 4 : Variation du taux d'ovulation selon l'âge..... | 14 |
| Tableau 5 : Variation de la réponse ovulatoire selon les races après traitement de super ovulation..... | 15 |
| Tableau 6 : Production d'embryons chez la brebis en fonction du traitement | 19 |

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Poids, âge et note d'état corporel (NEC) des brebis donneuses..... | 21 |
| Tableau 2 : Races, poids, âge et note d'état corporel (NEC) des brebis receveuses... | 22 |
| Tableau 3 : races, âges, poids et note d'état corporel (NEC) des béliers..... | 22 |
| Tableau 4 : Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les donneuses..... | 29 |
| Tableau 5 : Début des signes d'oestrus chez les receveuses..... | 31 |
| Tableau 6 : Réponse ovulatoire après traitement de superovulation Chez les receveuses..... | 32 |
| Tableau 7 : Réponse ovulatoire après traitement de synchronisation chez les brebis donneuses..... | 33 |
| Tableau 8 : Nombre et moyenne des structures récoltées par corne et par brebis..... | 40 |
| Tableau 9 : Taux de récupération d'embryons..... | 41 |
| Tableau 10 : Qualité des structures récoltées. Morula (M), Blastocyste (B), œuf non fécondé (NF), embryon dégénéré (D)..... | 42 |
| Tableau 11 : Taux de fécondité | 43 |
| Tableau 12 : Taux des embryons transférables..... | 44 |
| Tableau 13 : Taux de gestation..... | 44 |
| Tableau 14 : Taux de viabilité des embryons transférés | 45 |

LISTE DES PHOTOS

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|----|
| Photo 1 : Démembrement des corps jaunes réalisé sous endoscopie..... | 33 |
| Photo 2 : instruments et produits utilisés pour la récolte des embryons..... | 35 |
| Photo 3 : Montage des embryons en pipette en verre pour un transfert direct..... | 37 |
| Photo 4 : dénombrement des corps jaunes après extériorisation de l’ovaire..... | 40 |
| Photos 5 : Ovocyte non fécondé de classe 4..... | 42 |
| Photos 6 : Embryons dégénérés de classe 4..... | 43 |
| Photos 7 : Blastocystes en expansion..... | 43 |
| Photos 8 : Blastocyste de classe 1..... | 43 |
| Photo 9 : Image échographique présentant une gestation gémellaire chez la brebis R1 | 45 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--------|--|
| CIDR: | Controlled Internal Drug-Releasing device |
| CJ: | Corps jaune |
| Cm: | Centimètre. |
| Coll : | Collectés |
| EB : | Embryons |
| eCG: | equine Chroninc Gonadotropin. |
| FGA: | Acétate de fluorogestone. |
| FSH: | Follicule Stimulating Hormone. |
| GnRH: | Gonadotrophin Releasing Hormone. |
| H : | Hamra |
| HAP: | Horse Anterior Pituitary. |
| HMG: | Human Menopausal Gonadotrophine. |
| IA: | Insémination Artificielle. |
| IETS: | International Embryo Transfer Society. |
| IM: | Intramusculaire. |
| INRA: | Institut Nationale des Recherches Agronomique. |
| IRE: | Intervalle retrait d'éponge |
| IV: | Intraveineuse |
| J: | Jours. |
| Kg: | Kilogramme |
| LH: | Luteinizing Hormon |
| MAP: | Medroxyprogesterone |
| Mg: | Milligramme. |
| MHZ: | Mégahertz |
| MI: | Millilitre |
| Mm: | Millimètre |
| Nb: | Nombre. |
| ND: | Nom Déposé. |
| NEC: | Note d'Etat Corporel. |
| OD : | Ouled Djellal |
| oFSH: | ovine Follicule Stimulating Hormone. |

| | |
|-----------------|--|
| OVD: | Ovaire droit |
| OVG: | Ovaire gauche |
| PBS: | Phosphate Buffered Saline. |
| pFSH: | porcine Follicule Stimulating Hormone. |
| PGF2 α : | Prostaglandine F2 alpha. |
| pLH : | porcine Luteinizing Hormone. |
| PMSG : | Prégnant Mare Sérum Gonadotrophine. |
| Rg : | Régime. |
| Trans : | Transférable |
| UA : | Unité Armour |
| UI : | Unité International |
| UNCEIA : | Union National des Coopératives d'Elvage et Insémination Artificielle. |

RESUME

Dans les programmes de production d'embryons *in vivo* chez les ovins, l'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation ovarienne étant le facteur principal de la variation de la réponse au traitement de FSH. Cependant, l'amélioration du rendement de cette production peut être obtenue par l'usage d'un agoniste ou antagoniste de la GnRH. L'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet d'un prétraitement par un agoniste de GnRH sur la production *in vivo* d'embryons chez les brebis de race Ouled Djellal.

Notre travail a concerné (16) brebis, de race Oulad Djellal, dont (10) donneuses et (06) receveuses. Toutes les brebis ont été synchronisées par la pose d'éponges vaginales imprégnées de 40 mg de FGA, pendant 14 jours. Les donneuses ont été réparties en deux lots : le lot1 (n= 05) n'a pas reçu de GnRH et le lot 2 (n=05) a reçu de la GnRH, pendant 14 jours. La superovulation a été induite durant les derniers jours du traitement progestagène, chez les lots 1 et 2, avec 20UA et 32 UA de FSHp, respectivement. Les brebis superovulées ont reçues de la FSHp enrichie de LHp lors des deux dernières injections. L'ovulation a été induite par injection en IV de LHp chez les brebis du lot 2. La fécondation a été obtenue par l'utilisation de la saillie et l'insémination intra utérine, et la récolte des embryons a été effectuée par la voie chirurgicale.

Nos résultats montrent que comparativement au lot1 la réponse ovarienne est significativement plus élevée chez les brebis du lot 2 ($8,2 \pm 4,08$ vs $17,50 \pm 5,91$ CJ, $p < 0,05$). La durée des chaleurs a été significativement plus longue chez les brebis du lot 2 ($35,2 \pm 6,57$ vs $52h \pm 9,79$ h, $p < 0,05$). Le taux moyen de structures récoltées et le nombre moyen d'embryons transférable ont été nettement supérieures chez les brebis du lot 2 (taux de structures récoltés : 61% vs 75,71%), (nombre moyen d'embryons transférables : $4 \pm 1,22$ vs $12 \pm 6,26$). L'examen échographique effectué, chez les receveuses, 40 jours après le transfert des embryons a révélé un taux de gestation et de viabilité de 50% et 41,66% respectivement.

Chez les brebis Ouled-Djellal, l'administration du prétraitement agoniste de GnRH a permet d'augmenter la réponse ovulatoire au traitement de superovulation FSHp et le rendement de la production *in vivo* d'embryons est élevé.

Mots clés :

Agoniste de GnRH, brebis, Ouled Djellal, superovulation, embryons.

ABSTRACT

In programs embryo production in vivo in sheep, the condition of the population begins when follicular ovarian stimulation is the main factor of variation in the response to FSH treatment. However, the improvement of production yields can be obtained by use of an agonist or antagonist of GnRH. The aim of our study was to evaluate the effect of pretreatment with a GnRH agonist on the in vivo production of embryos in ewes Ouled Djellal.

Our work is concerned (16) sheep, bred Oulad Djellal, including (10) and donors (06) recipients. All ewes were synchronized by insertion of vaginal sponges impregnated with 40 mg FGA, for 14 days. The donors were divided into two groups: the box: 1 (n = 05) received no GnRH and Lot 2 (n = 05) received GnRH for 14 days. Superovulation was induced during the last days of progestagen, in lots 1 and 2, with 20uA FSHp and 32 UA, respectively. Ewes were superovulated received the FSHp enriched LHp in the last two injections. Ovulation was induced by IV injection of LHP ewes of Lot 2. Fertilization was achieved by the use of mating and intrauterine insemination and embryo collection was performed by a surgical approach.

Our results show that compared to a lot of ovarian response was significantly higher in ewes of Lot 2 (8.2 ± 4.08 vs. 17.50 ± 5.91 CJ, $p < 0,05$). The duration of oestrus was significantly longer in ewes of Lot 2 (35.2 ± 6.57 vs. $52h \pm 9.79$ h, $p < 0,05$). The average structures harvested and the average number of embryos transferred were significantly higher in ewes of Lot 2 (rate structures harvested: 61% vs. 75.71%) (average number of transferable embryos: $4 \pm 1,22$ vs $12 \pm 6,27$). Ultrasound examination performed, among recipients, 40 days after transfer of embryos showed a pregnancy rate and viability of 50% and 41.66% respectively.

Ewes Ouled Djellal, administration of GnRH agonist pretreatment can increase the ovulatory response to superovulation treatment FSHp and efficiency of embryo production in vivo is high.

Keywords:

GnRH agonist, sheep, Ouled Djellal, superovulation, embryo.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cheptel ovin occupe une place très importante dans l'économie nationale, son effectif est estimé à 18.293.000 têtes dont près des 2/3 sont des femelles (Ministère de l'Agriculture, 2005). La production des viandes rouges est estimée à 355 000 tonnes/an dont 40 % provient des viandes ovines, néanmoins son coût reste relativement cher et inaccessible pour les bourses moyennes.

Parmi les principales races locales actuellement connues et dont le standard est bien défini (Chellig, 1992), la race Ouled - Djellal est la plus importante numériquement et la plus intéressante économiquement. Elle représente 8 605 552 têtes du total des ovins, et constitue 50% du cheptel national (Ministère de l'Agriculture, 2005). Cette race est connue par sa rusticité, sa vocation « bouchère » et son adaptation aux parcours. 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 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 le progrès génétique.

Chez les brebis superovulées avec FSH, le nombre d'ovulations est positivement corrélé au nombre de petits follicules (1-2 mm) et négativement affecté par la présence de gros follicules présents sur les ovaires au début de la stimulation gonadotrope (Brebion *et al.*, 1992 ; Gonzalez- Bulnes, 2002).

La possibilité d'accroître le nombre de follicules recrutables avant le traitement de superovulation par inhibition temporaire de la croissance folliculaire terminale a fait l'objet de nombreux travaux chez la brebis durant ces quinze dernières années (Cognié *et al.*, 2003). En effet, l'inhibition des sécrétions endogènes de LH et FSH par administration d'un analogue de GnRH (Baril *et al.*, 2004) ou un antagoniste de GnRH (Baril *et al.*, 2004; Lopez-alonso *et al.*, 2005) permet d'augmenter de 50% la réponse ovulatoire et de doubler le nombre d'embryons transférables par brebis traitée (Brebion *et al.*, 1989 ; Cognié *et al.*, 2003).

Dans ce contexte, s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'effet d'un prétraitement par un analogue de la GnRH sur la production *in vivo* d'embryons chez les brebis de race Ouled Djellal.

Etude bibliographique

Etude bibliographique

CHAPITRE I :

LES TECHNIQUES DE PRODUCTION ET DE TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LA BREBIS

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 (Clément, 2006).

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. La synchronisation des chaleurs :

Deux agents sont fréquemment utilisés pour synchroniser l'œstrus dans les protocoles de superovulation chez les petits ruminants :

a. La progestérone et progestagènes:

La progestérone ou ces analogues, dits, progestagènes sont administrés oralement, sous forme d'implants sous-cutanés, ou par moyens des éponges intravaginales et des CIDR® (Controlled Internal Drug-Releasing device) (Hansel et Convey, 1983), d'autres voies sont possible tel que l'injection ou encore addition dans l'aliment (Courot et Volland-Nail, 1991)

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) (Whitley et Jackson, 2004).

Ces produits exercent un feed-back négatif sur la sécrétion de LH et donc l'ovulation est inhibée (Hansel et Convey, 1983). 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 (Gordon, 1975; Hansel et Convey, 1983). L'ovulation est normalement déclenchée 54 h après la fin du traitement (Walker et al, 1986) et l'apparition de l'œstrus se fait dans les 48 h qui suivent le retrait (Casamitjana, 2006).

b. 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 (Ishwar et Memon, 1996) donc la synchronisation des ovulations est basée sur le fait que l'ovulation se produit environ 60 h 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 70 h après (Tibary et Manar, 1988).

L'utilisation des prostaglandines se réalise uniquement sur des brebis cyclées ou ayant eu une phase progestative (Casamitjana, 2006) c'est à dire les brebis qui sont en début ou en fin de cycle ne répondent pas au traitement (Tibary et Manar, 1988). Deux injections à 10 ou 14 jours d'intervalle de PGF₂α permettent de synchroniser l'œstrus 36 à 48 h après l'injection (Casamitjana, 2006).

III. la super ovulation :

La super ovulation consiste à injecter des hormones gonadotrophiques à des femelles quelques jours avant l'œstrus pour obtenir au moyen de son action folliculostimulante une augmentation du nombre de follicule et une accélération de leurs croissance et leurs maturation (Fernandez et Ruiz Matas, 2003)

Selon Chupin, 1988, le principe de la superovulation est de réaliser un court circuit au niveau du cycle œstrale, 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.

III.1. La nature des hormones induisant la super ovulation :

La superovulation des donneuses est induite au terme d'un traitement classique de synchronisation des chaleurs. La fonction ovarienne peut être stimulée par une variété de préparations hormonales à activité gonadotrope, comme eCG, HAP, FSHp, FSHo, HMG (Chupin, 1988). Par delà la diversité des sources hormonales citées, il existe un relatif consensus sur les principes d'une stimulation de qualité (Cognié et al., 1986):

- la durée de stimulation doit avoisiner celle de la croissance folliculaire terminale 3 jours.
- un enrichissement en LH semble nécessaire en fin de traitement (FSH/LH), conditionnant l'induction des ovulations.

III. 1. 2. Les extraits hypophysaires (FSH p, FSH o) :

Il existe sur le marché deux types d'extraits hypophysaires, un premier type provient de l'espèce porcine (FSH p), le second de l'espèce ovine (FSHo) (Cognie, 1999). Ces molécules à demi-vies courtes nécessitent des injections répétées toutes les 12 heures durant les 3 ou 4 derniers jours précédant l'apparition de l'œstrus. Leur concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et ne sont plus décelable 12 heures après l'injection (Hanzen, 2000).

La dose recommandable pour les ovins et les caprins variée entre 16 et 20 mg Armour (Brebion et al., 1992). L'expression des chaleurs aura lieu 16 à 48h après le retrait de l'éponge (Gibbons et Cueto, 1995) et les premières ovulations sont observées en moyenne $58,4 \pm 5,6$ h après le retrait de l'éponge et environ 6 h s'écoulent entre la première et la dernière ovulation (Evans et Armstrong, 1984).

III.1.2. Les extraits extra hypophysaires :

a. PMSG :

La PMSG est extraite de sérum de jument gravide entre le 42^{ème} et le 100^{ème} 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 (Hanzen, 2000).

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 (Cognié et Baril, 2002) :

- ✓ 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 PMSG entraîne l'apparition d'anticorps anti PMSG (Saumande et al., 1984), 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 (Cognie et Baril, 2002).

b.HAP :

C'est un extrait pituitaire équin qui a reçu des résultats intéressants en superovulation caprine ; cependant ceux-ci ne sont pas meilleurs qu'avec la PMSG, sa difficulté d'obtention est responsable de sa moindre compétitivité par rapport à la PMSG ou la FSH (Boris, 1999).

c.HMG :

Elle est extraite de l'urine de femmes ménopausées et est usitée en médecine humaine aux Etats unis sous le nom de PERGONALND. L'HMG (humen ménopausal gonadotrophine) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son cout est plus élevé (Hanzen, 2000).

IV. La fécondation :

Après synchronisation et super ovulation, succède la méthode de lutte. Deux méthodes peuvent être appliquées, l'insémination artificielle et la saillie naturelle (Baril et al., 1993). L'insémination artificielle permet de valoriser la semence des mâles de haute valeur génétique, la saillie naturelle ne permet pas une utilisation rationnelle des mâles.

IV.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 12heurs d'intervalle (Boukhlique, 2002). Mais cette technique n'est pas dénuée d'inconvénients :

- Il a été démontré que le transport et la survie des spermatozoïdes dans les voies femelles peuvent être perturbés après traitement progestatif associés à l'induction de la superovulation (Evans et Armstrong, 1984).

- ✓ 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 (Baril et Vallet, 1990).

IV.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 sont mises en place directement dans chaque corne utérine à l'aide d'un matériel spécifique. Cela nécessite la mise en œuvre d'une technique du type chirurgicale avec le matériel adéquat ; les animaux doivent être mis à la diète au moins deux heures avant l'insémination artificiel (Evans, 1987).

L'utilisation du sperme congelé est couramment pratiquée chez les bovins et les caprins mais elle reste encore assez limitée chez les ovins où le sperme est plus difficile à congeler. Cependant, pour les ovins l'IA s'est développée dans certains pays grâce à l'usage de la semence fraîche diluée : elle est utilisée immédiatement (moins d'une demi-journée après la récolte) chez des brebis synchronisées.

En effet, les résultats de production d'embryons varient en fonction du type de fécondation utilisé (cf. tableau 1)

Tableau 1 : Résultats comparatifs entre la saillie naturelle+insémination artificielle et la saillie naturelle seule.(Bari et al., 1999).

| 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 |

V. COLLECTE D'EMBRYONS :

Six à huit jours après le début de l'œstrus, les embryons sont collectés dans un tampon phosphate PBS. La plus part des équipes de transfert d'embryon dans l'espèce ovine préfèrent travailler entre J6 et J7, période correspondant au stade embryonnaire morula ou blastocyste et à localisation utérine (Vallet et al., 1991 ; Cognie et al., 1999, Chemineau et al., 1999).

Il existe deux techniques différentes de récolte des embryons chez les ovins : chirurgicale, laparoscopique.

V.1. Technique chirurgicale :

La laparotomie médioventrale permet de collecter aisément 72% d'embryons (taux de collecte à J6) par rapport aux CJ. Elle est aussi très accessible étant donné le peu de matériel qu'elle nécessite (Youngquist, 1997).

Les brebis sont placées à la diète hydrique un minimum de 18 à 24 h précédant la collecte. Pour la réalisation de cet acte chirurgical, la tranquillisation de l'animal est nécessaire.

L'animal une fois tranquilisé est tondu au niveau de la paroi abdominale ventrale, cranialement à la mamelle. On le place alors en décubitus dorsal avant de le préparer de façon aseptique. L'incision de laparotomie se fait au niveau de la ligne blanche juste en avant de la mamelle. Cette incision doit être d'une longueur suffisante pour extérioriser les 2 cornes utérines. Chaque corne utérine est perfusée avec 40 ml de milieu PBS dans le sens antégrade ou rétrograde. Après suture en deux plans par des points simples de la ligne blanche et de la peau, une antibioprofylaxie est mise en place (Youngquist, 1997).

V.2. Technique laparoscopique :

Cette technique fut développée afin d'améliorer les possibilités de répétition de la collecte chez les femelles donneuses permanentes (Baril et al., 1993). La collecte laparoscopique, de maîtrise plus délicate, offre un rendement moyen de 62%. Elle est basée sur presque la même méthode que la collecte chirurgicale, mais un peu différente car celle-ci est réalisée grâce à l'observation des viscères

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. Toutefois, l'avantage principal de ce procédé est sa répétitivité sur le même sujet sans diminuer le taux de collecte d'embryons (Vallet et al., 1991). De plus, les brebis récupèrent rapidement après l'intervention (Youngquist ; 1997).

VI. Recherche, tri et classification des embryons :

Les embryons récoltés entre J6 et J7 après un traitement de superovulation se présentent sous des aspects morphologiques divers. La connaissance de la chronologie du développement embryonnaire ovin fournit des points de repères nécessaires pour estimer si le stade embryonnaire observé est en rapport avec le stade de récolte ou si l'embryon à stopper son développement. (Lindener et al., 1983 ; Sakkas et al., 1989). Il est important d'apprécier la qualité des embryons avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques (Hanzen ,2000).

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

CHAPITRE I : LES TECHNIQUES DE PRODUCTION ET DE TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LA BREBIS

Une fois le stade de développement identifié, il faut estimer la qualité de cet embryon, ceci permet de fournir un pronostic sur sa viabilité. Quatre niveaux de qualité sont donnés par l'INRA-UNCEIA, 1990 et l'IETS 1998: (cf. tableau 2)

Tableau 2 : classification des embryons selon leurs qualités (d'après INRA-UNCEIA, 1990)

| Classification | Qualité | Description |
|----------------|--------------------------|---|
| 1 | Excellent | <ul style="list-style-type: none"> - embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable - blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact. |
| | Bon | <ul style="list-style-type: none"> - 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 | <ul style="list-style-type: none"> - embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomère sphérique au stade morula) ou des défauts bien précis comme : - nombreuses cellules échappées dans l'espace périvitellin, des vésicules, des cellules dégénérées blastomère de taille variable. - Aspect plus claire ou plus sombre que la normale. |
| 3 | Médiocre | <ul style="list-style-type: none"> - nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérés, de tailles différentes des vésicules grosses et nombreuses. - Mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable. |
| 4 | Mort ou dégénérés | <ul style="list-style-type: none"> - arrêt de développement à un stade précoce - cellules dégénérées. |

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

- **Qualité 1 : Excellent ou bon :** l'embryon est symétrique et sphérique ses blastomères sont uniformes en taille, couleur et densité. Le stade de développement est en adéquation avec la date de récolte. En moins 85% des cellules le composant doivent être intacte, et rattachées à la masse cellulaire (on estime le nombre de cellules extrudées dans l'espace périvitellin). La zone pellucide doit être lisse et sphérique.
- **Qualité 2 : Satisfaisante :** Irrégularités modérées concernant la forme globale de l'embryon, ou la taille, couleur ou densité de ses cellules. Au moins 50% de sa masse cellulaire doit être intacte.
- **Qualité 3 : Insuffisant :** Irrégularités majeure concernant la forme de l'embryon, ou la taille, couleur ou densité de ses cellules. au moins 25 % de sa masse cellulaire doit être intacte.
- **Qualité 4 : Mort ou dégénéré :** embryon dégénéré (développement arrêté) ovocyte non fécondé ou embryon non segmenté.

VII. Devenir des embryons :

VII.1. Transfert des embryons :

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

La laparotomie classique peut être aujourd'hui avantageusement remplacée par une technique laparoscopique au moins aussi efficace et bien mieux adaptée aux conditions de terrain. 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%. Pour un embryon décongelé et jugé viable, la survie globale est de 50-55% (Vallet et al., 1990).

VII.1.1. 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 (Youngquist, 1997). 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 (Vallet et al., 1991).

VII.1.2. 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.
- 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 du 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 3). Pour un embryon décongelé et jugé viable, la survie globale est de 50-55% (Vallet et al., 1991).

Tableau 3 : Fertilité et taux de mise bas après un transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis selon le type d'embryon utilisé (Brebion et al., 1991 ; et Naohisa et al., 1997)

| Taux | embryons | Transfert | | Auteurs |
|-----------|----------|----------------|-------------|----------------------|
| | | laparoscopique | Chirurgical | |
| Gestation | Frais | 80% | 88% | Brebion et al., 1991 |
| | Congelés | 90% | 45% | |
| | Frais | 38,9% | / | |
| | Congelés | 26,3% | / | |
| Mise bas | Frais | 33,3% | / | Naohisa et al., 1997 |
| | Congelés | 26,3% | / | |

VII.1.3 Facteurs de réussite du transfert embryonnaire :

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 :

1- 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 (Baril et al., 1993). 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 » (Bari et al., 2003).

2-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 (Armstrong et Evans, 1983).

3-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.

4-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 (Sugie et al., 1989).

5-La synchronisation donneuses/receveuses:

Meilleure est la synchronisation entre donneuse et receveuse, meilleur est aussi le taux de réussite du transfert.

6-La réponse ovulatoire de la receveuse:

La qualité des corps jaune doit être prise en compte. Des receveuses présentant des corps jaunes ayant un développement trop tardif sont refusées.

VII.2. 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 (Hansen, 2009). 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 (Guérin et al., 1996).

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. Plusieurs techniques sont utilisées pour la cryoconservation des embryons, seule la congélation lente sera abordée dans ce chapitre. Le principe de la congélation lente est l'équilibration progressive entre le cryoprotecteur et le compartiment aqueux de l'embryon appelée aussi congélation par équilibre (Guignot, 2005).

La première étape de la congélation consiste à équilibrer l'embryon dans sa solution de PBS. La seconde étape visera à conditionner la solution PBS-glycérol renfermant l'embryon dans une paillette de 0.25 ml. Pour ce faire la solution est aspirée tout en séparant la partie renfermant l'embryon par deux bulles d'air. Lors d'une troisième étape, la paillette est transférée dans l'appareil à congélation et refroidie jusque -7°C à la vitesse de 1 à 3°C par minute. La paillette est alors maintenue pendant 5 à 7 minutes à cette température pour la stabiliser. La quatrième étape consistera à provoquer la cristallisation par seeding. Pour ce faire on heurtera la ou les paillettes ou le liquide de refroidissement au moyen d'une pince par exemple. Lors de la cinquième étape, la paillette est refroidie de -7°C à -35°C à raison de 0,3 à $0,6^{\circ}\text{C}$ par minute. Cette température semble être optimale pour obtenir un compromis entre déshydratation et formation de glace intracellulaire. Lors de la sixième étape, la paillette est plongée dans l'azote liquide à -196°C (Hanzen, 2009).

CHAPITRE II:

LIMITES ET AMELIORATION DE LA PRODUCTION *IN VIVO* D'EMBRYONS CHEZ LES OVINS

I.1. Les limites de la production d'embryon *in vivo* :

Malgré les améliorations apportées à la technique de production d'embryons *in vivo* chez les ovins et les caprins, certaines limites de cette technique peuvent provoquer une variabilité de la réponse au traitement hormonal (Cognié, 1999). En effet, Les faibles réponses au traitement FSH chez les femelles superovulées (20 % de brebis présentent <5ovulations) constituent un facteur limitant du transfert embryonnaire (Cognié et Baril, 2002). La variabilité est liée à des facteurs intrinsèques de l'animale aussi bien qu'extrinsèques (Baril et al, 1993 ; Cognié ,1999).

I.1.1. Facteurs intrinsèques :

Le facteur intrinsèque de chaque animal joue un rôle primordial dans la réponse au traitement de superovulation (Donaldson, 1984).

a. Age :

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 (Hanzen, 2000). En revanche, les résultats rapportés par Forcada et al., 2000; Simonetti et al., 2008; Bartlewski et al., 2007, la réponse ovulatoire est plus importante chez les brebis adultes que celle des plus jeunes (cf. tableau 4). L'âge peut influencer aussi la qualité et la survie des embryons, Dingwall et al., 1993, rapportent que ces paramètres étaient inférieurs chez les brebis plus jeunes. Par contre, Wolf et Mylne (1994) n'ont trouvés aucune différence dans les taux d'ovulations et de récolte d'embryons pour les brebis Texel âgées et celles d'un an, mais la qualité d'embryons et leur survie ont tendance à être inférieures chez les donneuses plus jeunes.

Tableau 4 : Variation du taux d'ovulation selon l'âge chez les brebis superovulées.

| Age des brebis (années) | Type du traitement | Nombre de corps jaune | Nombre d'embryon | Auteurs |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| 2 à 6 | oFSH | 6,2±1,1 | 1,4±0,40 | Simonetti et al .,2008 |
| | pFSH | 8,05±3,8 | 4,9±1,03 | Giovanni et al .,2001 |
| | oFSH | 10,60±1 | 5,20±0,80 | Loroleiro et al .,2002 |
| 4 à 7 | FSH/eCG | 9,9 | 2,5 | Berthwski et al .,2007 |
| | pFSH | 11,2±8 | 9,1±8 | Gonzalez et al ., 2003 |
| Plus de 8 | oFSH | 11,4 | 5,3 | Forcada et al ., 2000 |

b. Race:

Il apparaît que l'on n'obtient pas les mêmes résultats de superovulation chez toutes les races (cf. tableau 5), cela a été montré par Armstrong et Evans (1983) qui ont constatés que

CHAPITRE II: LIMITES ET AMELIORATION DE LA PRODUCTION *IN VIVO*
D'EMBRYONS CHEZ LES OVINS

les brebis Romney Marsh présentent une plus faible réponse au traitement pFSH, par rapport aux brebis de race Mérinos. De plus, l'administration de 16 mg de FSH porcine, la réponse ovulatoire des brebis de race Lacaune est inférieure à celle des brebis prolifiques Romanov x Préalpe (Torres et al., 1984). 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 (Castonguay et al., 1996).

Tableau 5 : Variation de la réponse ovulatoire selon les races après traitement de super ovulation.

| Race | Type du traitement | Nombre de CJ | Nombre d'embryon | Auteurs |
|----------------------|--------------------|--------------|------------------|-------------------------|
| Rombouillet | pFSH | 9,4±2,4 | 5 | Naqvi et Gulyani., 1999 |
| Santa Inés | pFSH | 10,6±1 | 5,2±8 | Gordeiro et al., 2002 |
| Mérino espagnol | pFSH | 9,5±6 | / | Gonzalez et al., 2000 |
| Sarda | pFSH | 8,05±3,8 | 4,9±1,03 | Giovanni et al., 2001 |
| Targhée /Rombouillet | FSH/LH (10%) | 16±0,5 | / | Anna et al., 2007 |
| Manchega | pFSH | 11,1±1,1 | 4,3±1,4 | Gonzalez et al., 2003 |
| Corriedale | oFSH | 6,2±1,1 | 1,4±0,4 | Simonetti et al., 2008 |
| Lacaune | pFSH | 12±1,5 | / | Torres et al., 1984 |

c. Nombre et taille des follicules :

L'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation ovarienne étant le facteur principal de variation de la réponse à FSH (Saumande, 1995)

Chez la brebis superovulée, le nombre d'ovulations est positivement corrélé ($r = 0,7$) au nombre de petits follicules (de 1-2 mm) (Gibbons et Cueto, 1995) et négativement affecté par la présence de gros follicules (> 6 mm) présents sur les ovaires au début de la stimulation gonadotrope (Brebion et al., 1992 ; Gonzalez-Bulnes, 2002; Bartlewski et al., 2008) (cf tableau) ou par la présence/absence de corps jaunes au début et/ou pendant le traitement de superovulation (Gonzalez-Bulnes et al., 2002). Les mêmes constatations ont été signalé par Gonzalez-Bulnes et al (2003) qui rapportent que le nombre total de follicules (2 à 4 mm de diamètre) dans l'ovaire au début du traitement (9.1 ± 0.7) a été positivement corrélé avec le taux d'ovulation ($P < 0.05$, $r = 0.591$), avec le taux de récolte et le nombre d'embryons viables.

I.1.2. Facteurs extrinsèques :

a. 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 (Torres et al., 1984). Le stade sexuel influe également le nombre moyen d'œufs par brebis, ce nombre a été plus élevé dans la saison de reproduction par rapport à la période d'œstrus (Torres et al., 1984). 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 (Baril et Vallet., 1990).

b. Facteur nutritionnel :

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

Il a été constaté que les brebis souffrant de sous alimentation durant le traitement de superovulation pourraient présenter un effet de lutéolyse prématuré du corps jaune (Jabbour et al., 1991).

c. Le choix d'hormone:

Le choix d'hormones gonadotrophiques pour le protocole de superovulation est d'une importance capitale. Il a été démontré que l'utilisation de la FSHp permettait l'obtention d'un grand nombre d'ovulations et d'embryons transférables supérieurs aux nombres obtenus par l'utilisation d'eCG (Cognie et al., 1984). 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 (Ware, 1985 ; Moore, 1974 ; Ryan et al., 1991).

d. Doses utilisées :

L'induction de la superovulation est tributaire de la dose de FSH administrée (Chupin, 1988). 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, la dose optimale semble

comprise entre 12 et 24 mg de pFSH qui représentent les doses idéales pour l'obtention d'un nombre élevé d'embryons. Mais les doses les plus souvent utilisées sont comprises entre 16 et 20 mg (Brebion et al., 1992). Les résultats obtenus (en terme de taux de production d'embryons) en utilisant les doses précédemment citées sont étroitement liés au génotype de la brebis donneuse

e. Le rapport FSH / LH :

Dans les conditions physiologiques, ce rapport évolue au cours du cycle, avec une diminution à l'approche de l'ovulation (Bono et al., 1983). 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 (Murphy et al., 1984) ; inversement, si le rapport FSH/LH est trop faible par manque de FSH, l'œstrus est retardé et les résultats baissent (Gonzalez, 1984). 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 (Cognié et al., 1986). Il convient donc, pour avoir les meilleurs résultats possibles, de bien contrôler l'évolution de ce rapport jusqu'à l'ovulation (Cognié et al., 2003).

Des études précédentes ont montrés qu'une évolution décroissante du rapport FSH/LH permettait d'obtenir de meilleurs résultats à contre saison. (Cognié et al., 1986) Proposent un protocole avec un rapport diminuant de 56/10 à 14/94 sur 3 jours : le taux de brebis ovulant passe de 1 sur 10 avec un traitement normal, à 10 sur 11 avec ce protocole. D'autres auteurs, préfèrent modifier le rapport uniquement au moment de la dernière injection, passant d'un rapport de 8 à 0.4 ou 0.13 (Brebion et al., 1992)

f. Technique d'insémination et de récolte :

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 limitée par la variabilité du moment de l'ovulation par rapport à l'insémination artificielle (Cognié et Baril., 2002).

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 (Evans et Armstrong, 1983, 1984). Cependant le dépôt de la semence 48 à 50h après le retrait d'éponge dans les cornes utérine permet des taux de fécondation élevé chez les donneuses ayant de moins de 30 ovulations (Baril et Cognié, 2002). Le taux de récupération des embryons par

laparoscopie atteint 62% contre 85% par technique chirurgicale mais la formation d'adhérence est bien plus importante lors d'une laparotomie que par laparoscopie (Baril et al., 1987).

g. Répétition des traitements de superovulation :

Chez la brebis ,avec un intervalle de 2 mois entre traitement FSHp successifs ,une diminution significative de la réponse n'est observée qu'à partir du quatrième traitement (Brebion et al., 1991). Bien que non clairement identifiée chez les ovins ,l'apparition d'anticorps anti-FSH pourrait être la cause de cette diminution de la réponse comme cela a été montré chez la brebis traitée de façon répétitive avec FSHp ,chez la quelle une forte corrélation négative existe entre le titre d'anticorps et le nombre d'ovulation(Remy et al., 1992) .En revanche , Forcada et al., (1999) rapportent qu'aucune diminution significative de la réponse n'a été observée chez la brebis de génotype croisé hyperprolifique Boorola×Romanov traitée 6-7 fois a intervalles de 60 j par 20 mg FSHp .

I.2. Amélioration de la production d'embryon *in vivo* chez la brebis:

Les solutions techniques aux impératifs physiologiques qui régissent la réalisation du transfert d'embryons chez les petits ruminants sont en constante évolution. La possibilité d'accroître le nombre de follicules recrutables avant le traitement de superovulation par inhibition temporaire de la croissance folliculaire terminale a fait l'objet de nombreux travaux chez la brebis durant ces quinze dernières années (Baril et al., 2004). Des travaux ont montré l'intérêt des prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH pour accroître la production d'embryons *in vivo* chez la brebis Lacaune. Ces protocoles de stimulation ont permis de sauver de l'atrésie la plupart des follicules de la cohorte ayant débuté leur croissance (Fishel et al., 1985) et d'accroître significativement le rendement de la superovulation (Brebion et al., 1991). Chez les caprins, l'inhibition de la croissance folliculaire terminale par administration du prétraitement anti-GnRH permet d'augmenter la réponse ovulatoire au traitement FSH. En revanche, cet effet positif est annulé par un accroissement des taux d'œufs non fécondés et d'embryons dégénérés ayant pour conséquence une faible production d'embryons *in vivo* chez les chèvres prétraitées.

I.2.1. Utilisation de la GnRH :

a. Agoniste 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 du GnRH induit initialement une libération de LH et FSH ("flare-up") puis l'effondrement de la sécrétion des

gonadotrophines (Brebion et al., 1991). Utilisée seule, une injection de GnRH peut induire l'ovulation dans une population de brebis cyclées, par sécrétion de LH (Ricoardeau et al., 1984). 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 (Cognié et al., 2003).

b. Anti GnRH :

Ces molécules bloquent les récepteurs du 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 (Frydman et al., 1991, 1992).

L'utilisation de ces produits se fait par un traitement de 11 jours avant l'administration de FSH (Brebion et al., 1992) (cf. tableau 6). Ils peuvent être également utilisés avec une injection unique 12 h après le retrait des éponges (Baril et al., 1996); 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 6 : Production d'embryons chez la brebis en fonction du traitement (Baril et al., 2004; Lopez-Alonso et al., 2005 ; Bensaid et al., 2004).

| GnRH Utilisée | Rg d'inj | Production d'embryons | | | | Auteurs |
|------------------|----------|-----------------------|-------------|------------|------------------|-----------------------------|
| | | CJ | Œufs Coll % | EB Trans % | EB Trans /Brebis | |
| Anti GnRH | 11 inj | 20,6±10,2 | 76 | 85 | 12,0 ± 7,8 | Baril et al., 2004 |
| 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 | Lopez - alonso et al., 2005 |
| Analogue de GnRH | 14 inj | 15±7,8 | 64 | 46 | 5,7±6,3 | Bensaid et al ., 2004 |
| | 60 j | 14,4±7,2 | 68 | 71 | 5,7±5,2 | |

OBJECTIFS

OBJECTIFS

OBJECTIF

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 in vivo d'embryons, l'effet 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
- Taux de survie des embryons après transfert

Partie expérimentale

Partie expérimentale

CHAPITRE I:

**EFFET D'UN
PRETRAITEMENT PAR UN
AGONISTE DE LA GNRH
SUR LE COMPORTEMENT
D'OESTRUS ET LA
REPONSE OVARIENNE**

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE

I- LIEU ET PERIODE DE L'EXPERIMENTATION :

Notre étude expérimentale c'est déroulée au niveau de la station expérimentale de l'université « Saad Dahleb » de Blida durant la période allant du 04 Mai 2009 au 30 Novembre 2009.

II- MATERIEL ET METHODES :

II.1. Matériel :

II.1.1. Animaux :

II.1.1.1. Brebis :

Seize (16) brebis vides ont été sélectionnées pour la réalisation de notre travail, dix (n=10) brebis donneuses de race Ouled Djellal et Six (06) brebis receveuses dont trois brebis (R1, R2, R3) de race Ouled Djellal et trois brebis (R4, R5, R6) de race Hamra.

a. Les donneuses d'embryons :

Les renseignements relatifs à l'identification des brebis donneuses sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Poids, âge et note d'état corporel (NEC) des brebis donneuses.

| Brebis | | Poids (kg) | Age (mois) | NEC |
|--------|-----------------------|-------------|--------------|----------|
| lot 1 | D1 | 62 | 24 | 3,5 |
| | D2 | 40 | 24 | 2,5 |
| | D3 | 55 | 24 | 2,5 |
| | D4 | 52 | 48 | 2,5 |
| | D5 | 46 | 48 | 2 |
| | Moyenne et écart type | 51 ± 8,42 | 33,6 ± 13,14 | 2,6±0,54 |
| lot 2 | D6 | 53 | 54 | 2,5 |
| | D7 | 55 | 48 | 2,5 |
| | D8 | 43 | 18 | 2 |
| | D9 | 44 | 24 | 2 |
| | D10 | 41 | 36 | 2 |
| | Moyenne et écart type | 47,2 ± 6,43 | 36 ± 15,29 | 2,2±0,27 |

CHAPITRE I : EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE

Les donneuses du lot n° 1 présentent un poids moyen de $51 \pm 8,42$ kg et un âge moyen de $33,6 \pm 13,14$ mois. Les brebis du lot n°2 présentent un poids moyen de $47,2 \pm 6,43$ kg et un âge moyen de $36 \pm 15,29$ mois

b. Les receveuses :

Les renseignements relatifs à l'identification des brebis receveuses sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Races, poids, âge et note d'état corporel (NEC) des brebis receveuses

| Brebis | Race | Poids (kg) | Age (mois) | NEC |
|-----------------------|------|------------|------------|-----------|
| R1 | OD | 54 | 30 | 2,5 |
| R2 | OD | 60 | 48 | 3 |
| R3 | OD | 43 | 18 | 2 |
| Moyenne et écart type | | 52,33±7,71 | 32±15,09 | 2,5±0,5 |
| R4 | H | 39 | 24 | 2 |
| R5 | H | 30 | 12 | 2 |
| R6 | H | 42 | 24 | 2,5 |
| Moyenne et écart type | | 37±6,24 | 20±6,92 | 2,16±0,28 |

Les receveuses de race Ouled Djellal présentent un poids corporel moyen de $52,33 \pm 7,71$ kg et un âge moyen de $32 \pm 15,09$ et celle de race Hamra présentent un poids moyen de $37 \pm 6,24$ et un age moyen de $20 \pm 6,92$ kg.

II.1.1.2. béliers :

Cinq béliers sont utilisés ; trois béliers (B1, B2, B3) de race Oulad Djellal et deux béliers (B4, B5) de race Hamra. Les renseignements relatifs à leurs identifications sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : races, âges, poids et note d'état corporel (NEC) des béliers.

| Béliers | Race | Poids (kg) | Age (ans) | NEC |
|-----------------------|------|------------|-----------|---------|
| B1 | OD | 59 | 7 | 3 |
| B2 | OD | 73 | 5 | 3,5 |
| B3 | OD | 81 | 4 | 4 |
| Moyenne et écart type | | 71±11,13 | 5,33±1,52 | 3,5±0,5 |
| B4 | H | 70 | 8 | 3,5 |
| B5 | H | 62 | 3 | 3,5 |
| Moyenne et écart type | | 66±5,65 | 5,5±3,53 | 3,5 |

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

Les béliers de race Ouled Djellal présentent un poids corporel moyen de $71 \pm 11,13$ kg avec un âge moyen de $5,33 \pm 1,52$ années et ceux de race Hamra présentent un poids corporel moyen de $66 \pm 5,65$ et un âge moyen de $5,5 \pm 3,53$ années.

L'ensemble des animaux séjournèrent dans une bergerie sous un éclairage naturel et ont reçu de l'eau et du foin à volonté complété avec 500g de concentré /jour/animal. Un déparasitage par l'administration d'ivomecND et valbasenND a été réalisé deux mois avant le début de l'expérimentation.

II.1.2. Appareillages, instruments et produits :

Afin de réaliser 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:

a. Echographe :

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

b. Endoscope :

Le matériel endoscopique utilisé comporte :

- Une optique à vision direct (0°), 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'air (STORS).
- Une pompe avec filtre et commande 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.

c. Instruments :

- Balance Marchal.
- Applicateur d'éponge vaginale.

d. 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

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

- 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 :

a. Hormones :

- **Eponge vaginale** : nous avons utilisé des éponges imprégnées de 40mg d'acétate de fluorogestone (FGA), se produit est commercialisé sous le nom de (ChronogestND)
- **FSHp et LHp** : extrait hypophysaire porcine purifié (hormones produites par l'équipe du Pr BECKERS .FMV Liège Belgique) (StimufolND).
- **PMSG** : composé de flacon de solvant et lyophilisat (1000UI). Elle est commercialisée sous le nom de (FolligonND)
- **GnRH** : agoniste de la GnRH (Busérelina) commercialisé sous le nom de (SuprefactND)

b. Antibiotiques et autres produits :

- Pénicilline/streptomycine injectable et terramycine spray ont été utilisés pour éviter les surinfections et complications.
- Biocide, alcool chirurgical, alcool iodé, Bétadine, savon de Marseille, désinfectants du matériel endoscopique
- Eau distillée, Ovixcell, NaCl 0,9 %, alcool polyvinylique.
- Vaseline et gel
- AluspréND
- Xylazine (RompunND), Xylocaine (Lidocaine 2%ND).

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

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).

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. Traitement de synchronisation et de super ovulation :

II.2.2.1. Synchronisation des chaleurs :

Avant le début de l'expérimentation, les brebis donneuses ont été réparties en deux lots : un lot témoin (lot 1 : n=05) recevant la FSHp seule et un lot prétraité (lot 2: n=05) recevant la GnRH/ FSHp.

La synchronisation de l'oestrus a été obtenue par la mise en place d'éponges vaginales imprégnées de 40 mg d'Acétate de Fluorogestone (FGA) durant 14 jours chez les donneuses et 13.5 jours chez les receveuses.

Le jour de retrait des éponges, les receveuses ont reçu une injection de 500UI de PMSG en IM. (Figure n°1).

Pose d'éponge vaginale

Retrait d'éponge vaginale.

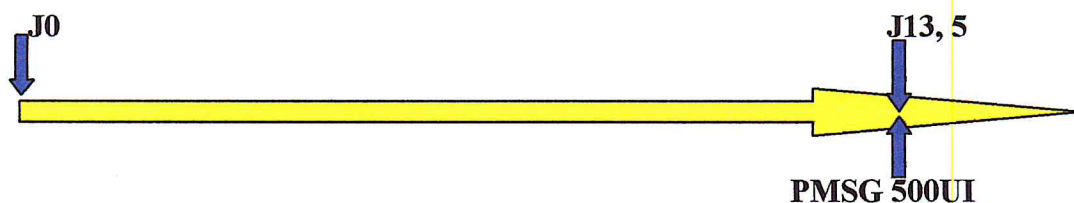


Figure 1 : protocole de synchronisation des chaleurs chez les receveuses

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE

II.2.2.2. Traitement de super ovulation :

a. Lot 1 :

La superovulation a été induite 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 jours du traitement progestagène

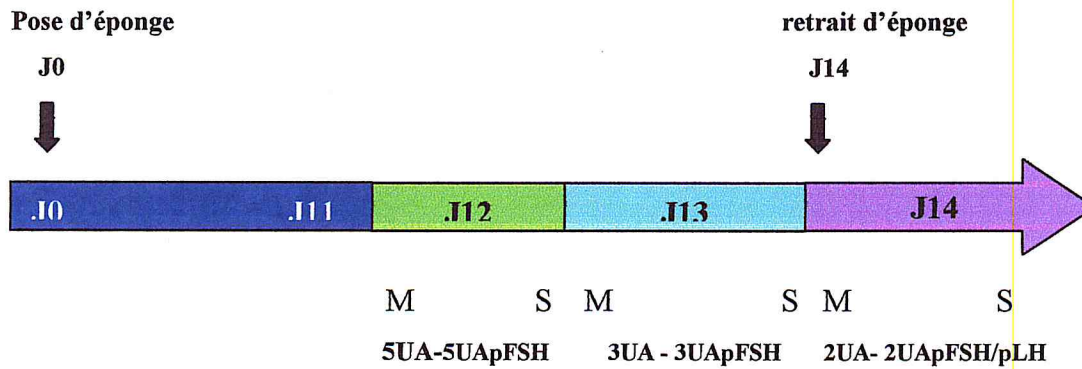


Figure 2 : protocole de traitement de super ovulation utilisé chez les brebis du lot 1.

b. Lot 2 :

La 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 chez les brebis du lot n°2.

La superovulation a été induite par l'administration d'une dose totale 32 UA de FSH porcine, répartie 8 injections biquotidiennes (12 heures d'intervalle) et décroissantes, durant les quatre derniers jours du traitement progestagène. Le rapport FSH/LH a été modifié par addition de 60 µg et 90 µg de LH porcine, lors des deux dernières injections (pour les deux lots).

L'ovulation a été induite par l'injection intraveineuse de 3 mg de LH porcine, 32 h après le retrait de l'éponge vaginale, chez les brebis prétraitées.

CHAPITRE I : EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE

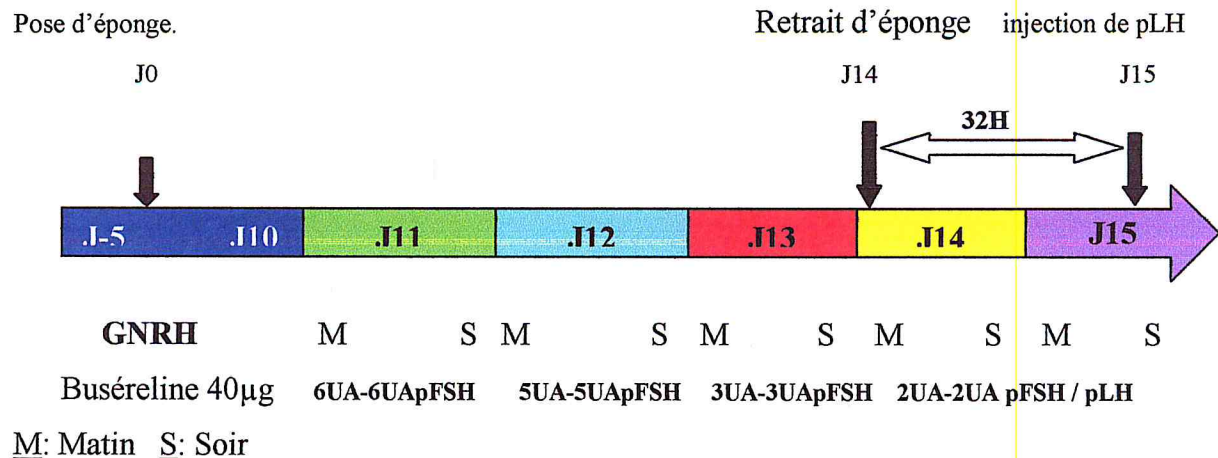


Figure 3 : protocole de prétraitement par la GnRH et de superovulation chez les brebis du lot 2.

II.2.3. Détection d'œstrus :

La détection de l'œstrus, 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.2.4. Récolte et conditionnement du sperme:

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

- Nettoyage de la verge.
- Préparation et lubrification du vagin artificiel.
- Récolte en présence d'une brebis en chaleur.
- Contrôle qualitatif et quantitatif du sperme (volume, motilité massale et individuelle, concentration).
- Dilution du sperme avec l'Ovixel.
- Mise en paillettes (0,25ml) de la semence diluée (100×10^6 spz)
- Conservation des paillettes à + 15 °C.

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE

II.2.5. 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 100×10^6 spermatozoïdes, 52 heures après le retrait de l'éponge vaginale selon la technique décrite par (Baril et al., 1993)

II.2.6. Endoscopie :

L'examen endoscopique réalisé selon la méthode décrite par (Baril et al., 1993) avait comme but la détermination de nombre de corps jaunes.

La technique consiste à faire deux incisions de la peau abdominale ventrale 5 à 7 cm cranialement à la mamelle et 3 à 4 cm latéralement de la ligne blanche, afin de pouvoir insérer deux trocars:

- Un premier trocart de 7 mm était d'abord mis en place afin de 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 5 mm était mis en place pour y insérer une pince atraumatique. Cette dernière permet la manipulation et la mesure de la taille des follicules grâce à une graduation en millimètre située à son bec.

Une fois l'ovaire (ovaire gauche ou droit) est visualisé, un dénombrement des corps jaunes a 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 de kruskal- wallis (Logiciel SYSTAT, version 10).

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

IV.RESULTATS :

IV.1.Comportement d'oestrus chez les brebis donneuses :

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

Tableau 4 : Début, fin et durée des signes d'oestrus chez les donneuses.

| Lots | Brebis | IRE- début d'oestrus(h) | IRE- fin d'oestrus (h) | Durée d'oestrus (h) |
|-------|-----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|
| Lot 1 | D1 | 16 | 60 | 44 |
| | D2 | 24 | 56 | 32 |
| | D3 | 16 | 56 | 40 |
| | D4 | 24 | 56 | 32 |
| | D5 | 28 | 56 | 28 |
| | Moyenne et écart type | 21,6 ± 5,36 | 56,8 ± 1,78 | 35,2 ± 6,57 |
| Lot 2 | D6 | 24 | 72 | 48 |
| | D7 | 24 | 64 | 40 |
| | D8 | 16 | 76 | 60 |
| | D10 | 12 | 72 | 60 |
| | Moyenne et écart type | 19 ± 6 | 71 ± 5,03 | 52 ± 9,79 |

IRE : Intervalle retraits d'éponge vaginale (heures)

NB : La brebis D9 n'a pas présentée des signes d'oestrus.

Nos résultats montrent que le début des signes d'oestrus a été précoce chez les brebis du (lot 2 : 19h ± 6 Vs 21,6 ± 5,36 lot 1). Cependant, comparativement au lot 1, la durée d'oestrus a été plus longue chez le lot 2 (52h ± 9,79Vs 35,2 ± 6,57, p<0,05).

☒ La distribution des débuts d'oestrus chez les brebis du lot 1 est représentée dans la figure 4.

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

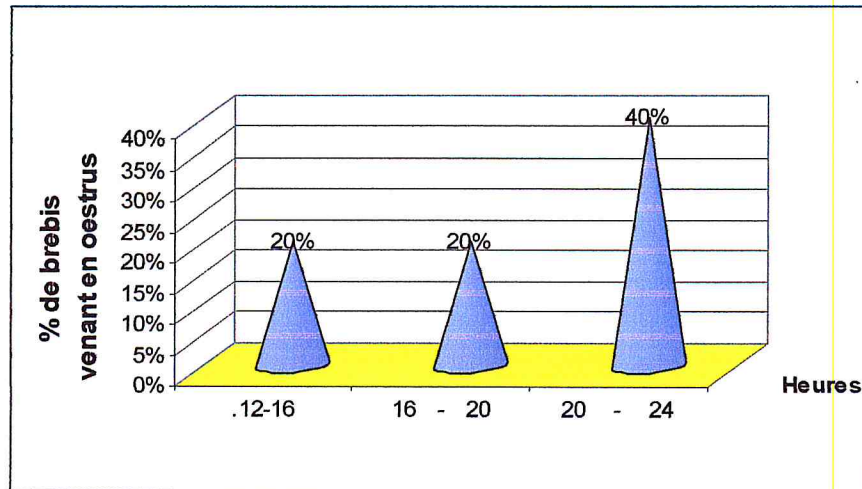


Figure 4: Distribution des débuts d'oestrus chez les brebis du lot 1.

Nos résultats montrent que le début d'oestrus a été observé chez :

- 20% des brebis entre 12 h et 16 h et le même pourcentage entre 16 h et 20 h
- 40% des brebis entre 20 h et 24 h.

☒ La distribution des débuts d'oestrus chez les brebis du lot 2 est représentée dans la figure ci-dessous:

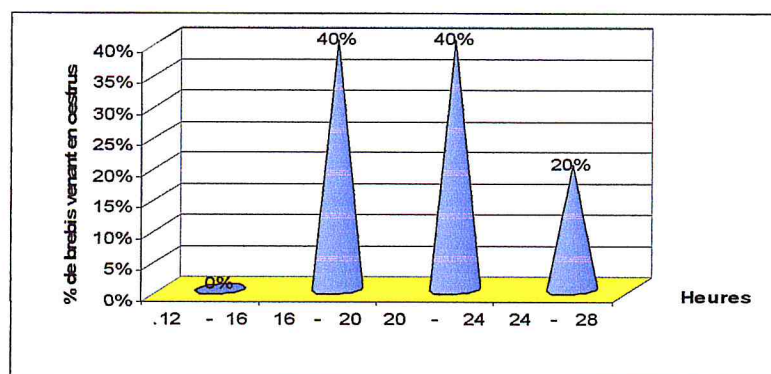


Figure 5 : Distribution des débuts d'oestrus chez les brebis du lot 2

Nos résultats montrent que le début d'oestrus a été observé chez

- 40% des brebis entre 16 h et 20 h et le même pourcentage entre 20 h et 24 h
- 20% des brebis entre 24 h et 28 h.

IV.2. Comportement d'oestrus chez les brebis receveuses :

Les résultats de la détection des signes d'oestrus chez les brebis receveuses sont présentés dans le tableau 5

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIENNE

Tableau 5 : Début des signes d'oestrus chez les receveuses.

| Brebis | IRE- début d'oestrus (heure) |
|-----------------------|------------------------------|
| R1 | 36 |
| R3 | 32 |
| R4 | 32 |
| R6 | 28 |
| Moyenne et écart type | $32 \pm 3,26$ |

Le début des signes d'oestrus a été observé en moyenne $32 \pm 3,26$ après le retrait d'éponges. Cependant, les brebis R2 et R5 n'ont pas présenté des signes d'oestrus

La distribution des débuts d'oestrus chez les brebis receveuses est représentée dans la figure ci-dessous:

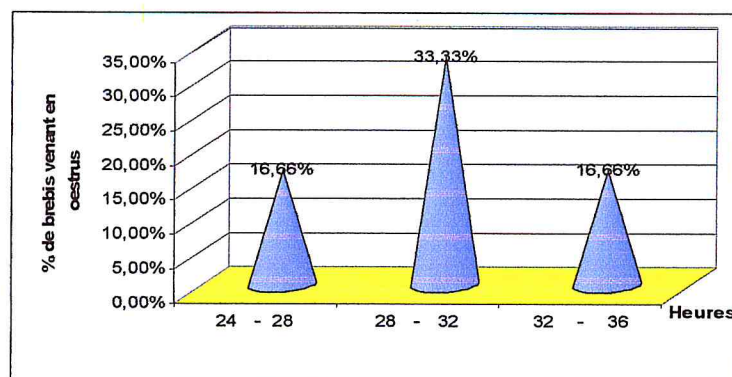


Figure 6 : Distribution des débuts d'oestrus chez les brebis receveuses

Les résultats de la figure ci-dessus montrent que le début d'oestrus a été observé chez :

- 16,66% des brebis entre 24 h et 28 h
- 33,33% entre 28 h et 32h
- 16,66% 20% des brebis entre 32h et 36 h.

IV.3. Réponse ovarienne aux traitements de synchronisation et de superovulation.

IV.3.1. Réponse ovulatoire après traitement de synchronisation chez les brebis receveuses :

Les résultats du dénombrement des corps jaunes sont représentés dans le tableau 7.

CHAPITRE I: EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPONSE OVARIENNE

Tableau 6 : Réponse ovulatoire après traitement de synchronisation chez les brebis receveuses.

| Brebis | Nombre de corps jaunes | | |
|--------------------|------------------------|---------|----------|
| | OVG | OVD | Total |
| R1 | 01 | 01 | 02 |
| R3 | 00 | 03 | 03 |
| R4 | 02 | 00 | 02 |
| R5 | 01 | 00 | 01 |
| R6 | 01 | 00 | 01 |
| Moyenne/écart type | 1±0,70 | 0,8±1,3 | 1,8±0,83 |

L'ensemble des brebis receveuses ont montré au moins un corps jaunes actif sur l'un des ovaire. La réponse ovulatoire moyenne des ovaires gauche et droit est respectivement de 1±0,70 et 0,8±1,3.

IV.3.2. Réponse ovulatoire après traitement de superovulation chez les brebis donneuses :

Les résultats du dénombrement des corps jaunes réalisé sous endoscopie juste avant la récolte des embryons, sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 7 : Réponse ovulatoire après traitement de superovulation chez les donneuses.

| Brebis | | Nombre de corps jaunes | | Total |
|---------------------------|-----|------------------------|----------|------------|
| | | OVG | OVD | |
| Lot 1 | D1 | 04 | 03 | 07 |
| | D2 | 04 | 03 | 07 |
| | D3 | 00 | 04 | 04 |
| | D4 | 05 | 03 | 08 |
| | D5 | 07 | 08 | 15 |
| Moyenne/écart type | | 5±1,41 | 4,2±2,16 | 8,2 ± 4,08 |
| Lot2 | D6 | 15 | 09 | 24 |
| | D7 | 02 | 10 | 12 |
| | D8 | 08 | 13 | 21 |
| | D10 | 06 | 07 | 13 |
| Moyenne/écart type | | 7,75±5 ,43 | 9,75±2,5 | 17,50±5.91 |

CHAPITRE II:

**EFFET DU
PRETRAITEMENT PAR UN
AGONISTE DE GNRH SUR
LE TAUX DE RECOLTE,
FECONDATION, QUALITE
ET SURVIE DES
EMBRYONS**

CHAPITRE I : EFFET D'UN PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE LA GNRH SUR LE COMPORTEMENT D'OESTRUS ET LA REPOSE OVARIEENNE

Nos résultats montrent que le nombre moyen de corps jaunes du lot 1 est plus élevé par rapport a celui du lot 2 ($17,50 \pm 5,91$ vs $8,2 \pm 4,08$, $p < 0,05$).

Corps jaunes

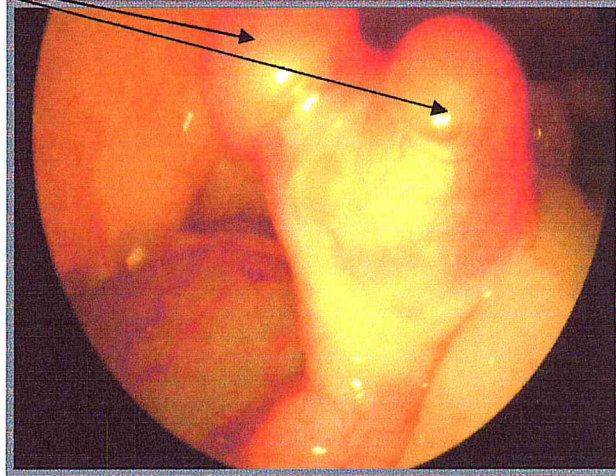


Photo 1 : dénombrement des corps jaunes réalisé sous endoscopie.

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

Ce chapitre présente les différentes étapes permettant la récolte des embryons obtenus à partir des brebis de race Ouled Djellal et leur transfert chez des brebis de race mixte.

I. Matériel et méthodes :

I.1. Matériel :

I.1.a. Animaux :

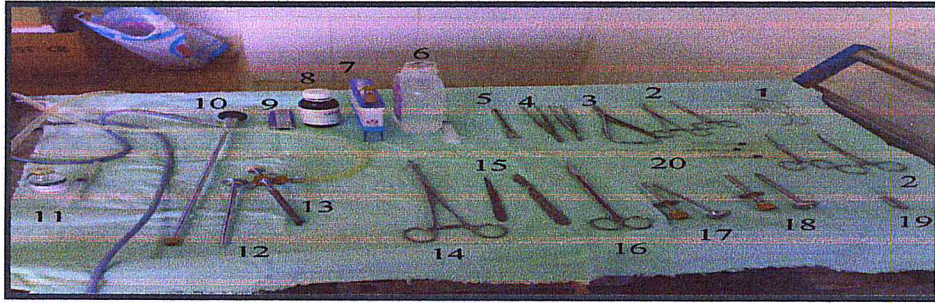
Les brebis utilisées sont les mêmes décrites dans le premier chapitre (10 brebis donneuses de race Ouled Djellal).

I.1.b. Instruments et produits :

a) Préparation du champ opératoire et soins post opératoire: le matériel utilisé pour la préparation du champ opératoire et le suivant (cf. photo 2)

- ◆ Savon et éponges.
- ◆ Rasoir et lames de rasoir.
- ◆ Lames de bistouri et portes lame.
- ◆ Porte aiguilles et aiguilles.
- ◆ Champs de tissu.
- ◆ Pincés de fixation des champs.
- ◆ Pincés hémostatiques.
- ◆ Pincés Bulldogs.
- ◆ Ciseaux et forceps.
- ◆ Sonde cannelée.
- ◆ Alcool iodé.
- ◆ Alcool chirurgical.
- ◆ Fil de suture non résorbable n°6, fil de suture résorbable Vicryl® décimale n°2 et n°5.
- ◆ Pré anesthésie (xylazine), anesthésie locale (xylocaine à 2%) et générale (ketamine).
- ◆ Antibiotique injectable (pénicilline-streptomycine) et pour la pulvérisation sur les sites de ponton abdominale.

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS



1-aiguilles de sutures, 2-pinces hémostatiques, 3- porte aiguilles, 4-pinces mouchettes, 5- Sonde cannelée, 6-NaCl, 7- Fil de suture non résorbable n°6, 8- fil de suture résorbable, 9- Lames de bistouri, 10-optique de l'endoscope, 11- xylocaine à 2%, 12- Trocart 7mm, 13- canule de 7mm à piston et orifice pour l'insufflation d'air (STORZ), 14- forceps, 15- portes lame, 16-ciseau, 17-18-Trocart avec canule de 5mm recevant la pince à préhension, 19-, 20- pipette en verre

Photo 2 : instruments et produits utilisés pour la récolte des embryons

b) Manipulation des embryons :

- Microscope inversé (Hund) et loupe binoculaire (Nikon).
- Milieu de conservation F1
- Ethylène glycol (IMV ZA 468 à 1.5 M d'éthylène glycol)
- Bain marie.
- NaCl isotonique.
- Cathéter 16 G.
- Sonde métallique à trois orifices.
- Boîtes de pétrie carrées quadrillées.
- Petites boîtes de pétrie ronde.
- Flacons de récolte stérile.
- Une pipette de verre montée sur une seringue à insuline.
- PBS (Phosphate Buffered Saline).
- Seringues de 50 ml pour injecter le PBS.

c) Matériel d'endoscopique et d'échographie :

Nous avons utilisé le même matériel décrit dans le premier chapitre.

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

D) Matériel de congélation des embryons :

- ◆ Paillettes de 0.25 ml et jonc d'identification.
- ◆ Containers d'azote liquide
- ◆ Biocongélateur.

I.2. Méthodes :

I.2.1. Préparation des animaux :

La préparation a commencé la veille du jour de la récolte, elle est commune à tous les animaux et consiste à : l'isolement et la mise en diète complète des brebis, la tranquillisation des brebis par la xylazine.celle ci est effectuée en IM avec une dose de 0.1mg/kg. Pour faciliter le nettoyage et le rasage du site opératoire, la brebis est installée en position dorsale sur une table inclinable.

I.2.2. Récolte des embryons :

Elle est réalisée par voie chirurgicale, six jours après la première saillie, par lavage des cornes utérines à l'aide d'une solution de PBS à 37 °C. La récolte est déclenchée en cas de résultat favorable (existence de corps jaunes actifs et l'absence des adhérences),

a) Préparation de la brebis :

La brebis est anesthésiée avec de la kétamine en IV avec une dose de 5.5 mg/kg, la contention de la brebis est faite à l'aide d'une table à plan inclinable, ce qui facilite l'accessibilité et le maniement du tractus génitale. La zone opératoire, s'étendant de la base de la mamelle à l'ombilic, est désinfectée deux fois avec de l'alcool chirurgical et iodée. Ensuite le champ de tissu est fixé aux membres postérieurs par deux pinces.

b) 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 de petits ciseaux pointus, la corne utérine est ponctionnée au niveau de la jonction utero- tubaire et la sonde métallique munie d'un cathéter de collecte est mise en place. Puis, 40 ml de PBS à 37 °C est injecté à la base de la corne utérine (au niveau de la bifurcation), et le liquide est alors récupéré par la voie de retour dans

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

un flacon en plastique stérile. Cette opération doit être effectuée lentement avec un massage pour éviter toute perte de liquide.

Après avoir retiré tout le matériel de collecte, une suture de la paroi abdominale est effectuée par des points en croix avec le Vicryl[®] 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 :

a) Recherche des embryons :

Dès la fin de la récolte, le flacon est mis à décanter sur une surface stable, le surnageant est alors éliminé par siphonnage, le reste du liquide est 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, les embryons sont recherchés au grossissement ($\times 40$), puis récupéré grâce à une micropipette, pour être déposé dans une boîte de Pétri ronde.

b) Examen et conditionnement des embryons :

La qualité des embryons ainsi que leur stade de développement sont déterminés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement $\times 60$), selon la nomenclature de l'IETS (1998). Dans un premier temps, les embryons sont identifiés et lavés dans un milieu de conservation (milieu de conservation F1). Puis chaque deux embryons transférables (classe I et II) sont mis entre deux bulles d'air soit dans une pipette en verre reliée à une seringue à insuline pour un transfert en frais (Photo 3) soit dans une paillette de 0.25 ml (figure) pour être congelés et transférés après décongélation.

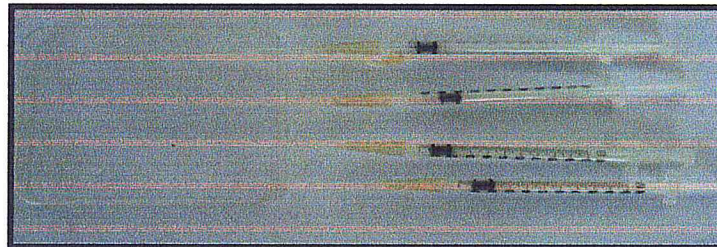


Photo 3 : Montage des embryons en pipette en verre pour un transfert.

Les embryons à congeler sont conditionnés en paillette dans le 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 5).

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

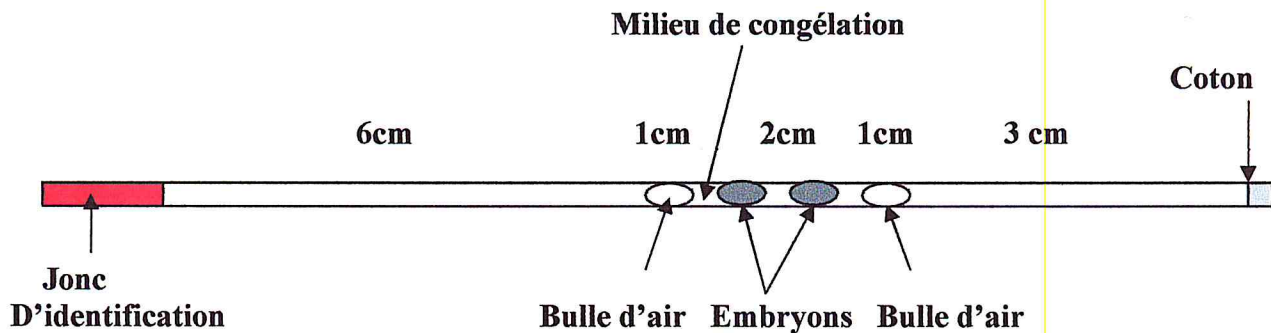


Figure 7 : Schéma de montage des embryons en paillette pour une congélation.

Après un temps d'équilibration de l'embryon dans la solution de cryoprotecteur, la méthode de congélation 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°C à raison 1 à 3°C par minute
- Maintenir l'embryon -7°C pendant 5 à 7 minutes pour stabiliser la paillette
- Après avoir retiré la barre du seeding immergé dans l'azote liquide, procéder au seeding (cristallisation) 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°C à raison de 0.3 à 0.6°C par minute
- A -30°C , la paillette est plongée dans la cuve d'azote liquide à -196°C
- Les embryons congelés sont transférés dans un container d'azote liquide.

I.2.4. Transfert des embryons :

Les receveuses ont été soumises aux mêmes étapes de préparation que celles des donneuses : elles étaient mises à une diète totale de 24 heures avant l'opération de transfert. Le jour de l'intervention, elles étaient tranquilisées et la région abdominale ventro-caudale juste cranialement de la mamelle a été rasée, nettoyée et désinfectée avec de l'alcool chirurgical et iodé.

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

Le transfert était précédé d'un examen laparoscopique, afin de repérer l'ovaire porteur du corps jaune fonctionnel. Une fois que l'examen laparoscopique était positif (présence au moins d'un corps jaune fonctionnel sur l'un des ovaires), la deuxième phase débuta avec une incision de 2 à 3 cm au niveau de la ligne blanche. L'extrémité de la corne utérine ipsilatérale du corps jaune a été saisie puis extériorisée de l'abdomen à l'aide d'un forceps.

Une ponction a été réalisée au niveau de la paroi utérine à l'aide d'une aiguille de 18 gauge ; afin de permettre l'injection du contenu de la paillette (les deux embryons).

La corne utérine a été par la suite remise dans la cavité abdominale .La paroi abdominale et la peau ont été suturées respectivement par des points simples avec un fil résorbable et non résorbable. La plaie opératoire a été pulvérisée avec de la Terramycine.

I.2.5. Soins post opératoire :

A la fin de la collecte chirurgicale, les points de ponction et la plaie opératoire ont été pulvérisés avec un antibiotique à base de terramycine, puis une administration en IM d'un traitement à base de pénicilline streptomycine (à la dose de 0.05ml/kg) a été réalisée pendant trois jours, afin d'éviter les surinfections.

Les brebis donneuses ont reçues, le jour et le lendemain de l'intervention, une injection de PGF2 α à la dose de 0.01ml/kg pour éviter une éventuelle gestation et induire aussi rapidement que possible le retour à une cyclicité normale. L'exérèse des fils était effectuée 8 jours après l'opération.

I.2.6. Diagnostique de gestation :

Quarante jours après le transfert des embryons, un examen échographique était effectué chez les brebis receveuses pour déceler d'éventuelles gestations (selon la même technique décrite dans le chapitre 01).

II. Analyses statistiques :

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

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

III. RESULTATS :

III.1. Dénombrement des corps jaunes :

Le dénombrement des corps jaunes effectué auparavant sous endoscopie a été confirmé par extériorisation et examen des ovaires (cf. photo 4).

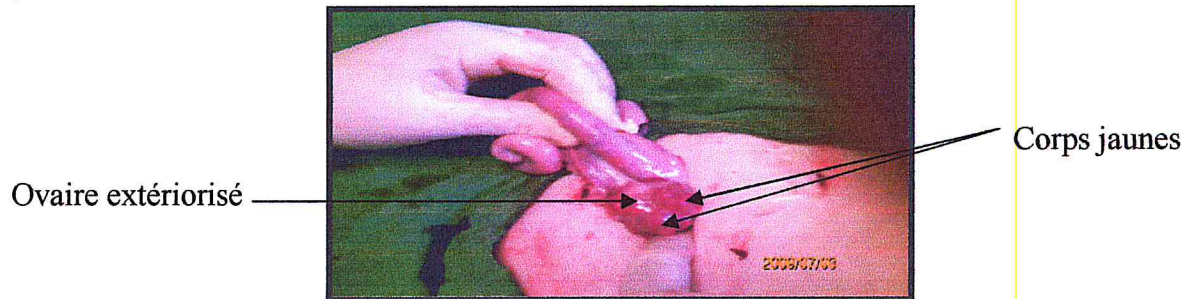


Photo 4 : dénombrement des corps jaunes après extériorisation de l'ovaire

III.2. Résultat de la récolte :

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

III.2.A. Structures récoltées:

Les résultats de la récolte par corne et par brebis sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8 : Nombre et moyenne des structures récoltées par corne et par brebis:

| Brebis | | Nombre de structures | | |
|--------|---------|----------------------|--------------|------------|
| | | Récoltées | | |
| | | Ovaire gauche | Ovaire droit | Total |
| Lot 1 | D1 | 03 | 03 | 6 |
| | D2 | 02 | 02 | 4 |
| | D3 | 00 | 04 | 4 |
| | D4 | 03 | 02 | 5 |
| | D5 | 03 | 03 | 6 |
| | Moyenne | 2,2±1,30 | 2,8±0,83 | 5±1 |
| Lot2 | D6 | 15 | 07 | 22 |
| | D7 | 02 | 04 | 6 |
| | D8 | 05 | 10 | 15 |
| | D9 | NR | NR | NR |
| | D10 | 05 | 05 | 10 |
| | Moyenne | 6,75±5,67 | 6,5±2,64 | 13,25±6,89 |

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

Les résultats montrent que chez les brebis du lot prétraité, le nombre moyen des structures récoltées est significativement différent de celui des brebis du lot témoin ($13,25 \pm 6,89$ vs 05 ± 1 , $p < 0,01$)

III.2. B. Taux de récolte:

Les résultats relatifs aux taux de récupération d'embryons sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : Taux de récolte des embryons.

| Brebis | | Nombre de CJ | Nombre de structures récoltées | Taux de récupération (%) |
|--------|------------|--------------|--------------------------------|--------------------------|
| Lot 1 | D1 | 07 | 6 | 85,71 |
| | D2 | 07 | 4 | 57,14 |
| | D3 | 04 | 4 | 100 |
| | D4 | 08 | 5 | 62,5 |
| | D5 | 15 | 6 | 40 |
| | Taux moyen | | | 61 |
| Lot 2 | D6 | 24 | 22 | 91,66 |
| | D7 | 12 | 6 | 50 |
| | D8 | 21 | 15 | 71,42 |
| | D9 | NR | NR | NR |
| | D10 | 13 | 10 | 76,92 |
| | Taux moyen | | | 75,71 |

Nous avons constaté que le taux de récolte des embryons chez les brebis du lot prétraité tend à être significativement différent de celui des brebis du lot témoin ($75,71\%$ vs 61% , $p < 0,1$).

IV. Classification des embryons :

IV.1. Qualité des structures récoltées :

Les résultats de la classification des structures récoltées sont rapportés dans le tableau 10

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

Tableau 10 : Qualité des structures récoltées. Morula (M), Blastocyste (B), œuf non fécondé (NF), embryon dégénéré (D).

| Brebis | | Embryons | | | | |
|----------------|-----|----------|----------|----------|----------|----|
| | | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | Classe 4 | |
| | | | | | D | NF |
| Lot 1 | D1 | 02(B) | 00 | 02(B) | 02(M) | 00 |
| | D2 | 02(B) | 01(B) | 00 | 01(M) | 00 |
| | D3 | 02(B) | 00 | 01(B) | 01(M) | 00 |
| | D4 | 02(B) | 00 | 02(B) | 01(M) | 00 |
| | D5 | 04(B) | 00 | 02 (B) | 00 | 00 |
| Total | | 12 | 1 | 7 | 5 | |
| Taux moyen (%) | | 48 | 3,57 | 28 | 20 | |
| Lot 2 | D6 | 12(B) | 06(B) | 02(B) | 01 (M) | 01 |
| | D7 | 03(B) | 00 | 02(B) | 01 (M) | 00 |
| | D8 | 11(B) | 01(B) | 02 | 00 | 01 |
| | D10 | 08(B) | 02(B) | 00(B) | 00 | 00 |
| Total | | 34 | 9 | 6 | 2 | |
| Taux moyen (%) | | 64,15 | 16,98 | 11,32 | 7,54 | |

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

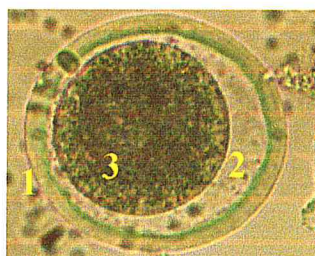
Lot 1:

- Le taux moyen d'embryons de classe 1 est plus élevé par rapport à celui de la classe 2,3 et 4, ils sont respectivement de 48%, 3,57% ,28% ,20%.

Lot 2:

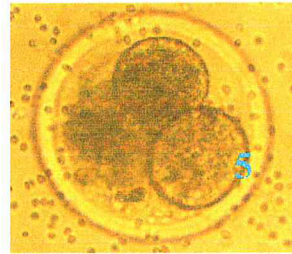
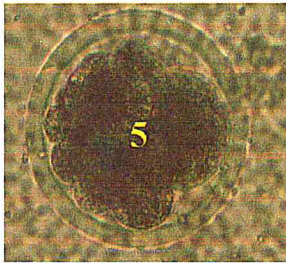
- Le taux moyen d'embryons de classe 1 est plus élevé par rapport à celui de la classe 2,3 et 4, ils sont respectivement de 64,15%, 16,98 %, 11,32 %, 7,54 %.

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

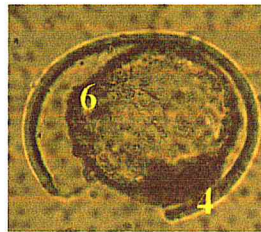


Photos 5 : Ovocyte non fécondé de classe 4

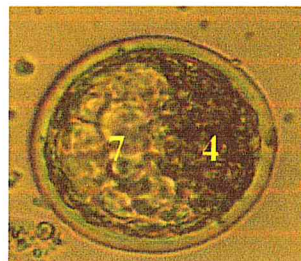
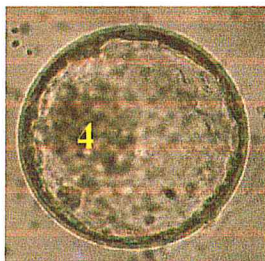
CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS



Photos 6 : Embryons dégénérés de classe 4



Photos 7 : Blastocystes en expansion



Photos 8 : Blastocyste de classe 1

(1) Zone pellucide ; (2) espace prévitellin; (3) chromatine condensé;(4) Bouton embryonnaire. (5) blastomères, (6) Trophoblaste, (7) blastocèles

Figure 8 : Embryons de différentes classes

IV.2. Détermination du taux de fécondité :

Les résultats du taux de fécondité sont rapportés dans le tableau 11

Tableau 11 : Taux de fécondité

| Lots | Structures récoltées | | Taux de fécondité (%) |
|-------|----------------------|----------|-----------------------|
| | Embryons | Ovocytes | |
| 1 | 25 | 00 | 100 |
| 2 | 51 | 02 | 96,22 |
| Total | 76 | 02 | 97,43 |

Nos résultats montrent que le taux de fécondité est de :

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

- ❖ 100 % pour le lot 1
- ❖ 96,22 % pour le lot 2
- ❖ 97,43 % pour l'ensemble des brebis.

IV.3. Détermination du taux des embryons transférables:

Le tableau ci-dessous présente le taux d'embryons transférables.

Tableau 12: Taux des embryons transférables

| Lots | Embryons (%) | | | | | | | |
|------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------|----------|
| | Classe 1 | | Classe 2 | | Classe 3 | | Transférables | |
| | Nb | Taux (%) | Nb | Taux (%) | Nb | Taux (%) | Nb | Taux (%) |
| 1 | 12 | 48 | 1 | 3,57 | 7 | 28 | 20 | 80 |
| 2 | 34 | 64,15 | 9 | 16,98 | 6 | 11,32 | 49 | 92,45 |
| Taux moyen | 46 | 58,97 | 10 | 12,82 | 13 | 16,66 | 69 | 88,46 |

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

- 80% pour le lot 1.
- 92,45 % pour le lot 2.
- 88,46 % pour l'ensemble des brebis

Nous avons constaté que le taux d'embryons transférables chez les brebis du lot prétraité tend à être significativement différent de celui des brebis du lot témoin (92,45 % vs 80%, $p < 0,1$).

V. Résultats du transfert embryonnaire :

V.1. Détermination du taux de gestation

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

Tableau 13: Taux de gestation

| Brebis | Nombre d'embryons Transférés | Gestation |
|--------------------------|------------------------------|------------|
| R1 | 02 | + |
| R2 | 02 | - |
| R3 | 02 | - |
| R4 | 02 | - |
| R5 | 02 | + |
| R6 | 02 | + |
| Total | 12 | 03 |
| Taux de gestation | | 50% |

CHAPITRE II : EFFET DU PRETRAITEMENT PAR UN AGONISTE DE GNRH SUR LE TAUX DE RECOLTE, FECONDATION , QUALITE ET SURVIE DES EMBRYONS

Le diagnostic de gestation a révélé que trois brebis sur six étaient gestantes soit un taux de 50 %. L'image ci-dessous représente une gestation gémellaire chez la brebis R1.

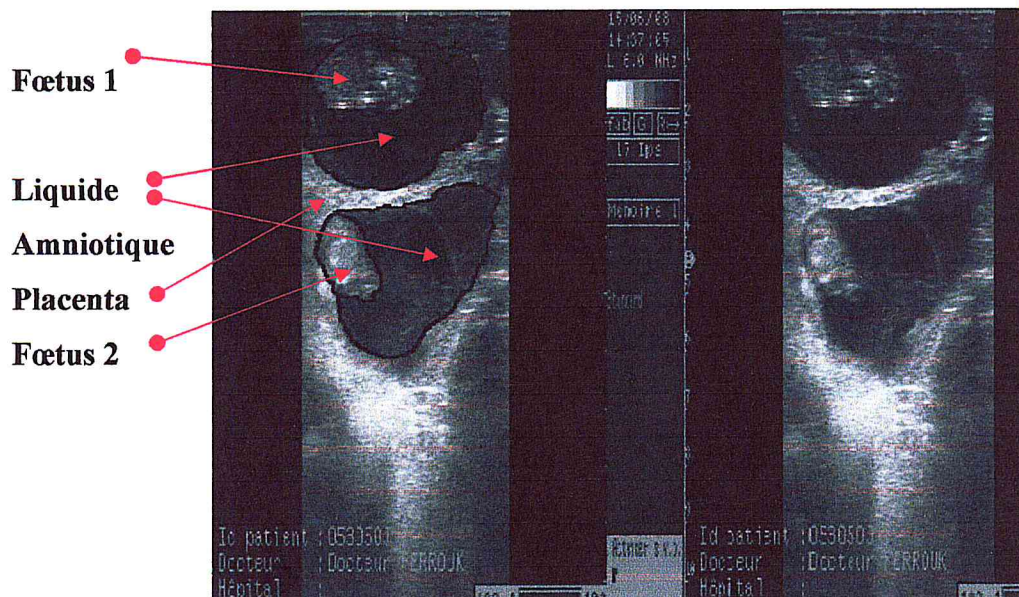


Photo 9 : Image échographique présentant une gestation gémellaire chez la brebis R1

V.2. Taux de viabilité :

Les résultats de dénombrement des agneaux après naissance sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 14 : Taux de viabilité des embryons transférés :

| Brebis | Nombre d'embryons Transférés | Nombre d'agneaux |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------|
| R1 | 02 | 02 |
| R2 | 02 | 00 |
| R3 | 02 | 00 |
| R4 | 02 | 00 |
| R5 | 02 | 02 |
| R6 | 02 | 01 |
| Total | 12 | 00 |
| Taux de viabilité des embryons | | 41.66 % |

Nos résultats montrent que sur les 12 embryons transférés, 05 embryons étaient viables. Ce qui représente un taux de viabilité de **41.66 %**.

DISCUSSION

DISCUSSION

réalisée dans de bonnes conditions produit fréquemment plus de 80% d'œufs fécondés. En effet, le dépôt de semence dans les cornes utérines, sous contrôle laparoscopique, réduit les altérations de la survie et du transport des spermatozoïdes lors de leur passage à travers le cervix chez les brebis superovulées (Evans et Armstrong, 1984) et augmente ainsi le pourcentage d'embryons viables (Cognié, 2000).

2. Qualité des embryons récoltés :

Lors de notre expérimentation, nous avons trouvé que chez les brebis prétraitées, le nombre moyen de structures récoltées et d'embryons transférables est nettement supérieur de celui des brebis témoins (structures récoltées : lot 2, $13,25 \pm 6,89$ vs 5 ± 1 , lot 1) (embryons transférables : $12 \pm 6,27$ vs $4 \pm 1,22$). Ces résultats montrent que le traitement avec de la GnRH augmente significativement le nombre moyen d'embryons transférables par brebis traitée, sans affecter la qualité des embryons récoltés comme décrit précédemment par (Cognié, 1999; Ben Saïd et al., 2004). En effet, la désensibilisation hypophysaire à la GnRH avec un agoniste permet d'accroître le nombre de follicules (2-3 mm), en inhibant les sécrétions endogènes de LH et FSH et en diminuant significativement le taux d'atrésie folliculaire dans cette classe de taille (Brebion et al., 1992).

III. Résultat du transfert embryonnaire:

Nos résultats montrent que le taux de gestation et de viabilité après transfert des embryons frais est de 50% et 41,66% respectivement.

Le taux de gestation obtenu dans notre expérimentation est supérieur à celui décrit par Naohisa et al., 1987, qui rapportent un taux de 38,9%, mais il est comparable à celui obtenu par Li et al., (2008) qui rapportent un taux de 47,6%. Néanmoins, ce taux est inférieur à celui obtenu par Brebion et al., (1991) (80%). Plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats du transfert et la survie des embryons. Selon Baril et al., (2003) le taux de survie embryonnaire est tributaire de la qualité des embryons et du stade de développement embryonnaire lors de la récolte. En effet, des taux de gestation faible sont observés lors d'un transfert de jeune morula, embryons de classe 3 et 4. De plus, il faut signaler que le jugement visuel donne une estimation imparfaite de la viabilité des embryons.

L'âge des receveuses est un autre facteur à prendre en considération (Baril et al., 1993), en effet, le taux de survie des embryons transférés chez les receveuses nullipares est plus élevé que chez les brebis multipares ce qui peut expliquer les faibles résultats obtenus lors de notre étude.

DISCUSSION

b. Les receveuses :

L'évaluation de la réponse ovarienne chez les brebis receveuses suite au traitement d'induction et de synchronisation nous a permis de révéler un nombre de corps jaune moyen de $1,8 \pm 0,83$.

Notre résultat est comparable à celui obtenu par Evans et Robinson, (1980) qui rapportent un taux d'ovulation de 1,8 CJ en saison sexuelle et 2,2 CJ en anœstrus saisonnier en utilisant 400UI de PMSG. Par contre, cette réponse est inférieure à celle obtenue par le même auteur lors d'utilisation d'une dose de 800UI (7,4 CJ). Selon Evans et Robinson, (1980) administrée en fin de traitement progestatif, la PMSG augmente le taux d'ovulation. Cependant, la dose optimale à utiliser varie selon la saison, la race des brebis, la parité et le niveau de production laitière Vallet et al., (1991).

II. Effet du prétraitement par un agoniste de GnRH sur le taux de collecte, fécondation et la qualité des embryons :

1. Taux de collecte :

La recherche microscopique des embryons nous a permis de révéler un taux de collecte global de 68,35% avec des taux de 61% et 75,71% pour le lot1 et 2 respectivement.

Les taux de récolte obtenus dans notre travail sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par Brebion et al., (1991), Baril et al., (2004) qui rapportent des taux de 72, 76%,78% respectivement. Par contre, nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Ben Said et al., (2004) qui rapportent des taux de 64 et 68%. En effet, Nos résultats appartiennent à la fourchette décrite par (Simonetti et al., 2007 et d'Alessandro et al., 2005) qui varie entre 49,3% et 87,5%.

2. Taux de fécondation :

Nos résultats montrent que le taux de fécondité moyen est de 97,43% avec un taux de 100% et 96,22% pour le lot1 et 2 respectivement.

Les taux obtenus dans notre expérimentation sont nettement supérieurs à ceux obtenus par Cognie et Baril, (2002) qui après utilisation de la saillie naturelle et l'insémination artificielle trouvent des taux respectifs de 75% et 60%. Nos résultats sont aussi supérieurs à ceux décrits par Baril et al, (1986) qui rapportent un taux de 93% après utilisation de l'insémination intra utérine. Le taux de fécondation très élevé obtenu chez les brebis superovulées avec ou en l'absence de prétraitement, pourrait être lié à l'utilisation combinée, au moment optimal, de la saillie et l'insémination intra-utérine (Bari et al., 1999). Selon Baril et al., 1991 une saillie

DISCUSSION

Il est à signaler, qu'on a noté une bonne synchronisation des chaleurs entre les receveuses et les donneuses ($19 \pm 6h$, $21,6 \pm 5,36$ Vs $32 \pm 4,72h$). En effet, selon Baril (1993) l'écart de synchronisation toléré est ($\pm 24h$) pour les embryons transférés à un âge de 6 à 8 jours.

2. REPONSE OVARIENNE :

a. Les donneuses :

L'examen laparoscopique nous a permis de révéler que le nombre de corps jaune, chez les brebis prétraitées a été significativement différent de celui des brebis témoins ($8,2 \pm 4,08$ vs $17,5 \pm 5,91$).

Comparativement au brebis témoins, la réponse ovarienne a été supérieure par rapport à celle trouvée par Hiroco et al, (1998) qui rapportent une réponse ovulatoire de $06 \pm 4,5$ corps jaunes. Par contre, cette dernière a été inférieure à celles obtenue par Brebion et al, (1990) et Rexroad et Powell ; (1991) qui rapportent des réponses respectives de 11 et $12,1 \pm 2,3$ CJ.

Il est à signaler que les différences dans les réponses aux traitements de superovulation, en utilisant la même dose est en relation avec la prolificité de la race (Torres et Cognie., 1984; Cognie et al., 1986) la préparation et la voie d'administration de la FSH (McNeily., 1985; Fry et al., 1987; Ammoun et al., 2006). Ces différences peuvent être aussi dues au fait que la FSH exogène a été administrée avec la même dose à toutes les femelles indépendamment de leur poids (Ammoun et al., 2006). Cependant, chez les brebis Lacaune prétraitées avec de la GnRH, Baril et al., (2003) rapportent un résultat similaire au notre ($18,4 \pm 9,5$) CJ. En revanche, comparativement à nos résultats Lopez-allonzo et al., (2005) ont obtenus une réponse ovulatoire nettement inférieure ($17,5 \pm 5,91$ vs $12,2 \pm 1,1$).

Il est à noter qu'il existe une variabilité de la réponse ovarienne individuelle qui peut être attribuée à l'importance du taux de réserve ovarienne en follicules primordiaux. Selon Monniaux et al., (1983); Cognie et al., (2003); Veiga - Lopez et al., (2005) il y a une forte corrélation entre la population folliculaire totale avant la superovulation et le nombre des structures lutéales dénombrées après le traitement de superovulation.

Dans notre étude, la différence trouvée entre les lots, en terme de corps jaune, peut être expliquée du fait que le prétraitement de 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 follicules de 2-3mm) avec pour conséquence une augmentation de 50 % de la réponse ovulatoire au traitement de FSH comme rapporté par Brebion et al., 1992; Cognié et al., 2003.

DISCUSSION

I. Effet du prétraitement par un agoniste de GnRH et d'induction des chaleurs sur le comportement d'oestrus et la réponse ovarienne :

1. Comportement d'oestrus :

a. Les donneuses :

Les résultats relatifs à la détection des chaleurs révèlent que 90% des brebis donneuses ont manifesté des signes d'oestrus. Par rapport au lot témoin, le début d'oestrus a été plus précoce chez les brebis du lot 2 (lot 2, 19 ± 6 h vs $21,6 \pm 5,36$, lot 1), et la durée d'oestrus a été plus longue (lot 2, $52 \pm 9,79$ vs $35,2 \pm 6,57$, lot 1).

Dans notre étude, le début d'oestrus chez les brebis prétraitées avec de la GnRH a été plus précoce que celui rapporté par Ben-Said et al (2004) (19 ± 6 h vs $21 \pm 3,5$ h) et tardif par rapport à celui décrit par Lopez-Alonzo et al ., (2005) (19 ± 6 h vs 17h) . Aussi, la durée d'oestrus chez les brebis prétraitées a été plus longue par rapport à celle obtenue par Lopez-Alonzo et al ., (2005) ($52 \pm 9,79$ h vs 27h).

En l'absence de prétraitement, les brebis témoin (lot1) ont présentées un début d'oestrus ($21,6$ h $\pm 5,36$) comparable à celui décrit par la littérature. Selon Brebion et Baril (1993), environ 85% des brebis de race Lacaune, traitées avec 20 mg de pFSH, viennent en oestrus entre 16 et 28 heures après le retrait de l'éponge vaginale.

En effet, l'apparition précoce du comportement d'oestrus chez les brebis prétraitées semble être liée à la présence, avant le début de traitement de FSH, d'un nombre élevé de petits follicules (2-3 mm) et au taux d'ovulation élevé comme rapporté par Torres et al ., 1987; Martemucci et al., 1988 et Baril et al., 1993.

b. Les receveuses :

Dans notre étude, le taux de synchronisation obtenu après induction de l'oestrus en utilisant un traitement progestatif et la PMSG est de 66,66% et le début d'oestrus a été observé en moyenne 32 h $\pm 3,26$ après le retrait d'éponge vaginale.

Notre résultat est comparable à celui obtenu par Evans et Robinson, (1980), qui rapportent un début d'oestrus de 35,6h en utilisant 800UI de PMSG, par contre il est différent de celui obtenu par le même auteur en utilisant 400UI de PMSG (32 h $\pm 3,26$ vs 43,2h) .

Selon Cognié et al., (1970), l'administration de la PMSG à la fin d'un traitement progestatif augmente le pourcentage des femelles en oestrus, de plus ; l'intervalle arrêt du traitement progestatif-apparition d'oestrus est en moyenne de 32,7h avec des doses de 400 à 800UI.

CONCLUSION

CONCLUSION

Chez la plupart des espèces domestiques, la finalité première de l'utilisation de la superovulation et la transplantation embryonnaire est de parvenir à multiplier la descendance des femelles à haut potentiel génétique au-delà de leurs possibilités naturelles. Cependant, chez les ovins, la grande variabilité de la réponse aux traitements de superovulation reste le principal facteur limitant dans les programmes de transfert embryonnaire.

Les résultats de notre travail montrent que comparativement aux brebis superovulées en l'absence de prétraitement par un agoniste de GnRH, la réponse ovarienne moyenne est très élevée chez les brebis prétraitées ($8,2 \pm 4,08$ vs $17,50 \pm 5,91$ Cj). Aussi, le taux de récolte (61% vs 75,71%), et le nombre moyen d'embryons transférable par brebis traitée ($4 \pm 1,22$ vs $12 \pm 6,27$) sont nettement meilleur chez les brebis prétraitées par la GnRH .

Il en ressort que chez la brebis Ouled Djellal , l'augmentation de la réponse ovarienne obtenue suite a l'administration d'un agoniste de la GNRH, semble résulté de l'inhibition temporaire de la croissance folliculaire terminale par conséquent ,un accroissement du nombre de petits follicules et une élimination des gros follicules .

Nos résultats ont révélé que chez l'ensemble des brebis superovulées , le taux de fécondation est très élevé (88,46 %) ce qui semble être lié a l'utilisation combinée, au moment optimal, de la saillie et l'insémination intra-utérine.

Aussi, lors de notre expérimentation, le transfert des embryons frais nous a permis de révéler un taux de gestation et de viabilité de 50% et 41,66% respectivement. En effet, ces résultats sont comparable a ceux rapportés par la littérature.

En fin on peut conclure que notre expérimentation a arboré des résultats très encourageants car elle nous a permet d'améliorer les résultats de la production in vivo d'embryons ce qui est approprié pour la conservation de la race Ouled Dellal.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

AMMOUN, I., T. ENCINAS., A. VEIGA-LOPEZ. J. M. ROS., I CONTRERAS., P.GONZALEZ-ANOVER., M. J. COCERO., A. S. MCNEILLY., AND A. GONZALEZ-BULNES., 2006. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. *Theriogenology* 66:896-905.

ANNA.T., GRAZUL-BILSKA., JAMES, KIRSCH., JERZY, BIL SKI., MM., AND KRAFT., 2007. Superovulation in sheep: number and weight of corpora lutea and serum progesterone. *Sheep & Goat Research Journal*, Volume 22.

ARMSTRONG DT., E VANS G., 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*.19.p31-42.

BARI F., KHALID K., HARSING W., MURRAY A and B. MERREL., 2003. factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within MOET program. *theriogenology*, 59,5-6,1265-1275.

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.

BARIL G., CHEMINEAU P., COGNIE Y., LEOEUF B., ORGEUR P., VALLET J. C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins par, Station de la physiologie de la reproduction, Institut national de la recherche agronomique (INRA), Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture Rome.

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. Ruminants*, 11.

BARIL G., POUGNARD J.L., FREITAS V.J.F., LEOEUF B., SAUMANDE J., 1996. A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology*, 45, 697-706.

BARIL. G., COGNIE. Y., BELLOC. J.P., BRIOIS. M., POULIN. N., BOUTTIER. A., POUGNARD. J.L., VALLET. J.C., LEOEUF. B., REMY. B., BECKERS. J.F., MERMILLOD. P., 2004. INRA-UMR Physiologie de la reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly-France. *Renc. Rech. Ruminants*, 11.

BARIL. G., VALLET. JC., 1990. Time of ovulation in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out the breeding season. *Therio.*, 34,303-3 11.

BARTELWSKI PM., ALEXANDER BD., KING WA., 2008. Ovarien and endocrine determinants of superovulatory responses in anoestrus ewes, departement of biomedical sciences, university of Guelph, Canada. *Small Ruminants Research* 75 210-216.

BARTLEWSKI P M., B D ALEXANDER 1., W A KING., 2007. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes ; department of biomédical sciences, ontario vétérinaire college, university of Guelph, Guelph, ontario N1G 2 W1, canada. 2007 Elsevier B. V.

BENSAID. S., TOUZE J. L., BARIL. G., BECKERS. J. F and CONGNIE. Y., 2004. long term exposure to GnRH agonist dose not modify the sheep ovarian response to a superovulation FSH treatment proceeding of the symposium on reproduction in small ruminants. Production fertility and development 16 (4) 510.

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.

BORIS GRESSIER., 1999. Etude de l'influence du Rapport FSH/LH dans le cadre de la superovulation chez la chèvre. 1999 ; Faculté de médecine de Nantes.

BOUKHLIQ RACHID., 2002. cours en ligne sur la reproduction ovine —institut agronomique 'et vétérinaire Hassan II.

BREBION P., BECKERS J.-F., GUERIN Y., BOOMAROV, 1991. High performance of Booroola x Romanov ewes as permanent embryos donors. In: Elsen J.M., Bodin L. and Thimonier J. (eds), Major genes for reproduction in sheep, Colloques de l'INRA n°57, 171-174. Editions INRA, Paris.

BREBION. P., BARIL. G., COGNIE. Y., VALLET. JC., 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. Annales de zootechnie, 41, 33 1-339.

CASAMITJANA. P., 2006. Synchronisation de la reproduction chez les ovins. Novembre 2006, société national des groupements techniques vétérinaire, fiche N°22.

CASTONGAUY F., DUFOUR J.J., LAFOREST J.P., DERROY L.M., 1996. synchronisation de l'oustrus chez la brebis avec un analogue de la GnRH. Recherche sur les ruminants, 4-5

CHELLIG R., 1992. Les races ovines algériennes, 10p.

CHEMINEAU P., BARIL G., LEBOEUF B., MAUREL MC., 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.

CHUPIN D., 1988. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Coli Soc Fr Etudes Fertil 26, 2 13-232.

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

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

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

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

COGNIE Y., BARIL G., POULIN N., MERMILLOD P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goats. Theriogenology;59:171–88.

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.

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.

COGNIE. Y., 1984. Comparaison de deux traitements de superovulation chez la brebis citée par J.C Vallet., Casamitjana.

COOP L.E., 1966. Effect of flushing on productive performances of ewes. J. Agri. Camb, 67:305-323.

CORDEIRO MF., LIMA-VERDE JB., LOPES-JUNIOR ES., TEIXEIRA IA., 2002. embryo recovery rate ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. Laboratory of physiology and control of reproduction, faculty of veterinary, state university, of Ceara, Avenue Paranjana 1700, Fortaleza CE 60740-000.

COUROT M., NAIL V., 1991. Conduite de la reproduction des mammifères domestiques: présent et futur. INRA. Prod, Anim. Decembre, PARIS, 3 : 199.

DINGWALL WS., MCKELVEY W.A.C., MYLNE J., SIMM G., 1993. An evaluation of MOET in Suffolk sheep. Anim Prod;56:444.

DONALDSON, L.E., 1984. embryo production in superovulated cows : transferable embryo correlated with total embryos. Theriogenologie, 21 : 517-524.

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

EVANS G., MAXWELL WMC 1987. saramon s artificial insémination of cheep and goats Sydney butterworths.

FISHEL SB., EDWARDS RG., PURDY 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

cycle or follicular stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin. *J In Vitro Fert Embryo Transf*; 2 (3): 123-131.

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. *Livestock Production Science* 66. 263—269.

FRY R.C., CLARKE 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 Booroola and control Merino ewes. *J. Reprod. and Fert*, 82: 611-615.

FRYDMAN R., CORNEL C., DE ZIEGLER D., TAÏEB 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.

FRYDMAN R., CORNEL C., DE ZIEGLER D., TAÏEB 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.

GIBBONS A., M I CUETE., 1995. Transfencia de embriones en ovinos y caprinos. INTA EEA Regional Patagonia Norte.

GIOVANNI L., LUISA B., PIERPAOLO P., SERGIO L, SALVATORE N., 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after verifications than those derived from FSH treatment » *Reprod. Nutr. Dey.* 41(2001) 239-246.

GONZALEZ STRANGNARO C., 1984. Reproduction des ruminants en zones tropicale. Colloque de l'INRA, 20 : 1.

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.

GONZÀLEZ-BULNES A., SANTIAGO-MORENO J., COCERO MJ., AND LOPEZ-SEBASTIAN. A., 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish merino ewes, *Theriogenology* 54 1055—1064.

GONZALEZ-BULNES A., SANTIAGO-MORENO J., COCERO MJ., SOUZA CJH., GROOME NP., GARCIA-GARCIA RM, ET AL.; 2002. Measurement of inhibin A and follicular status predicts the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*;57:1263–72.

GONZALEZ-BULNES A., SOUZA CJH., CAMPBELL BK., SCARAMUZZI RJ., BAIRD DT., 2003. The effect of a single long-acting injection of GnRH antagonist on ovarian follicular development in sheep. *Reprod Abstr Ser*;30:65.

GORDON I., 1975. hormonal control of reproduction in the sheep. *Proc. Br. Soc. Anim. Prod.* 4 : 79-93.

GUERIN 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; Department of Animal, Wildlife and Grassland Sciences; University of the Free State Bloemfontein; February 2008.

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.

HANSEL W., CONVEY E.M., 1983. physiology of the estrus. *J.Anim.Sci.* (suppl. 2), 57 : 404-412.

HANZEN., 2009. La production d'embryons *in vivo* dans l'espèce bovine ; année 2008/2009 ; Prof. Ch. Hansen. Université de Liège.

HENZEN., 2000. « propédeutique et pathologie de la reproduction male et femelle » 2ème doctorat en médecine vétérinaire.

HIROKO WATANABE., HIDENORI KIMURA., NAOHISA ISHIDA., MIDORI OKADA., AKIO MIYAMOTO AND YUTAKA FUKUL., 1998. A simple superovulation method of a single injection of follicle stimulating hormone combined with equine chorionic for superovulation of Suffolk ewes during the breeding season: II. The ovarian Responses and embryo qualities. *Journal of Reproduction and development*, Vol. 44, N°2.

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

ISHWAR ET MEMON., 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; Department of Animal, Wildlife and Grassland Sciences; University of the Free State Bloemfontein; February 2008.

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

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

LINDNER G.M., WRIGHT R.W.J., 1983. Bovin embryo morphology and evaluation Theriogenology. 20: 407-4 16.

LOPEZ-ALONSO C., ENCINAS T., VEIGA-LOPEZ T., GARCIA-GARCIA RM., COCERO MJ., ROS JM., MCNEILLY AS., GONZALEZ-BULNES A., 2005. Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single short-acting dose of GnRH antagonist. Departamento de reproduction animal INRA; Madrid. Theriogenology 64 1833—1843.

MONNOAUX D., CHPIN D., SAMMAND J., 1983. superovulatory reponse of cattle. Theriogenology. 19: 54-64.

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

MURPHUY B.D., 1984. Viability in gonadotrophin preparation as a factor in the superovulatory response. Theriogenology, 21 n°1, 117-125.

NAOHISA I., YEON-GIL JUNG., RYOKO I., MIDORI O., TOMOE O., DAISUKE I., YUTAKA F., 1997. Non-surgical transfer of fresh or frozen-thawed ovine embryos by laparoscopy; Laboratory of animal genetics and reproduction, Obihiro University of agriculture and veterinary medicine, Japan.

NAQVI S.M.K ET GULYANI R., 1999. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. Division of physiology, Central sheep & Wool Research institute, Avikanagar, Jaipur, Rajasthan; 304- 501, India.

RÉMY B., BARIL G., VALLET JC, DUFOUR R., CHOUVET C., SAUMANDE J., CHUPIND., BECHERS JF., 1992. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone, Theriogenology36, 3 89-399.

REXROAD JR C. E., AND A. M. POWELL., 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. J Anim Sci 69:246-251.

RICORDEAU G., BOUILLON J., GAILLARD A., LAJOUS A., LAJOU D., 1984. modalité et caractéristique de la reproduction chez les caprins. Aspects génétiques. B.T.I., 391,367-383.

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.

SAKKAS D., BATT P.A., CAMERON A. W., 1989. Development of preimplantation goat (caprahircus) embryos in vivo and in vitro. Journal of reproduction and fertility, 87: 359-365.

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.

SAUMANDE J., PROCUREUR R., CIUPIN 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.

SIMONETTI L.F. 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.

SUGIE T., SOMA T., TSUNODA and K. MIZOUCHI., 1989. Survival rates of the embryo during transfer in farm animals.

TIBARY A ET MANAR S., 1988. Factors affecting oestrus synchronisation in two Moroccan breeds of sheep. Proceedings of the 11 th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 1: 462.

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.

VALLET JC., BARIL. G., LOYSEL C., 1990. Surgical or laparoscopic embryo transfer in goats. A OETE, 5 Colloq Sci, 186 p.

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

VALLET. J. C., BARIL. G LEBEOUF. B., J. PERRIN., 1991. insémination artificielle intra- utérine sous contrôle laparoscopique chz les petits ruminants domestiques, Ann. Zootech, 41,305-309.

VEIGA-LOPREZ A., GONZALEZ-BULNES A., GARICAI- GARCAI 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.

WALKER SK., SMITH DH., SEAMARK RF., 1986. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. J Reprod Fertil 77, 135–142.

WARE C.B et COLL., 1985. Research report. University College, Dublin.

WHITELY NC., JACKSON DJ., 2004. An update on oestrus synchronisation in goats: a minor species .Journal of animal science, p270-276.

WOLF., AND MYLNE., M.J.A., 1994. Influence of age of donor ewe on MOET in Texel sheep, in Proc. British Soc. Anim Prod, 86.

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