



172THV-2

République Algérienne Dém

Ministère de L'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université SAAD DAHLEB BLIDA
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques
Département des Sciences Vétérinaires

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



Réalisé par :

M^{lle} BENHACENE Hadjer

M^{lle} REBHI Asma

Jury:

M^r FERROUK M. (C.C) U.S.D.B. President
M^r AMMI M. (D.V) U.S.D.B .Examineur
M^r YAHIMI A. (M.A.T) U.S.D.B .Examineur
M^r GHARBI S. (C.C) U.S.D.B. Promoteur

Promotion 2007/2008

Remerciement

A Monsieur FERROUK M :

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse et pour son aide à la réalisation de la partie expérimentale.
Hommage respectueux.

A Monsieur GHARBI S :

Qui a accepté de diriger ce travail, pour son soutien et sa gentillesse.
Vifs remerciements et profonde gratitude

A Monsieur AMMJI M et Monsieur YAHJMI A :

Qui ont acceptés de juger ce travail.
Sincères remerciements

A Monsieur NABJI M :

Directeur de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb
pour sa collaboration ainsi que tout le personnel de la station.

A nos collègues YACINE & ADNANE :

Pour leurs aides dans la réalisation de la partie expérimentale.

NADJER & ASMA

Dédicace

Je tiens à remercier et dédicacer ce travail :

A ma mère pour son amour et son soutien. Merci d'avoir été un si bel exemple pour moi.

A mon père merci de m'avoir montré le chemin.

A mon grand père Yahia

A mes frères Amine, Rabah, Moumen, Hassan et Hocine, et mes sœurs Amel, Jmen, Jkram, et Fattouma.

A toute ma famille, pour ces bons moments.

A tous mes amis, pour leur soutien et leur fidélité.

Sans oublier mon binôme et toute sa famille

A la meilleure promo vétérinaire 2008.

Enfin à tous ceux que j'oublie, merci pour votre aide.

REBHJASMA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de ma défunte sœur Karima.

*A mon père qui m'a été d'un apport sans égale et sans lui je n'aurais
jamais été ce que je suis.*

Ma mère pour son amour et sa tendresse

A mes deux frères, Mohamed et Hamza

A mes sœurs : Samia, Lila, Fatima, Hayett, Amira.

A mes neveux et nièces et leurs pères.

Sans oublier mon binôme et toute sa famille

A mes amis et tous ceux que j'aime tendrement

Toute la promo 5 eme année vétérinaire

BENHACENE HADJER

RESUME :

La transplantation embryonnaire est une biotechnologie qui permet la multiplication de la descendance des femelles à haut potentiel génétique au delà de leurs possibilités naturelles et la préservation des races.

Notre travail a comme objectif principal, la maîtrise des techniques de production et de transfert d'embryons in vivo et l'évaluation de la réponse ovulatoire des brebis suite au traitement de superovulation.

Une synchronisation été effectuée à l'aide d'éponge vaginale FGA (40mg) pendant 14 jours, chez sept brebis (03 brebis donneuses de race Hamra et 04 brebis receveuses de race mixte).

Un traitement de super ovulation avec une dose de (20mg) d'extrait hypophysaire purifié de FSH porcine, en doses décroissantes, été administré chez les brebis donneuses pendant les trois derniers jours du traitement progestatif. Tandis que, les receveuses ont reçus une dose de 500UI de PMSG au moment du retrait de l'éponge vaginale.

Nos résultats montrent que les brebis de race Hamra ont répondu moyennement au traitement de superovulation. La réponse ovarienne est en moyenne de 07 ± 1 corps jaunes par brebis donneuses. Ainsi, la saillie naturelle réalisée avec un bélier Hamra a permet d'obtenir un taux élevé d'œuf divisé (93.33%).

Le taux de récupération des embryons obtenus après la récolte chirurgicale est de 52,38% et le nombre moyen d'embryon transférable est de $4 \pm 1,41$ soit un taux de 72,72 %.

En fin, le transfert d'embryons chez les receveuses été réalisé sous endoscopie, le jour de la récolte soit six jour après la saillie. L'examen échographique effectué 40 jours après transfert, révèle un taux de gestation de 50%.

Mots clés : Ovin, race Hamra, superovulation, FSHp/LH, transfert d'embryon.

ABSTRACT:

Embryonic transplant is a biotechnology which allows high genetic potential the multiplication of the dérivation of the females beyond of their natural possibilities and the preservation of breeds.

Our job has as main objective, the maitrise of the techniques of production and transfer of embryos in vivo and the évaluation of answer ovulatoire of the ewes further to the treatment of superovulation.

A synchronization summer performed with the aid of vaginal sponge FGA (40mg) during 14 days to seven ewes, including three (03) donors and four (04) recovers of mixed race.

A treatment of great ovulation with a dose of (20mg) of extract hypophysaire cleaned of porcine FSH, in decreasing doses, managed at the donors ewes during last three days of the progestatif treatment. While, recipient ewes accepted a dose of 500UI of PMSG in the time of Withdrawal of the vaginal sponge.

Our results show that the ewes of race Hamra answered to the treatment of superovulation moderately. Ovarienne answer is average 07 ± 1 corpus luteum by donors ewes. So, the fertilization accomplished with a ram Hamra a result was a high rate of egg divided (93.33%).

The recovery rate of embryos obtained after harvest surgical east of 52.38% and the average number of embryos transferred is 4 ± 1.41 a rate of 72.72%.

At the end, the transfer of embryos at the conductors accomplished under endoscopy, the day of the crop is six day after fertilization

The exam ultrasound sperformed 40 days after transfer reveals a rate of 50 % gestation.

Key words: Sheep ,breed Hamra, superovulation, FSHp/LHp, embryo transfer .

المخلص :

زرع الجنين هي تكنولوجيا حديثة تسمح بتكاثر نسل الإناث عالية الإمكانية الجينية أكثر مما تصنعه طبيعياً والمحافظة على السلالة علماً أن هدفه الرئيسي هو التحكم و تقييم تقنية الإنتاج ونقل الأجنة الحية.

عملية التزامن نفذت باستخدام أنسجة المهبل 40 ملغ لمدة 14 يوم علي سبعة نعاج ثلاثة منها من سلالة حمراء و أربعة مستقبلات من سلالة مختلفة.
معالجة تكثيف التبييض نفذت بالاستعمال جرعة 20 ملغ من فئة PFSH بالتركيز تنازلي خلال أيام الثلاثة الأخيرة من العلاج البروجسترونية, في حين أن المستقبلات تلقوا جرعة 500 ملغ (PMSG) في وقت سحب الإسفنج المهبلية .

النتائج التي توصلنا إليها تشير إلى أن جواب النعاج الحمراء لعلاج التكتيف كان معتدلاً وجواب التبييض بلغ (1±7) جسم أصفر لكل نعجة مانحة.
وطأ الواهبات تم بواسطة كبش من سلالة حمراء سمح بالحصول علي نسبة عالية من البيض المقسم (البيض الملقح) 93.33 % .

معدل استرداد الأجنة ثم الحصول عليه بعد عملية الحصاد الجراحية وبلغ 52.38 % وبلغ متوسط عدد النقولة (1.41±4) بنسبة 72.72 % .

وفي نهاية المطاف نقل الأجنة لدى المستقبلات تمت تحت المنظار الطبيعي في نفس اليوم أي ستة أيام بعد عملية الوطاء، أما عملية الفحص بالموجات فوق الصوتية أجريت 40 يوماً بعد عملية النقل وكشفت عن نسبة حمل تعادل 50%.

مفتاح الكلمات :نعجة سلالة, حمراء, تكثيف التبييض, FSHp/LH, نقل الأجنة

TABLES DES MATIERES

RESUME	I
LISTE DES TABLEAUX	II
LISTES DES FIGURES	III
LISTE PHOTOS	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
 INTRODUCTION	 01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

CHAPITRE I : LES RACES OVINES ALGERIENNES

I- Introduction	02
II- Ethnologie des populations ovines Algériennes	02
II-1 - Les races locales principales	02
A- La race Ouled Djellal	02
A-1- Caractéristiques de la race	03
A-2- Performances zootechniques	03
A-2-1- Reproduction	04
A-2-2- Production laitière	04
A-2-3- Production de viande	04
A-2-4- Production de la laine	04
B- La race Hamra dite Beni-Ighil	04
B-1- Caractéristiques de la race	05
B-2- Performances zootechniques	05
B-2-1- Reproduction	05
B-2-2- Production laitière	06
B-2-3- Production de viande	06
B-2-4- Production de la laine	06
C- La race Rumbi	06
II-2- Les races locales secondaires	07
A- La race Berbère à laine zoulai	07
B- La race Barbarine (Oued Souf)	07

C- La race D'men	07
D- La race Targuia-Sidaou	07

CHAPITRE II : PHYSIOLOGIE DE L'ACTIVITE SEXUELLE DE LA BREBIS

I-LES MODIFECATIONS CYCLIQUES DE L'OVAIRE CHEZ LA BREBIS

1-Folliculogenese chez la brebis.....	08
1-1-Les différents stades du développement folliculaire	08
1-1-1- les Follicules primordiaux	08
1-1-2-les Follicules primaires	09
1-1-3- Les Follicules secondaires	09
1-1-4- Les follicules tertiaires.....	10
1-1-5- Les follicules de De Graaf.....	10
1-2-Dynamique de la croissance folliculaire.....	11
1-2-1- Evolution en fonction de l'âge.....	11
1-2-2-Cinétique de la croissance folliculaire.....	12
1-2-3-Durée de la croissance folliculaire.....	12
1-3-Initiation de la croissance folliculaire	12
1-4-Développement folliculaire basale	12
2- Développement folliculaire terminale.....	13
2-1-Définition	13
2-2- Régulation des mécanismes de la folliculogénèse terminale	14
a-Contrôle de recrutement.....	14
b-Contrôle de la sélection.....	14
c-Contrôle de la dominance.....	15
3-L'ovulation.....	15
4-L'atrésie folliculaire	15

II- LE CYCLE SEXUEL CHEZ LA BREBIS :

1-Modification du comportement	16
2- L'anoestrus dit saisonnier	16
3- Hormones intervenants dans la reguleation du cycle oestrale	17
3-1-Hormones gonadotropes et activités de l'axe hypothalamo-hypophysaire	17
3-1-1 -Hormones hypothalamiques	17
3-1-2- Hormones hypophysaires	17
3-1-2-1- FSH... ..	18
3-1-2-2 LH... ..	18
3-1-3-Activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire	18
3-2- Les hormones ovariennes et prostaglandines	19
3-2-1-Steroides ovariens	19
a-Les oestrogenes	19
b- la progesterone	19
4-2-2-Les peptides ovariennes	20
a-L'inhibine	20
3-2-3-Les hormones de l'utérus	20
a-La prostaglandine	20
4- Les différentes phases du cycle œstrale chez la brebis	20
4-1-Proestrus	21
4-2- Oestrus	21
4-3- Metoestrus	21
4-4 -Dioestrus	21

CHAPITRE IV : LES BIOTECHNOLOGIES DE L'EMBRYON :

I-Introduction...	35
II- La Superovulation ...	37
1-Critères de choix des femelles donneuses ...	37
2- Préparations physiologiques des donneuses ...	37
3- Les Traitements de superovulation ...	37
3-1- Molécules utilisables ...	38
A-PMSG...	38
B- FSH...	38
B-1-Les préparations commerciales ...	38
B-1-1-Les PFSH...	38
B-2-Le rapport FSH/LH ...	39
B-3-Distribution au cours du traitement ...	39
C- HAP.....	39
D- HMG...	39
E- HCG ...	39
F-Traitement cocktail associant FSH et PMSG ...	39
3-2-La dose et le régime d'injection ...	40
a-PMSG ...	40
bExtraits purifiés FSH...	41
3-3- Effet des prétraitements sur les résultats du traitement FSH...	41
4-La saillie ...	42
5- Insémination artificielle ...	42
6-Récolte des embryons ...	43
6-1-Techniques d'anesthésie et de préparation aux opérations de collecte ...	43
6-2-Chronologie de la récolte...	44
6-3- Milieu de récolte ...	44
6-4- Choix de la technique de récolte...	44
a- Technique chirurgicale...	44
b-Technique laparoscopique ...	45
6-5- Examen des embryons...	47
7-Les limites de production d'embryons in vivo ...	48
7-1-Variabilité de la réponse au traitement de la superovulation ...	48

A- Influence de la race	49
B- Influence de l'âge	49
C- Influence de l'alimentation... ..	50
D- Influence des doses utilisées	50
E- Influence de l'état de la population folliculaire	50
7-2-Fécondation difficile des femelles fortement superovulées... ..	51
7-3- Répétabilité du traitement de la superovulation... ..	51
7-4- Régression prématurée des corps jaunes	52
8-Conservation des embryons avant transfert (frais/réfrigéré/congelé)... ..	52
A-Rapport : conservation/utilisation... ..	52
B- Cryoconservation des Embryons	52
9-Transfert des embryons	53
9-1-Condition de réalisation	53
A- Choix et préparation physiologique des femelles receveuses	54
B-Synchronisation receveuses / donneuses... ..	54
9-2-Décongélation des embryons... ..	54
9-3-Techniques de transfert	54
a-Transfert chirurgical... ..	54
b- Transfert laparoscopique	55
9-4-Résultats du transfert embryonnaire	55
III/Production d'embryons in vitro et implications potentielles pour la selection	57
chez les petits ruminants	57
IV/Sexage et typage génétique pré implantatoire	57
V/ La Transgenèse	57
VI/ Le clonage	58

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS59

CHAPITRE I :

**EVALUATION DE REPONSE OVARIENNE AU TRAITEMENT DE SYNCHRONISATION /
SUPEROVULATION :**

I- Matériel et méthodes 60
II-Résultats 67

CHAPITRE II

RECOLTE ET TRANSFERT DES EMBRYONS

I-Matériel et méthodes 69
II-Résultats 75
Discussion 82
Conclusion 86
Références bibliographiques 87

LISTE DES TABLEAUX

Partie bibliographique :

Tableau 1 : Effectif des principales races ovines locales 02

Tableau 2 : chronologie du développement de l’embryon ovin... .. 23

Tableau 3 : Segmentation d’embryons normaux (j 0 – j10) 24

Tableau 4 : Modalités pratiques d’utilisation des progestagènes (FGA) chez les ovins... .. 29

Tableau 5 : Schéma d'utilisation des implants de mélatonine (espèces ovine et caprine)... .. 32

Tableau 6 : quantité minimales (en millions) de spermatozoïdes mobiles nécessaires selon le site d’insémination 32

Tableau 7 : réponse ovulatoire et production d’embryons chez les brebis suite au traitement avec oFSH ou oFSH+eCG 40

Tableau 8 : effet du traitement de stimulation ovarienne sur la réponse et le nombre d’embryons transférables 40

Tableau 9 : Effet du type de traitement de stimulation ovarienne sur la réponse et le nombre d’embryons transférables par femelles traitées 41

Tableau 10 : effet du rythme d’injection sur la réponse ovarienne 41

Tableau 11 : effets d’un prétraitement de 11j par un antagoniste du GNRH sur la réponse ovarienne chez la brebis lacaune.... .. 42

Tableau 12 : effet de la période de traitement sur les taux de fécondation... .. 42

Tableau 13 : Taux d’œufs collectés fécondés et qualité des embryons après IA intra-utérine avec du sperme frais chez la brebis 43

Tableau 14 : classification des embryons selon leur qualité..... 47

Tableau 15 : Effet de la race sur la réponse ovulatoire au traitement de stimulation ovarienne... .. 49

Tableau 16 : résultats des réponses ovulatoires en fonction de l’âge des brebis donneuses... .. 49

Tableau 17 : Effet de l'année et du traitement superovulatoire avec l'oFSH sur la réponse ovulatoire et la production d'embryon chez les brebis de Rasa Aragonesa à la fin de leurs vies reproductrices... .. 51

Tableau 18 : Résultats du transfert laparoscopique avec embryons frais et embryons congelés chez les ovins 56

Tableau 19 : Fertilité après un transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis..... 56

Tableau 20 : résultats de transfert d’embryons frais et congelés-décongelés... .. 56

Tableau 21 : Taux de mise bas et de survie embryonnaires après transfert direct ou traditionnel d’embryons vitrifiés... .. 57

Partie expérimentale :

Tableau1 : Poids, âge et note d'état corporel des donneuses	60
Tableau2 : Poids, âge et note d'état corporel des receveuses	60
Tableau3 : la durée moyenne des chaleurs chez les donneuses	67
Tableau4 : la durée moyenne des chaleurs chez les receveuses	67
Tableau5 : Réponse ovulatoire par ovaire chez les brebis superovulées	68
Tableau6 : Résultats de la réponse ovulatoire globale pour l'ensemble des brebis	68
Tableau7 : résultats de la réponse ovulatoire chez les receveuses	68
Tableau8 : Taux de récupération	76
Tableau9 : le nombre des structures récoltées par brebis	76
Tableau10 : Nombre et moyenne des structures récoltées par corne	77
Tableau11 : taux de fécondité	77
Tableau12 : Classification des embryons selon leur qualité	78
Tableau13 : nombre et taux d'embryons transférables	79
Tableau14 : taux de gestation	80
Tableau15 : taux de viabilité des embryons transférés	80

LISTES DES FIGURES

Figure 01 : répartition géographique de la race Ouled Djelall... .. 03

Figure 02 : répartition géographique de la race Hamra... .. 05

Figure 03 : Follicule primordial avec un ovocyte 1 et quelques cellules folliculaires... .. 09

Figure 04 : follicule cavitaire... .. 10

Figure 05 : schéma d'un follicule de De Graaf... .. 11

Figure 06 : contributions respectives des différentes catégories folliculaires à l'effectif total des follicules ovariens chez la brebis. 11

Figure 07 : évolution de la capacité de prolifération des cellules de la granulosa en fonction du diamètre folliculaire... .. 12

Figure 08 : Principaux événements de la folliculogénèse terminale au cours de la phase folliculaire ; les trois processus, recrutement, sélection, dominance sont bien conservés dans toutes les espèces... .. 13

Figure 09 : sécrétion de gonadotrophines et facteurs de rétrocontrôles au cours des phases de recrutement, sélection et dominance .L'épaisseur des flèches dénote l'importance de chaque sécrétion .Les follicules atrétiques ont perdus leur structure caractéristique... .. 14

Figure 10 : comportement sexuel lors de l'œstrus... .. 26

Figure 11 : insémination cervicale ou transcervical... .. 33

Figure 12 : descriptif de le technique d'insémination intra-utérine sous contrôle Laparoscopique..... 34

Figure 13 : Les principales biotechnologies de l'embryon... .. 36

Figure 14 : Méthode de collecte chirurgicale des embryons... .. 45

Figure 15 : Collecte par technique laparoscopique avec sonde 3 voies... .. 46

Figure 16 : Variabilité de la réponse ovulatoire : distribution des femelles donneuses après traitement FSH... .. 48

Figure 17 : Transfert embryonnaire chez la brebis par méthode laparoscopique..... 55

Figure 18 : Protocole de synchronisation des chaleurs chez les receveuses... .. 63

Figure 19 : Protocole de synchronisation superovulation et collecte des embryons chez les donneuses... .. 63

LISTE DES PHOTOS :

Partie bibliographique :

Photo 1 : Brebis de la race Ouled Djellal	02
Photo 2 : Brebis de la race Hamra dite Beni Ighil	05
Photo 3 : Brebis de la race Rumbi	06
Photo 4 : (A) Dispositif de mise en place	29
(B) Eponge vaginale	29

Partie expérimentale :

Photo 1: matériels endoscopiques	61
Photo 2: Mise en place de l'éponge vaginale	63
Photo 3: Détection des chaleurs chez les receveuses	64
Photo 4: saillie des donneuses	64
Photo 5: Deux incisions de part et d'autre de la ligne blanche.....	65
Photo 6: insufflation de l'air stérile dans la cavité abdominale	65
Photo 7: insertion de l'optique et du trocart	65
Photo 8: Examen endoscopique des ovaires	66
Photo 9: instruments de récolte chirurgicale	69
Photo 10: zone de rasage (au tour de la mamelle)	70
Photo 11: contention de la brebis sur la table	70
Photo 12: mise en place du champ opératoire	70
Photo 13: Deux cornes utérines extériorisées	71
Photo 14: sonde de Foley mise à la base de la corne.....	71
Photo 15: mise en place du cathéter	71
Photo 16: Injection du milieu de récolte dans la corne utérine et récupéré dans le flacon stérile	72
Photo 17: recherche des embryons sous microscope	73
Photo 18: sélection des embryons.....	73
Photo 19: transfert des embryons	73
Photo 20 : dénombrement des corps jaunes après extériorisation de l'ovaire	75
Photo 21 : Œuf non fécondé	79
Photo 22 : Morula (classe I)	79
Photo 23 : Morula (classe III)	79
Photo 24 : image échographique d'embryon vivant chez la brebis gestenteR2	81
Photo 25 : image échographique d'embryon vivant chez la brebis gestenteR4	81

ABRÉVIATION

ADN: acide désoxyribonucléique.
CIRD: Controlled Internal Drug-Releasing Device.
CJ: corps jaune.
COCs : complexe ovocyte –cumulus.
eCG: équine chorionique gonadotrophine
FGA : Acétate de fluorogestone.
FIV: fécondation in vitro.
FIVETE: Fécondation in vitro et transfert d'embryons,
FSH: Follicule Stimulating Hormon.
FSHo: Follicle Stimulating Hormon ovine
FSHp: Follicule Stimulating Hormone porcine.
GH: hormone de croissance.
GnRH, LHRH: (Gonadotrophin Releasing Hormone).
HAP: Horse Anterior Pituitary.
HCG: Human Chorionic Gonadotrophin.
HMG: Human Menopausal Gonadotrophin.
IA : insémination artificielle.
IAU: insemination inta utérine.
ICSH: interstitiel cell stimulating hormone.
ICSI: Intra Cytoplasmic Spermatozoa Injection.
IETS : International Embryo Transfer Society.
IGF1: insulin-like growth factors1.
IGFs: insulin-like growth factors.
IM : intramusculaire.
LH: Luteinizing Hormon.
MAP : Acétate medronyprogestérone.
OPU: Ovum Pick Up.
PBS: Phosphate Buffered Saline.
PCR: polymérase chaîne réaction.
PGF2 α : prostaglandine F2alpha.
PMSG : prégnant mare sérum gonadotrophin.
TE : transplantation embryonnaire.
ZP : zone pellucide.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cheptel ovin Algérien prédomine et représente 80 pourcent de l'effectif national avec plus de 10 millions de brebis (MAP ; 2004), ce cheptel est estimé en 2004 à 18 522 417 têtes. Il repose principalement sur trois races : Ouled Djelall, Hamra et Rumbi (MAP ; 2004).

En effet, nous assistons depuis quelques années à une diminution importante de l'effectif du cheptel de race Hamra (Ayachi ,2002). Il est alors nécessaire de mettre en œuvre des mesures visant la préservation de cette race.

La maîtrise de reproduction stipule des connaissances approfondis et plus ou moins élargies sur l'activité sexuelle de la brebis notamment ceux de nos races locales, ainsi que la mise en profit de toutes ces connaissances et la coordination entre elles, en vue d'en exploiter au maximum.

Les biotechnologies de la reproduction et en particulier la superovulation et la transplantation embryonnaire sont deux outils qui s'averrent avoir une place dans les pratiques courantes de l'élevage ovin car elles tendent à améliorer les génotypes des espèces animales ainsi que leurs préservation.

La superovulation des donneuses est induite au terme d'un traitement classique de synchronisation des chaleurs et de stimulation de la fonction ovarienne par une variété de préparation hormonale à activité gonadotrophe ; les plus appropriés sont les extraits hypophysaires dits « FSH-P » (Brebion et al ; 1991). Une superovulation bien maîtrisée donne un taux d'ovulation moyen de 11CJ et 10 embryons transférable (Brebion et al ; 1991).

La dose totale efficace varie largement selon la préparation hormonale et le génotype de la donneuse, et devrait être déterminée probablement au moyen d'une courbe dose réponse. Les doses totales de FSHp les plus souvent préconisées chez la brebis sont comprises entre 16 et 21 mg Armour (Brebion et al, 1992 ; Tervit et al ,1984), mais ces doses peuvent s'avérer soit insuffisantes, soit au contraire excessives pour certains génotypes particuliers

Nous avons voulu par le biais de la présente étude maîtriser les techniques de production et de transfert des embryons et déterminer la dose optimale a utilisée pour les brebis de race Hamra.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LES RACES OVINES ALGERIENNES

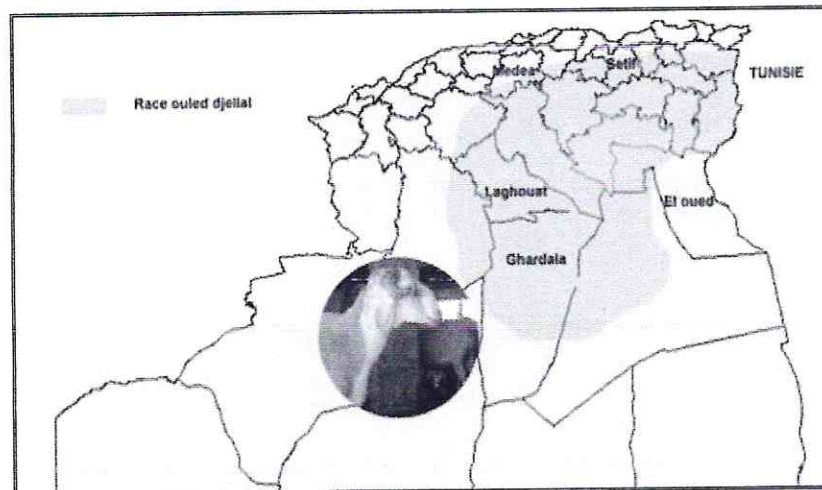


Figure 1: répartition géographique de la race Ouled Djellal (Anonyme1)

Cette race présente trois variétés principales qui diffèrent par leurs tailles et leurs aptitudes :

- Type Laghouat – Chellala – Targuine (Oued Touil) – Boghari : c'est la variété la plus petite de taille à laine très fine.
- Type du Hodna : Ouled Nail- Djelfa- Sidi Aissa- Boussaâda- M'sila- Sétif- Ain M'lila et Ain Beida : c'est le type le plus lourd, il se rapproche de la race Ile de France et c'est le plus recherché par les éleveurs. Il est élevé dans toutes les exploitations céréalières des hauts plateaux.
- Type Ouled Djellal – Zibans – Biskra – Touggourt : c'est un mouton longiligne caractérisé par des pattes hautes et adapté au grand nomadisme. C'est le type de mouton marcheur. C'est le mouton des tribus nomades du piémont sud de l'Atlas Saharien.

A-1- Caractéristiques de la race : Elle se caractérise par :

- **Tête :** assez fine, un peu longue, profil sub-busqué ou busqué chez le male, front large, chanfrein proéminent, la face est recouverte de poils blancs, lustrés et très fins, l'oeil est grand et de couleur noir ou jaune clair, les oreilles sont longues, pendantes, absence de cornes.
- **Encolure :** cou long, sans fanons, nu sur sa partie ventrale.
- **Tronc :** rectangulaire, ligne du dessus droite, du garrot à la base de la queue, cote longue et bombée, poitrine profonde, descend bas entre les membres antérieurs, queue relativement courte s'arrête au niveau du jarret.
- **Membres :** longs, adaptés à la marche, gigot plat, très bons aplombs.
- **Peau :** blanche, cependant quelques traces de pigmentation marrons sur certains sujets très visibles chez les jeunes, il y a dilution de ces pigmentations avec l'âge.
- **Laine :** la laine est blanche, fine et peu jarreuse, la toison couvre suffisamment l'animal, elle descend jusqu'aux jarrets et aux genoux, le ventre et la partie inférieure du cou sont nus.
- **Format et poids :** race de grand format, taille moyenne, la hauteur au garrot représente chez la brebis 70 cm (min 61 cm) et 80 cm (min 75 cm) chez le bélier, le poids moyen des brebis est de 60 kg (min 42 kg), celui des béliers est de 83 kg (min 73 kg).

A-2- Performances zootechniques : Selon Chellig, (1999) les performances sont présentées essentiellement par:

A-2-1- Reproduction :

- Age au premier œstrus (chaleurs) : 08 à 10 mois.
- Saisonnalité de l'œstrus : 02 saisons (Avril - Juillet) et (Octobre - Novembre).
- Mise à la lutte : 18 mois.
- Première mise bas : 24 mois.
- Intervalle entre 02 agnelages : 11 à 12 mois.
- Fécondité : 95 %.
- Prolificité : 110 %.
- Longévité : brebis (10 ans) et bélier (12 ans).

A-2-2- Production laitière :

La brebis Ouled djellal se laisse traire facilement. La traite se fait surtout pendant le printemps. La production est de 70 à 80 kg en 06 mois de lactation, le lait de la traite sert à la consommation familiale (frais - caillé), petit lait (leben) et à la fabrication du beurre (smen), du fromage frais (djeben) et du fromage sec (klila), le colostrum (lèba) est également après ébullition (Chellig, 1992).

A-2-3- Production de viande :

- Poids moyen à la naissance (agneau) : 3,590 kg.
- Poids moyen au sevrage (4mois) : 30 kg.
- Poids à 18 mois (allouche) : 35 à 40 kg.
- Poids des bêtes à engraisser (Ténaï) 24 mois : 38 à 42 kg.
- Durée d'engraissement (grissa) : 60 à 75 jours.
- Augmentation pondérale par jour : 150 à 200 grs.
- Poids à l'abattage : 12 à 48 kg, rendement 45 %

La qualité de viande est bonne, avec un goût apprécié surtout pour le mouton de la steppe (goût de chih) (plante aromatique contenant du thymol), le gigot est long et plat (Chellig, 1992).

A-2-4- Production de la laine :

La laine de Ouled djellal est blanche, fine, la longueur de la mèche est de 08 cm, le poids de toison est de 2.5 à 3.5 kg pour le bélier et de 1,5 à 2,5 kg pour la brebis, avec un rendement de 43 % après lavage.

B- La race Hamra dite Beni-Ighil :

De par son effectif, c'est la deuxième race ovine en Algérie présente 21 pourcent du cheptel national des ovins. On la considère comme la meilleure race à viande. Sa répartition géographique s'étend du Chott Chergui à la frontière marocaine. C'est une race de petite taille à ossature fine et aux formes arrondies, la tête et les pattes sont rouges acajou foncé et la toison blanc cassé. Cette race résiste aux froids et aux vents glacés. (cf. photo 2 et figure 2).

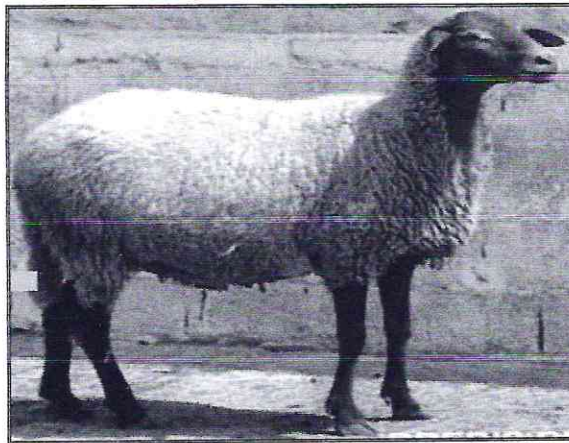


Photo 2: Brebis de la race Hamra dite Beni Ighil (HAMAIDI, 2007).



Figure2: répartition géographique de la race Hamra (Anonyme1)

B-1- Caractéristiques de la race : Selon (Chellig, 1992), elle se caractérise par :

- **Corps :** très ramassé avec format petit et courts sur les pattes, le gigot ovoïde et cotes profondes.
- **Couleur :** la peau est brune, les muqueuses sont noires, la tête et pattes sont bruns rouge foncé presque noirs, la laine est blanche avec du jarret volant brun roux.
- **Cornes :** spiralées, moyenne.
- **Profil :** convexe, busqué.
- **Queue :** fine, longueur moyenne.
- **Poids :** pour les brebis (40 kg) et les males (71 kg).

B-2- Performances zootechniques : Ces performances sont présentées essentiellement par :

B-2-1- Reproduction :

- Age de la brebis au premier œstrus (chaleurs) : 12 mois.
- Age au premier agnelage : 18 mois.
- Nombre d'agneaux au sevrage pour 100 brebis (mise à la lutte) : 75 à 80 %.
- Taux de fertilité : 86 % en automne et 83 % en printemps.
- Taux de prolificité : 115 % en automne et 116 % en printemps.
- Taux de fécondité : 98 % en automne et 96 % en printemps.
- Longévité : 8 à 10 ans pour les brebis, 10 à 12 ans pour les béliers.

B-2-2- Production laitière :

L'aptitude à la traite est bonne, la production totale est de 50 à 60 kg pendant 4 à 5 mois. La distinction du lait est pour les agneaux au début de la lactation, pour la famille à la fin. Pour la fabrication de beurre (Smen) notamment (CHELLIG, 1992).

B-2-3- Production du viande :

- Poids de l'agneau à la naissance : 2,5 kg.
- Poids d'agneau au sevrage à 4 mois : 25 kg.
- Poids du broutard (Allouche) à 1 an : 31 kg.
- Engraissement (Ténaï) à 18 mois : 34 kg (pendant 100 jours).
- Poids à l'abattage : 42 à 45 kg.
- Croissance moyenne journalière pendant l'engraissement : 150 à 180 kg.

C'est un mouton à viande par excellence, chaire fine à saveur appréciée.

B-2-4- Production de la laine : Poids de la toison non lavée : 1,5 à 2 kg pour la brebis, 2,5 à 3 kg pour le bélier.

- Toison tassée à mèche carrée, la longueur de la mèche est de 5 à 7 cm.
- Finesse moyenne : 25 à 26,5 microns px2.
- Couleur : toison blanche.
- Le jarre : rare, roux.
- Utilisation de la laine :
 - Artisanat et Tapis : flij de tente.
 - Industrie : couverture, matelas.

C- La race Rumbi :

La race Rumbi a les mêmes caractéristiques que la race Arabe Blanche Ouled Djellal sauf qu'elle a les membres et la tête mauves (cf. photo.3). C'est une race montagnarde de l'Atlas saharien, elle est robuste, les pattes sûres, les sabots durs et les cornes sont énormes chez les béliers. Cette race se répartie entre Tiaret, Sougueur, Djebel Amour, et Khenchela. C'est un animal bien adapté à la marche, il est capable de parcourir de grandes distances au cours de la transhumance. Il est également bien adapté aux sols rocaillieux secs, au sol de montagne de l'Atlas saharien avec un climat sec et chaud en été, froid avec gelée en hiver



Photo 3: Brebis de la race Rumbi (Hamaidi, 2007).

L'agnelle Rumbi qui est une race dessaisonnée, ne présente pas de période d'intensité sexuelle, la saison sexuelle étant très longue et présente deux périodes de lutte allant de septembre à décembre (agnelage d'hiver) et d'avril à juillet (agnelage de printemps). La période d'œstrus saisonnier chez la race Rumbi s'observe en hiver. Cependant, cet œstrus est relatif puisque l'activité ovarienne se poursuit pendant l'hiver pour certains sujets avec des saillies fécondantes (NIAR, 2001).

II-2- Les races locales secondaires :

A- La race Berbère à laine zoulai :

C'est une race des montagnes de l'Atlas Tellien de l'Afrique du Nord. De petite taille, cette race se confond avec celle de Beni Ighil qui présente les mêmes caractéristiques générales à l'exception de la coloration et de la laine qui est mécheuse chez la race berbère.

B- La race Barbarine (Oued Souf) :

C'est un mouton barbarin à queue adipeuse apparenté au mouton barbarin tunisien et asiatique. On la rencontre à la frontière tunisienne dans l'erg oriental (Oued Souf). Cette race est remarquablement adaptée au désert de sable et aux grandes chaleurs d'été. Elle utilise très bien les pâturages maigres des dunes de l'erg oriental. Elle a une puissance digestive remarquable et elle s'engraisse rapidement.

C- La race D'men :

Cette race a pris une grande importance ces dernières années à cause de sa prolificité élevée, sa précocité et sa faculté de donner des naissances double couramment, parfois elle donne cinq agneaux en une seule portée. Elle est destinée à augmenter par croisement la prolificité des races à viande. C'est une race saharienne répandue dans les oasis de l'Ouest algérien et du Sud marocain.

D- La race Targuia-Sidaou :

Cette race est élevée par les Touaregs (d'où le nom de Targuia) qui vivent et nomadisent au Sahara entre le Fezzan en Libye -t Niger et au Sud algérien dans le Hoggar - Tassili. Elle est recouverte de poils, n'a pas de laine, sa queue est longue et fine. Cette race est résistante aux climats sahariens et aux grandes marches, elle est la seule à pouvoir vivre dans les pâturages du Grand Sahara.

CHAPITRE II

PHYSIOLOGIE DE L'ACTIVITE SEXUELLE DE LA BREBIS

ILES MODIFECATIONS CYCLIQUES DE L'OVAIRE CHEZ LA BREBIS :

La production des gamètes femelles est un phénomène discontinu qui commence pendant la vie intra-utérine ; puis s'arrête pour reprendre à partir de la puberté avec un caractère cyclique .Elle est le résultat de trois événements : l'ovogenèse, la folliculogénese et l'ovulation. L'évolution d'un gamète femelle ou ovogenèse se fait en partie à l'intérieur d'un massif cellulaire, le follicule, dont l'évolution ou folliculogénese aboutit à maturité à son éclatement et à l'expulsion du gamète ou ovulation. Ovogenèse et folliculogénese sont donc partiellement simultanées .Le follicule éclaté est aussitôt remplacé par un corps jaune qui entre en régression rapide lorsque la femelle n'est pas gestante.

Chez la femelle non gestante, ces modifications ovariennes se reproduisent à intervalles réguliers : le cycle ovarien, qui peut être défini comme l'intervalle entre deux ovulations successives, a une durée caractéristique propre a chaque espèce .Il peut être divisé en deux phases distinctes : la phase lutéale ou prédomine (nt) le (ou les) corps jaune, et la phase preovulatoire ou folliculaire.

Au cours de chaque cycle ovarien, les voix génitales (oviductes, utérus et vagin) se préparent à une éventuelle gestation et montrent des modifications tant au niveau histologique que de leur activité sécrétrice.

L'oestrus ou chaleurs est défini strictement comme la période où la femelle accepte le chevauchement. C'est le seul événement facilement observable qui marque l'activité sexuelle cyclique de la femelle. Il accompagne ou précède le moment de l'ovulation.

Le cycle sexuel regroupe toutes les modifications cycliques observées au niveau de l'ovaire, du comportement, des voies génitales, entre le premier jour de l'oestrus et le début de l'oestrus suivant. (Gilbert et al ,2005)

1-Folliculogenese chez la brebis :

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de la réserve, constituée pendant la vie embryonnaire lors de l'ovogenese, jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation ou à son atresie .C'est un phénomène continue puisque chaque jour, des follicules entrent en phase de croissance. Ils deviennent follicules primaires, secondaires puis cavitaires. (Gilbert et al ,2005)

1-1-Les différents stades du développement folliculaire :

1-1-1- Les Follicules primordiaux :

Durant la période foetale, l'épithélium germinatif fournit des cellules qui restent incluse dans la profondeur de l'ébauche gonadique, ces éléments vont se diviser pour donner plus tard les follicules primordiaux.

A la naissance les femelles domestiques possèdent 100000 et 200000 follicules primordiaux mais dès cette période le nombre des follicules primordiaux commence à diminuer et à la fin de la vie sexuelle, ils sont pratiquement tous dégénérés (Thibault, 1998).

Le follicule primordiale est le plus petit follicule constitué,de l'ovocyte entouré de cellules aplaties, il se transforme en follicule intermédiaire puis en follicule primaire lorsqu'il présente

une couche de cellules cuboidales et en follicule secondaire à partir de 2 couches de cellules de la granuloza .A ce moment, la thèque interne s'ébauche et la zone pellucide entourant l'ovocyte se forme. (Thibault et Levasseur ,2001)

Les follicules primordiaux, intermédiaires, et les plus petits primaires constituent le stock des follicules au repos, ils représentent la majeure partie (plus de 95 %) de la population folliculaire ovarienne. Situés dans les couches les plus périphériques du cortex ovarien, ils sont noyés dans un tissu conjonctif dense (cf figure3). (Thibault et Levasseur ,2001)

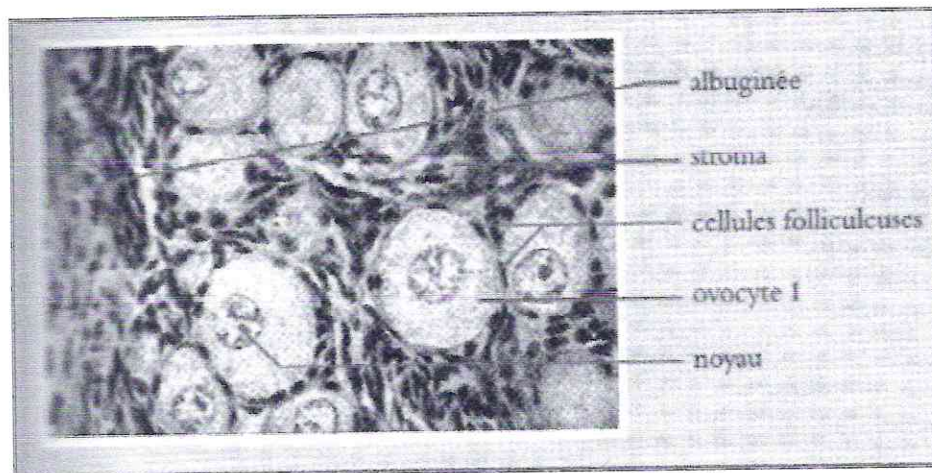


Figure3 : Follicule primordial avec un ovocyte 1 et quelques cellules folliculaires.
(Gilbert et al ,2005)

1-1-2-les Follicules primaires :

L'ovocyte en prophase de la méiose est en croissance et entouré d'une couche de cellules folliculaires de forme cubique : les cellules granuleuses. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise, et secrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse : la zone pellucide .Elle est constituée à 95 % de trois glycoprotéines organisés en longs filaments interconnectés, appelés ZP1, ZP2, ZP3. La ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par laZP1. Seule la ZP3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique. (Yanagimachi, 1994)

1-1-3- Les Follicules secondaires :

L'ovocyte a atteint sa taille maximale et s'entoure d'une couche de glycoprotéine : zone pellucide. Les cellules granuleuses se multiplient activement pour former un amas de plus en plus important autour de l'ovocyte : la granulosa a un rôle nourricier pour le gamète femelle. A la périphérie de lame basale de la granulosa ; deux couches de cellules du stroma s'organisent, la thèque interne et la thèque externe :

- Thèque interne: est formé de cellules glandulaires où se fabriquent les œstrogènes.
- Thèque externe : est formée de cellules aplaties et de fibres conjonctives abondantes garnies de vaisseaux sanguins, chargées précisément de nourrir le follicule et d'emporter les hormones qu'il produits. (Gilbert et al 2005)

1-1-4- Les follicules tertiaires (ou follicule à antrum) :

Sous l'action de la FSH, gonadostimuline hypophysaire, les cellules de la granulosa ont une abondante sécrétion qui entraîne la formation d'une cavité (antrum) remplie de liquide folliculaire, d'une composition proche de celle de plasma. Le stade tertiaire correspond à la phase de recrutement. Le follicule antral est composé de plusieurs couches de cellules de thèque, d'une membrane basale, d'un épithélium stratifié de cellules de la granulosa et d'un complexe ovocyte-cumulus (COCs) (cf figure4). La zone pellucide entourant l'ovocyte est maintenant devenue complète (Braw-Tal et Yossefi, 1997). Des projections de cellules de la corona radiata s'invaginent à la surface de l'ovocyte pour traverser la zone pellucide et former des jonctions communicantes ou gap junctions. (Hyttel et al, 1989).

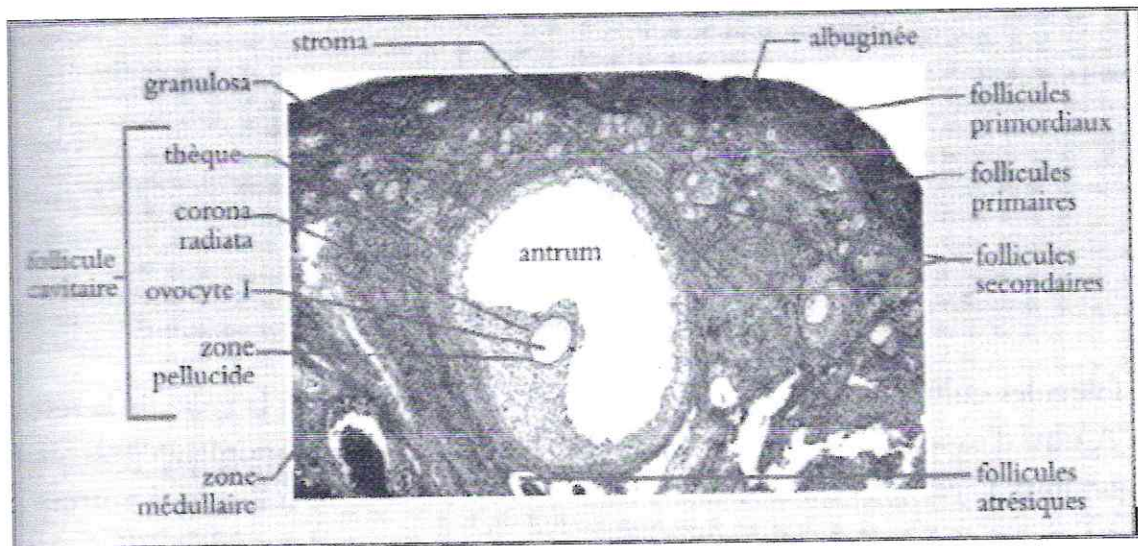


Figure4 : follicule cavitair. (Gilbert et al, 2005)

1-1-5- Les follicules de De Graaf (mûr ou preovulatoire) :

Les follicules pré ovulatoires sont les plus volumineux : 12-19 mm (vache), 5-10mm (brebis et chèvre) et 25-70mm (jument). Chez cette dernière, leur présence est décelable par palpation.

Un follicule mûr se distingue par (cf figure5):

- un antrum très volumineux ;
- un ovocyte situé dans le cumulus oophorus, un épaississement de la couche de cellules de la granulosa qui se projette dans l'antrum .L'ovocyte est alors entouré d'une couche régulière de cellules granuleuses, la couronne radiée ;
- une thèque interne richement vascularisée dont les cellules, sous l'influence de la LH, synthétise des androgènes ;
- une thèque externe fibreuse ;

une granulosa très développée, dont les cellules, porteuses de récepteurs à la FSH, transforment en œstrogènes les androgènes produits par la thèque interne. (Gilbert et al, 2005)

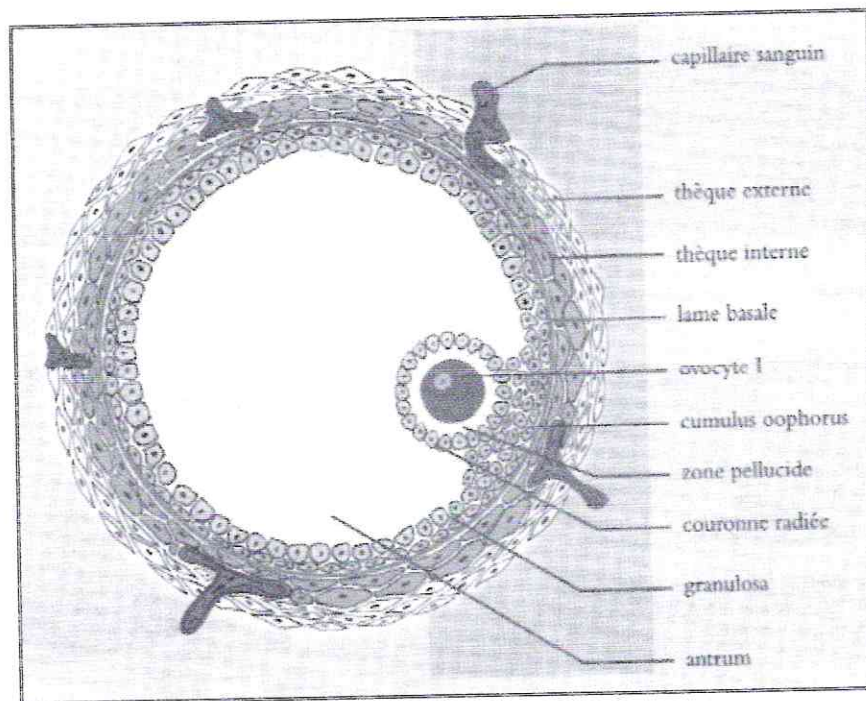


Figure5 : schéma d'un follicule de De Graaf. (Gilbert et al, 2005)

1-2-Dynamique de la croissance folliculaire :

A la naissance la population des follicules ovariens, principalement constituée par les follicules de la réserve ovarienne est d'environ 160 000 chez la brebis, 20.000 chez la ratte et 1 million chez la femme. Le nombre de follicules en croissance représente une faible proportion de l'effectif total. (cf figure 6) (Thibault et Levasseur ,2001)

1-2-1- Evolution en fonction de l'âge :

Plus l'âge augmente, plus l'effectif des différentes catégories de follicule diminue (figure6). L'apoptose est la principale responsable de l'épuisement de la réserve ovarienne. Chez la brebis et la vache, tout au long de la vie, la stabilité des effectifs de follicules à antrum est frappante ; exemple chez la brebis de 2 ans, il y a environs 40 follicules pendant la saison sexuelle ainsi qu'en fin de gestation, environ 60 pendant l'anoestrus saisonnier, et, chez la brebis de 8 ans, environ 50 follicules. (Thibault et Levasseur ,2001)

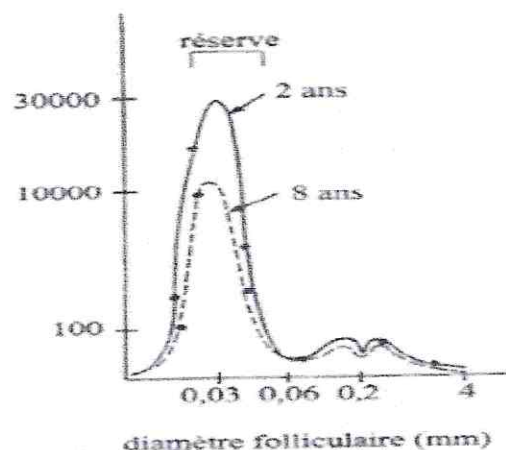


Figure6 : contributions respectives des différentes catégories folliculaires à l'effectif total des follicules ovariens chez la brebis. (Thibault et Levasseur ,2001)

1-2-2-Cinétique de la croissance folliculaire :

Chez tous les mammifères, l'index mitotique de la granulosa, reflet de la vitesse de croissance des follicules, évolue en fonction du diamètre folliculaire selon une courbe en cloche (cf figure7).

L'index mitotique des cellules de la thèque interne évolue selon le même mode mais avec une moindre amplitude. (Cahill et Mauleon ,1980)

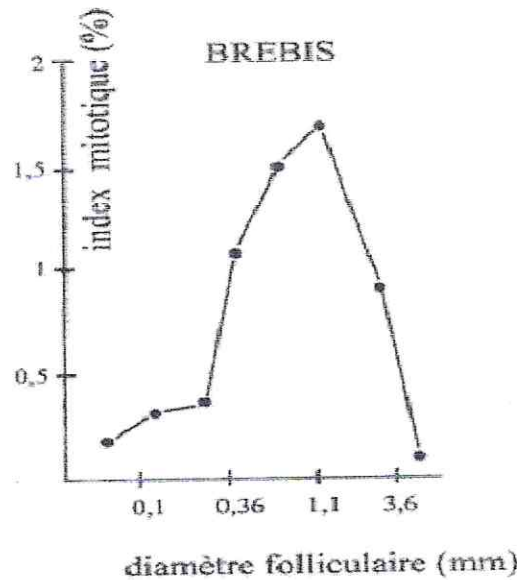


Figure7 : évolution de la capacité de prolifération des cellules de la granulosa en fonction du diamètre folliculaire. (Thibault et Levasseur ,2001)

1-2-3-Durée de la croissance folliculaire :

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

1-3-Initiation de la croissance folliculaire :

Le nombre de follicule quittant la réserve chaque jour est proportionnel à sa taille, il diminue en fonction de l'âge, chez la brebis adulte selon les races de 1-3. Chez la plus part des mammifères, les follicules primordiaux évoluent très lentement vers les stades intermédiaires et primaires, quand le noyau de l'ovocyte atteint environ 0.013 mm chez la brebis, le follicule entre en phase de croissance, caractérisée par un fort accroissement du diamètre ovocytaire, puis dans un second temps, du nombre de cellules de la granulosa. (Thibault et Levasseur ,2001)

1-4-Développement folliculaire basale :

La croissance et l'atrésie des plus petits follicules sont peu dépendantes des gonadotrophines et de leurs variations cycliques, mais ces hormones modulent probablement les capacités de synthèse et la maturation des cellules de la granulosa.

Chez la brebis, si tous les follicules à antrum de diamètre supérieur à 2 mm sont atretiques 4 jours après hypophysectomie ; 40 % environ des follicules de taille inférieure restent sains 70 jours après.

(Thibault et Levasseur ,2001)

2- Développement folliculaire terminale:

2-1-Définition :

Les follicules en fin de croissance sont dépendants des gonadotrophines ; la taille folliculaire où apparaît la dépendance est de 2mm chez la brebis, la folliculogénèse terminale débute dès ce stade et s'achève avec l'ovulation ; l'intervalle de temps nécessaire à son déroulement est de 2-3 jours chez la brebis, 4-5 jours chez la vache.

La croissance des follicules susceptibles d'ovuler se déroule de façon synchrone et coordonnée. Le suivie de la folliculogénèse par échographie suggère que dans presque toutes les espèces, la croissance folliculaire terminale est activée dès que le corps jaune régresse. La seule exception est constituée par la jument où la folliculogénèse terminale est initiée pendant la phase lutéale. Tous les follicules gonado-dépendants présents sur l'ovaire entrent alors en croissance terminale (recrutement), ils forment alors une « cohorte » qui comprend plusieurs follicules de taille et de sensibilité différente aux gonadotrophines (cf figure8). (Thibault et Levasseur ,2001)

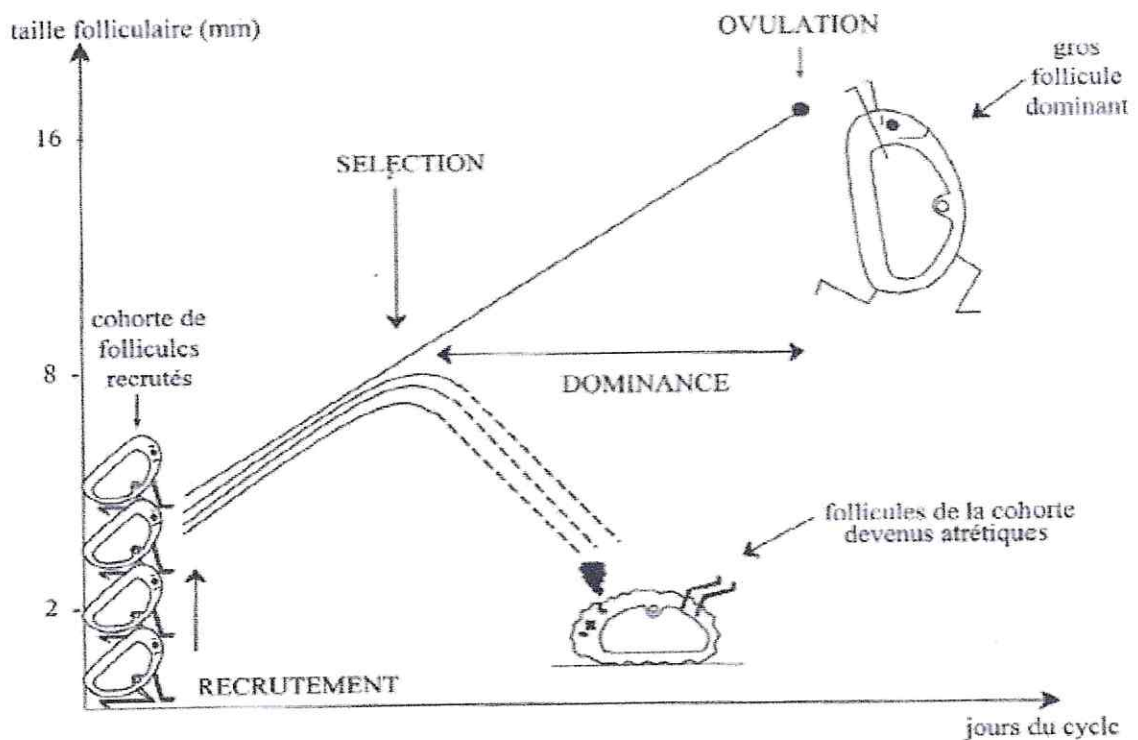


Figure 8: Principaux événements de la folliculogénèse terminale au cours de la phase folliculaire ; les trois processus, recrutement, sélection, dominance sont bien conservés dans toutes les espèces. (Thibault et Levasseur ,2001)

A mi-phase folliculaire, une sélection se produit et le taille de la cohorte est réduite au nombre d'ovulations caractéristiques de la race (1-2 chez la plus part des races ovines jusqu'à 10 chez certaines races), le ou les follicules destinés à ovuler, reconnaissables par la taille est appeler « follicule dominant » ; pendant la période de dominance sont observés :

- la croissance et la maturation folliculaire terminale du (ou des) follicule pré ovulatoire.
- la régression par atresie des autres follicules de la cohorte.
- blocage du recrutement de nouveaux follicules.

Le recrutement coïncide avec l'apparition d'une activité aromatasase dans la granulosa, la sélection coïncide avec l'apparition des récepteurs de LH sur la granulosa, une forte réduction des

quantités de certaines protéines de liaison des IGFs dans le liquide folliculaire et une forte production d'inhibine. (Driancourt, 2001)

L'intensité de la dominance, mesurée par l'écart de taille entre le follicule dominant et le plus gros follicule atreutique de la cohorte atteint 20mm chez la jument mais n'excède pas 2-3 mm chez la brebis. Il est donc bien plus facile d'identifier avec certitude un follicule dominant chez la jument que chez la brebis. (Thibault et Levasseur ,2001)

Cette croissance folliculaire s'effectue sous forme de vagues successives au cours d'un même cycle. On en compte trois de 5-6 jours chez la brebis, 3 de 7 jours chez la vache et la chèvre. Seule la dernière vague de croissance compte un ou des follicules qui pourront entreprendre la maturation et dépasser le stade du follicule de De Graaf pour arriver à l'ovulation.

Chez les ruminants, l'utérus n'a pas encore acquis une sensibilité suffisante avant l'atrésie des follicules de la première vague; ce sont ceux de la deuxième qui induisent la sécrétion de prostaglandines et entraînent la lutéolyse et s'atrésient en même temps; enfin, la troisième vague se développe sans l'influence inhibitrice de la progestérone et certains follicules pourront maturer et ovuler. (Royère et Thibault 2001)

2-2- Régulation des mécanismes de la folliculogénèse terminale :

Deux niveaux de régulation sont généralement évoqué : les régulations endocrine (FSH, LH) (cf figure 9) et les régulations locales qui affinent le message endocrine.

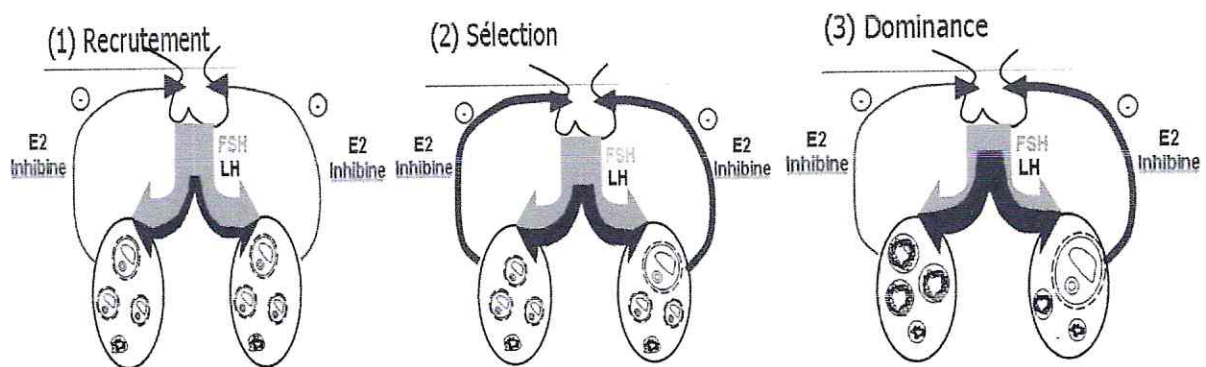


Figure 9 : sécrétion de gonadotrophines et facteurs de rétrocontrôles au cours des phases de recrutement, sélection et dominance .L'épaisseur des flèches dénote l'importance de chaque sécrétion .Les follicules atreutiques ont perdus leur structure caractéristique. (Gayrard ,2002)

a-Contrôle de recrutement:

FSH constitue le signal endocrine implique dans le recrutement :

- a)il existe un synchronisme presque parfait entre le niveau de FSH élevé et recrutement.
- b) l'inhibine déprime les niveaux de FSH et bloque le recrutement.
- c) chez des brebis rendus hypogonadotropes par administration d'un antagoniste (ou d'un agoniste) de la GNRH, l'administration de FSH (pure ou recombinante) est capable d'initier une croissance folliculaire terminale. (Royère et Thibault 2001)

b-Contrôle de la sélection :

Deux hypothèses sont impliquées :

- L'hypothèse gonadotrope fait intervenir la sensibilité individuelle des follicules de la cohorte à la FSH et le rétrocontrôle négatif sur le niveau de FSH exercé par l'oestradiol et
- l'inhibine dont la sécrétion augmente avec la croissance folliculaire. La chute de niveau de FSH bloque la croissance et la maturation des follicules de la cohorte qui avait les besoins les plus élevés en FSH.

- l'autre hypothèse celle de l'effet de la FSH à l'action d'un facteur locale produit par le plus gros follicule de la cohorte et inhibant la prolifération ou la différenciation cellulaire (aromatase, apparition des récepteurs de LH sur la granulosa) dans les autres follicules de la cohorte. (Royère et Thibault 2001)

c-Contrôle de la dominance :

Bien que les concentrations de FSH circulant soient réduites, le ou les follicules dominants poursuit sa croissance et sa maturation car ses besoins en FSH sont réduits ; trois propriétés du follicule dominant peuvent expliquer son aptitude à survivre dans un environnement appauvri en FSH :

- a) l'acquisition de récepteurs de LH sur la granulosa.
- b) l'amplification de la réponse folliculaire ; FSH et LH par des régulateurs paracrines et autocrines.
- c) une vascularisation sélectivement amplifiée pourrait assurer une diffusion facile de FSH et LH. (Royère et Thibault 2001)

3-L'ovulation:

Arrivée au terme de sa croissance, en réponse à une forte élévation des gonadotrophines, le follicule s'ouvre et libère l'ovocyte ; l'ovulation se produit 23-25 heures après chez la brebis, 29-31 chez la vache, 11-12h après chez la lapine, 35-36 h chez la femme. Environ 24 heures avant l'ovulation, le pic préovulatoire de LH fournit le signal endocrinien du début de la lutéinisation et des modifications qui vont provoquer la libération de l'ovocyte et la reprise de sa méiose. Lorsqu'il y a plus d'une ovulation, celle-ci se produit sur une courte période de temps. Par exemple, chez la brebis Romanov, race prolifique de taux de prolifération moyen de 3,5, l'intervalle de temps maximum qui sépare la première et la dernière ovulation est de quatre heures ; l'ovulation peut être bloquée en plaçant les animaux dans des conditions stressantes, avant le début du pic pré ovulatoire de LH. (Baril et al 1993)

4-L'atrésie folliculaire:

L'atrésie correspond à la régression du follicule jusqu'à sa disparition complète dans le stroma ovarien ; dans les follicules primaires et prématurés, elle débute par l'entrée en apoptose de l'ovocyte, en revanche dans les follicules à antrum, c'est une augmentation du taux d'apoptose des cellules de granulosa qui est le premier signe observable de l'atrésie. Dans les follicules à antrum, l'atrésie s'accompagne de changement fonctionnel qui se déroule suivant une chronologie précise. Ces changements fonctionnels traduisent la disparition des activités qui caractérisent le follicule sain et la mise en place des mécanismes aboutissants à son involution. Ils se produisent de façon concomitante dans les cellules de granulosa et de thèque. En début d'atrésie, aucun changement notable n'est observé dans les cellules du cumulus qui entourent l'ovocyte. Dans les follicules en développement terminale, l'entrée en apoptose des cellules de granulosa est étroitement contrôlée par les concentrations plasmatiques des gonadotrophines. (Baril et al 1993)

II/ LE CYCLE SEXUEL CHEZ LA BREBIS :

1-Définition :

Les brebis ont un rythme saisonnier de reproduction qui dépend de la variation de la durée du jour au cours de l'année, l'activité sexuelle maximale correspond à la période des décroissant, le reste de l'année est qualifié d'anoestrus saisonnier. L'apparition de l'activité sexuelle cyclique chez l'agnelle à la puberté se manifeste selon les races, à l'âge de 6-10 mois. (Derivaux et Ectors, 1980). Les femelles qui naissent en fin d'hiver, peuvent être mises à la reproduction en automne de la même année vers l'âge de 7-8 mois. Pour les naissances les plus tardives les femelles sont mises à la reproduction l'année prochaine. (Derivaux et Ectors, 1980).

Pendant la saison sexuelle, l'activité sexuelle se manifeste par le fait que les brebis viennent régulièrement en chaleur, tout les 17 j en moyenne. L'activité sexuelle chez la brebis se caractérise par une apparition périodique de l'oestrus qui dure de 18-72 heures et une moyenne qui se situe aux alentours de 36 heures. (Khiati, 1999)

Le cycle œstral se divise en deux phases :

- Phase folliculaire de 3-4 jours qui se termine par les chaleurs et l'ovulation.
- Phase lutéale qui prépare l'utérus pour l'implantation de l'embryon. Si la brebis n'a pas été fécondée, la phase lutéale est interrompue au bout de 13-14 jours et laisse place à une nouvelle phase folliculaire et donc un nouveau cycle sexuel. (Boukhliq, 2005)

2-Modification du comportement :

Chez la brebis, comme dans la plupart des espèces animales, la réceptivité sexuelle ou acceptation du mâle est limitée à une courte période de temps, classiquement appelée oestrus, aux alentours de l'ovulation et absente pendant les autres périodes de la vie de la femelle (phase lutéale du cycle œstral, anoestrus, gestation). Au contraire du mâle, le comportement sexuel de la femelle est spécifiquement hormono dépendant, et la sécrétion et l'action des hormones sont essentielles pour le déclenchement et l'expression de l'oestrus. Les facteurs sociaux tels que la présence du mâle peuvent être perçus comme des stimuli, mais ils sont incapables de maintenir le comportement sexuel par un entraînement régulier. Par conséquent, chez les races saisonnées, la saison sexuelle est plus marquée chez la femelle que chez le mâle. (Boukhliq, 2005)

3- L'anoestrus dit saisonnier :

Dans les pays tempérés, les ovins et les caprins manifestent d'importantes variations saisonnières de l'activité sexuelle dues à la photopériode, la température, l'alimentation ou encore les interactions entre individus. Dans les deux sexes, il existe une période d'activité sexuelle maximale qui s'étend, en général *d'août à janvier*, et une période d'activité minimale de *février à juillet*. On peut y voir dans les conditions naturelles la possibilité pour les petits ruminants de mettre bas pendant la meilleure période de l'année.

Les variations se manifestent, chez la femelle, par l'existence d'une période d'anoestrus saisonnier, de durée variable selon les races. (Hanzen, 2005)

On sait depuis longtemps que parmi d'autres, le changement de la durée d'éclairement quotidien (photopériode) est chez les petits ruminants un des principaux facteurs responsables de l'anoestrus dit saisonnier. Les jours dits courts sont stimulateurs de l'activité sexuelle et les jours longs inhibiteurs. (Hanzen, 2005)

Découverte en 1958 La mélatonine, une indolamine de faible poids moléculaire (231 Daltons) est la sécrétion principale de la glande pinéale chez les ovins et les caprins. Chez les races photopériodiques, la mélatonine traduit les effets de la lumière sur la reproduction. Elle n'est

sécritée que pendant la nuit et c'est par sa durée de sécrétion nocturne que les animaux perçoivent la durée du jour. Ses sites et son mode d'action sont encore mal connus, bien que plusieurs tissus cibles aient été récemment identifiés dans l'axe hypothalamo-hypophysaire du mouton (hypothalamus médiobasal et pars tubéris de l'hypophyse) (Boukhliq, 2005)

4-Hormones intervenants dans la régulation du cycle œstrale:

4-1- hormones gonadotropes et activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire :

4-1-1 -Hormones hypothalamiques (GnRH) :

Chez les animaux l'initiateur et le régulateur fondamental de la fonction reproductrice est la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormon). Quelques neurones situés dans l'hypothalamus (ou plancher du cerveau), appelés pour cette raison neurones à GnRH, sécrètent dans le sang porte hypophysaire, un décapeptide (10 acides aminés) qui est responsable de la sécrétion de la LH. La demi vie de cette neurohormone est très courte (4 à 5 minutes) et son action est essentiellement locale, limitée aux cellules hypophysaires. Elle est aussi appelée LHRH (LH Releasing Hormone), ou gonadolibérine (Boukhliq, 2005).

La libération de la GnRH s'établit après l'intégration par les neurones hypothalamiques d'un grand nombre d'informations nerveuses ou hormonales parvenant au système nerveux central. Les informations provenant du milieu extérieur ont également une très grande influence sur la pulsation de la GnRH : par exemple l'odeur du mâle peut chez la brebis augmenter la fréquence des pulses ; le photopériodisme par le biais de la mélatonine ; modifie l'activité des neurones de l'hypothalamus. (Gilbert et al 2005)

Le caractère pulsatile de la sécrétion de la GnRH semble jouer un rôle important dans la libération des gonadotrophines. La nature de liaison entre le système nerveux central et l'hypophyse via le système porte hypothalamo hypophysaire, permet une stimulation très fine des cellules gonadotropes. C'est à ce niveau que le message hormonal plus lent sert à coder l'état physiologique. Ainsi, chaque pulse de GnRH est suivi de pulse de LH, lui-même suivi d'une pulse d'oestradiol ou de progestérone à côté de son action sur la sécrétion des gonadotrophines la GnRH stimule la biosynthèse de FSH et de LH. Le mode d'action de la GnRH est doublée ; d'une part elle entraîne une libération rapide et transitoire des gonadotrophines et d'autre part, elle exerce une stimulation à long terme sur la synthèse de ces hormones. Cette action est consécutive à la fixation de la GnRH avec une affinité sur des récepteurs membranaires de nature glycoprotéique. (Caraty et al, 1997)

4-1-2- Hormones hypophysaires (hormones gonadotropes LH et FSH) :

Sécrétées par l'antéhypophyse, petite glande située juste sous le planché du cerveau ; les hormones gonadotropes sont des glycoprotéines dont le contenu en sucres est d'environ 13 % pour la LH ovine et 25 % pour la FSH ovine. L'acide sialique, qui fait partie du contenu en sucres, est essentiel pour l'expression de l'activité biologique des gonadotrophines car il prolonge la demi-vie des glycoprotéines en inhibant leur capture et leur dégradation par le foie. Toutes les hormones gonadotropes sont composées de deux sous unités α et β . Les sous unités α sont très semblables entre les hormones gonadotropes.

Dans l'espèce ovine, la sous unité α contient 96 acides aminés et la sous unité β LH 119 acides aminés. Les différents sous unités employées seules ne possèdent pas ou presque pas d'activité biologique; toutefois, les sous unité β quand elle est associée à une sous unité α est responsable de l'activité de l'hormone. Au site d'action gonadique, les hormones gonadotropes reconnaissent

des sites récepteurs très spécifiques à la surface des "cellules cibles". La liaison entre l'hormone et son récepteur provoque une cascade d'événements intracellulaires qui conduisent à une réponse spécifique de la cellule. (Boukhlif, 2005)

4-1-2-1- FSH (*Follicule Stimulating Hormon*) :

La FSH est une glycoprotéine synthétisée par l'antéhypophyse, déjà dans l'hypophyse d'agneaux femelles de 80 à 100 jours. FSH contrôle le développement de l'ovaire et la croissance folliculaire (assure la croissance d'un follicule sélectionnable en follicule pré ovulatoire), prépare l'action de LH par fragilisation de la membrane du follicule de De Graaf, et stimule la sécrétion d'oestrogènes par les cellules de la granulosa. (Rieutort, 1995).

La FSH contrôle l'aromatase, enzyme responsable de l'aromatation des androgènes en oestrogène et dont l'activité est plus importante dans le follicule dominant que dans les follicules dominés (Henzen, 2000). Elle stimule la multiplication des cellules de la granulosa et la formation de l'antrum, d'autant plus fortement qu'il existe une imprégnation préalable par les oestrogènes (Rieutort, 1995)

4-1-2-2-LH (*Luteinizing Hormon*) :

La LH ou ICSH (interstitiel cell stimulating hormone) est une glycoprotéine sécrétée par l'antéhypophyse, elle a une action complexe sur l'ovaire. (Rieutort, 1995)

Elle agit sur le follicule préovulatoire en diminuant le taux de récepteurs à la FSH, déclenche la reprise de la méiose, et sous son influence le follicule donne des oestrogènes et le corps jaune donne de la progestérone. (Rieutort, 1995)

Au cours de la gestation, aucune augmentation en ICSH dans le sang ne se produit chez la brebis, les taux se maintiennent aux alentours de 2 ug/ml. (Raymond Gilles et al 2006)

Le pic des gonadotrophines (LH et FSH) déclenche : La maturation folliculaire, la reprise de la deuxième division méiotique, et l'ovulation. (Raymond Gilles et al ,2006)

4-1-3-Activité de l'axe hypothalamo hypophysaire :

Au début du cycle, l'hypothalamus secrète la gonadolibérine (GnRH) qui stimule, juste au dessous de lui la sécrétion de l'hypophyse de FSH et LH .ces deux hormones se rendent par le sang dans l'organisme ; dans l'ovaire (un follicule ou plusieurs se développe et sa thèque interne secrète l'oestradiol .Cette sécrétion d'oestradiol prévient l'hypothalamus qu'il doit intensifier sa sécrétion de GnRH ce qu'il fait aussi tôt l'hypophyse, a son tour renforce la production de FSH et LH , et la thèque interne du follicule intensifie sa sécrétion d'oestradiol .

Il arrive un moment ou ce renforcement de sécrétion de (FSH, LH, GNRH) aboutit à une telle montée du taux de FSH et LH (montée, qui sur une courbe forme deux pics) et que l'ovulation se produit. A la place du follicule s'installe donc le corps jaune, qui se met a secrété activement la progestérone et aussi l'oestradiol mais cette fois c'est l'action de la progestérone qui domine ; alors que l'oestradiol excitait l'hypothalamus, la progestérone freine la sécrétion de GnRH d'où diminution des taux de FSH et LH, l'ovaire de se fait diminuer sa sécrétion d'oestradiol et de progestérone : le corps jaune régresse et lorsqu'il a suffisamment régressé, le frein qu'exerçait la progestérone sur l'hypothalamus se desserre, et la production de GnRH reprend (un nouveau cycle se met en route). (Soltner, 2004)

4-2-Les hormones ovariennes et prostaglandine :

4-2-1- Stéroïdes ovariens :

a-Les œstrogènes :

Les hormones stéroïdiennes, de nature lipidique et toutes fabriquées à partir du cholestérol, sont les œstrogènes et la progestérone spécifiquement active chez la femelle.

Étymologiquement, Œstrogène signifie « qui engendre l'oestrus » ; parmi les œstrogènes l'oestradiol 17bêta, est la principale hormone sécrétée par le follicule sain, essentiellement par les cellules de la thèque interne, et par les cellules interstitielles particulièrement pendant la croissance folliculaire terminale. Sa sécrétion dans le plasma sanguin de la veine ovarienne est sous le contrôle direct de la pulsativité de la LH. Chaque pulse de LH produit l'apparition d'un pulse d'oestradiol 17bêta. Avant l'ovulation, le follicule préovulatoire sécrète d'importantes quantités d'oestradiol 17bêta qui peuvent être détectées dans le plasma de la circulation générale. L'oestradiol 175 et d'autres œstrogènes sont également sécrétés par l'unité fœto-placentaire. (Boukhliq, 2005)

Les différentes actions connues de l'oestradiol 17bêta sont également les suivantes:

- Induction du pic préovulatoire de LH et de FSH au début de l'oestrus, par la mise en jeu d'une rétroaction positive sur l'axe hypothalamo hypophysaire;
- Déclenchement direct du comportement sexuel femelle avant l'ovulation, mais également action sur le comportement mâle, puisque la testostérone est transformée en oestradiol dans le système nerveux;
- Modification de l'activité des cellules utérines pour faciliter le transport des spermatozoïdes et préparer l'utérus à l'action de la progestérone;
- Contrôle de la synthèse et libération de la prostaglandine F2alpha par l'utérus, avant la lutéolyse
- Rétroaction négative sur l'axe hypothalamo hypophysaire (en dehors de la période préovulatoire). (Gilles et al 2006)

b- La progestérone :

La progestérone est la principale hormone sécrétée par le corps jaune formé après lutéinisation des cellules folliculaires consécutive à l'ovulation. La progestérone est également sécrétée par l'unité fœto-placentaire. La sécrétion de progestérone est sous le contrôle de la LH. La progestérone n'a aucune action sur une muqueuse au repos, c'est à dire, sur une muqueuse qui n'a pas été préalablement imprégnée par l'oestradiol de ce fait la progestérone a un double effet (une action anti-œstrogénique et d'autre part une action spécifique) .D'autres effets connus sont les suivants:

- Blocage des ovulations cycliques par rétroaction négative sur l'axe hypothalamo hypophysaire;
- Chez la brebis, sensibilisation du système nerveux à l'action des œstrogènes pour l'induction du comportement d'oestrus. (Boukhliq, 2005)

4-2-2- Les Peptides ovariennes :

a- L'inhibine :

L'inhibine est une substance protidique classée dans le groupe des cybernine : substance autre que les stéroïdes interférant sur le contrôle des gonadotrophines hypophysaires et intervenant dans le processus de maturation gamétique .leur intervention se situerait au niveau des facteurs de liaison des hormones hypophysaires sur les récepteurs gonadiques. (Gilbert et al 2005)

L'inhibine présente une dualité d'action ; la première s'exerce de manière locale, au niveau des follicules eux-mêmes, elle limiterait de manière autocrine la conversion d'androgène en œstrogènes par action sur l'aromatase présente au niveau des cellules de la granulosa ; la seconde action de l'inhibine est périphérique, elle inhibe la sécrétion de FSH hypophysaire. (Woodruff et al ,1990)

4-2-3- Les Hormones de l'utérus :

a- La prostaglandine :

La prostaglandine F2 α de faible poids moléculaire (environ 300 Daltons) n'est pas un stéroïde, mais un dérivé de l'acide arachidonique. La prostaglandine F2 α est sécrétée par l'utérus en réponse aux pulses d'oestradiol provenant de l'ovaire lors de la lutéolyse.

La PGF2 α présente dans le follicule pré ovulatoire, permet l'éclatement du follicule au moment de l'ovulation.

Elle déclenche la régression du corps jaune ou lutéolyse et sa disparition du à la fin du cycle, si la femelle n'est pas gestante. (Boukhliq ,2005)

5-Les différentes phases du cycle œstrale chez la brebis :

La durée du cycle est généralement uniforme pour une race donnée ; elle varie de 14 à 20 jours avec une moyenne de 17 jours.

Le pro oestrus est de 3 jours, l'oestrus de 30 à 48 heures, le metoestrus de 2 jours et di-oestrus de 10 à 14 jours. L'oestrus est généralement plus court en début et en fin de saison, comme aussi lorsque le bélier est constamment maintenu au sein du troupeau. L'ovulation se produit en fin de période oestrale, soit 18 à 30 heures après le début de l'oestrus ; elle est plus fréquente au niveau de l'ovaire droit que de l'ovaire gauche.

Il est peu fréquent que l'oestrus survienne en cours de lactation ; les chaleurs se manifestent si on sépare l'agneau de la mère, ou bien au moment du sevrage de l'agneau ou encore à la fin de la lactation.

Il arrive qu'une ait lieu 15 à 20 heures après la parturition mais elle ne s'accompagne pas de développement folliculaire, ni d'ovulation. (Derivaux et Ectors ,1980)

5-1- Proœstrus (*période de maturation folliculaire*) :

Au stade du proœstrus ; un ou plusieurs follicules ovariens sont en voie de maturation sous l'influence de la FSH et de la LH .L'action de cette dernière devient progressivement prédominante et en résulte une production de plus en plus grande d'hormones folliculaires par la granulosa ; ces œstrogènes vont finalement déclencher l'apparition de la seconde phase du cycle œstrale. le pro œstrus dure 2-3jours chez les petits ruminants.

Sous l'influence des quantités importantes d'œstrogènes produites par l'épithélium folliculaire à la fin du proœstrus les glandes utérines prolifèrent et le volume de l'utérus augmente (phase de prolifération) mais cette augmentation de volume est surtout due à une inhibition œdémateuse de la muqueuse. (Kolb, 1975)

5-2-Oestrus (*chaleur*) :

La vocation naturelle de l'œstrus est le rapprochement des deux partenaires sexuels. Celui-ci comporte dans un premier temps la recherche de ce partenaire, puis dans un second temps l'apparition d'une réponse posturale caractéristique de l'accouplement. Au cours de ces deux séquences associées aux variations plasmatiques de la progestérone (diminution), de l'œstradiol 17 B (augmentation) et des hormones hypophysaires LH et FSH (augmentation). (Hanzen ,2005)

L'œstrus correspond à la maturation du follicule et à la sécrétion maximale d'œstrogène. (Gilbert et al, 2005). Chez la brebis, les chaleurs durent normalement 24-30 heures et les chances de fécondations sont maximales à la fin de cette période .Les chaleurs peuvent durée plus longtemps en cas d'ovulation double ou multiple ; en générale 1 à7 follicules arrivent à maturité dans chaque cycle. (Kolb ; 1975)

5- 3- Metoestrus (*phase anabolique du corps jaune*) :

Après l'oestrus, le corps jaune se développe dans le follicule rupture et au bout de 6-10 jours, il est devenu une glande endocrine fonctionnelle ; qui va produire de la progestérone tout au long de la phase lutéale, bloquant ainsi la libération d'hormones gonadotropes par l'hypophyse. (Boukhliq, 2005)

Le devenir du corps jaune est conditionné par celui de l'ovule. (Kolb, 1975) ; Si la brebis n'a pas été fécondée, la phase lutéale est interrompue au bout de 13 à 14 jours et laisse place à une nouvelle phase folliculaire et donc à un nouveau cycle sexuel. Si celui -ci est fécondé, le corps jaune reste actif et empêche la maturation de nouveaux follicules. (Boukhliq, 2005)

Durant cette période la femelle n'accepte plus de se laisser monter .Elle deviennent plus calme, la vulve se décongestionne, le mucus redevient plus épais et ne s'étire plus. (Gilbert ,2005)

5- 4- Dioestrus :

En cas de non fécondation, le corps jaune commence à régresser à partir des 10 jours environs qui suivent l'ovulation .La production de progestérone diminue et son action inhibitrice sur l'antéhypophyse s'affaiblit ; une nouvelle maturation folliculaire va pouvoir commencer. La durée du dioestrus chez les ruminants est de 7 jours environ. (Kolb ,1975)

III/LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LA BREBIS

1- Fécondation :

Les spermatozoïdes sont incapables de pénétrer un ovule; après un séjour dans le tractus génital femelle (1,5 heure chez la brebis), ils acquièrent leur aptitude à la fécondation; c'est la *capacitation*. Après la réaction acrosomique qui a lieu dès que la fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide est réalisée, la libération des enzymes acrosomiques et les mouvements violents du flagelle permettront au sperme fécondant de traverser la zone pellucide et de fusionner avec la membrane plasmique de l'œuf. (Baril et al ; 1993)

La pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde provoque une série de changements conduisant au développement normal de l'œuf. Le premier d'entre eux est la modification structurale de la zone pellucide pour prévenir la pénétration de l'œuf par plus d'un spermatozoïde. Le second est la reprise et l'achèvement de la méiose avec l'extrusion du second globule polaire. Les pronucléus mâle et femelle sont alors formés par décondensation des chromatines respectives, puis s'unissent pour donner le noyau diploïde d'une seule cellule. La fécondation provoque également l'activation de l'œuf qui se divisera 24 heures plus tard. (Baril et al ; 1993)

2- Développement embryonnaire précoce:

Après la fécondation l'ovocyte commence la mitose qui le conduit à former un embryon de deux cellules (ou *blastomères*). Chaque cellule est de la même taille, moitié de la taille originale de la cellule initiale. Chacun de ces deux blastomères se divise à nouveau produisant un embryon à quatre cellules. (Baril et al ; 1993)

Les divisions se succèdent pour donner un embryon à huit puis 16 cellules et ainsi de suite. Les divisions cellulaires ne sont pas tout à fait synchrones et des nombres impairs de cellules sont observés. Tout au long de ces divisions, les cellules deviennent de plus en plus petites, sans accroissement notable de la taille de l'embryon, maintenu dans sa zone pellucide. (Baril et al ; 1993)

Ces divisions successives conduisent à une petite balle compacte, appelée *morula*, formée de 16 à 32 cellules. L'embryon ovin passe de l'oviducte à l'utérus 60 à 72 heures après l'ovulation, lorsqu'il est formé de 8 à 16 cellules, au stade *jeune morula*. (Baril et al ; 1993)

Après le stade *morula*, l'embryon forme une cavité pleine de liquide, le *blastocèle*, l'embryon est alors appelé *blastocyste*. La couche cellulaire externe, appelée le *trophoblaste*, formera le chorion foetal. A l'opposé du *blastocèle*, un groupe de cellules, le *disque embryonnaire*, formera le fœtus lui-même.

Une fois le *blastocèle* formé, le *blastocyste* va passer par une série de lentes expansions suivies de rapides contractions et d'un accroissement de sa taille. Il sortira finalement de la zone pellucide, pour subir une élongation dans la lumière utérine. La chronologie de ces différents événements pendant le développement embryonnaire précoce est représentée au (tableau 2 et 3) (Wintenberger-Torres et Sevellec ; 1987)

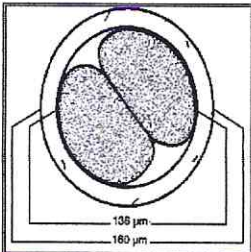
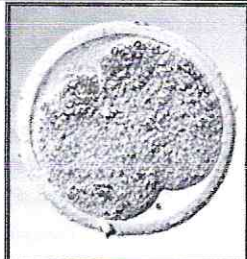
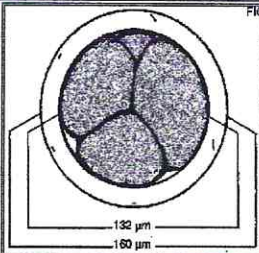
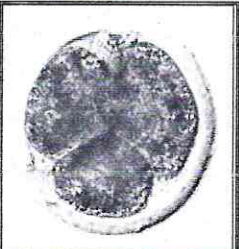
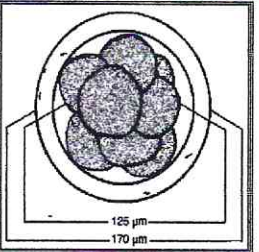
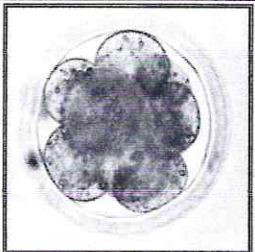
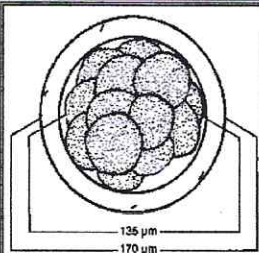
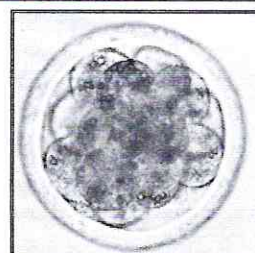
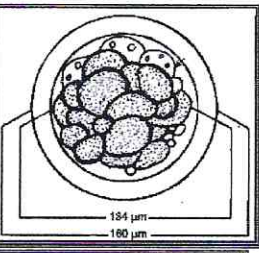
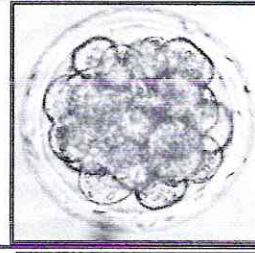
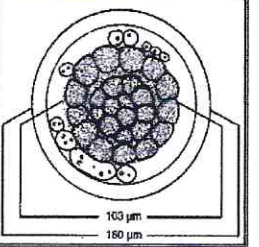
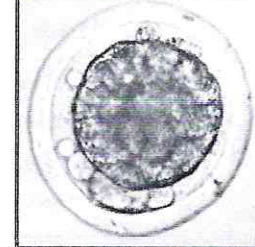
Immédiatement après la fécondation, l'embryon commence à jouer un rôle actif en sécrétant des substances qui agissent sur la mère. Quelques heures après la fécondation, il est en effet possible de détecter un composé protéique spécifique (qui inhibe la formation de la «rosette» dans un test immunologique), dans le sérum sanguin de la mère. Quand le *blastocèle* est formé, l'embryon est déjà capable de synthétiser et de sécréter différentes protéines. Aux jours 10-12 de gestation (jour 0 = jour du début de l'oestrus) chez la brebis, le *trophoblaste* sécrète un composé protéique (la «*trophoblastine*»), qui bloque l'activité lutéolytique de la prostaglandine F2 α . Ce blocage

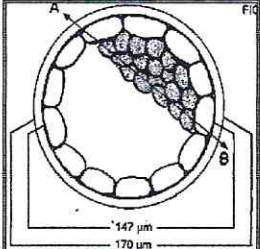
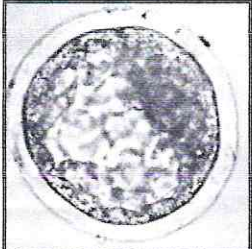
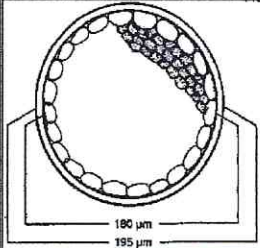
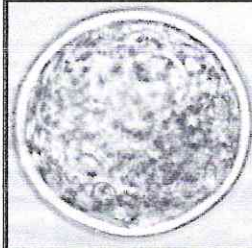
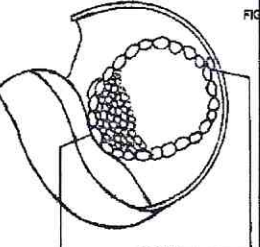
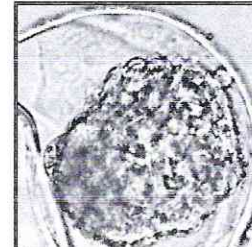
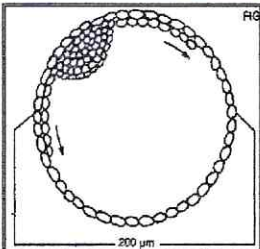
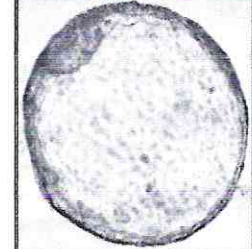
permet au corps jaune de continuer à sécréter de la progestérone jusqu'à la mise bas. L'embryon commence à s'attacher au jour 14 de gestation, quand la vésicule chorionique s'est développée suffisamment pour venir en contact étroit avec l'épithélium de la corne utérine; c'est la *nidation*.

Tableau 02 : chronologie du développement de l'embryon ovin (Wintenberger-Torres et Sevellec ; 1987)

Jours	Stades avant et après l'ovulation	Temps en heures après le début de l'œstrus
J0	Début des chaleurs	0h
	Pic de LH	Début des l'œstrus
	Insémination ou accouplement	0-12h
J1	ovulation	24-30h
	fécondation	25-31h
J2	stade 2 blastomères (1ere division)	56h
J2	stade 4 blastomères	
J3	stade 8 blastomères	
J4	16 cellules : morula	60h
J5	48 cellules (16-76) : morula	72h
J6	100 cellules (44-150) : jeune blastocyste	96h
J7	200 cellules (138-308) : blastocyste	
J8	400 cellules (150-650) : blastocyste sortant de la zone pellucide (ZP)	
J9	400 cellules (250-550) : blastocyste sans zone pellucide	
J10	700 cellules (230-1620) : blastocyste en expansion	
J14	Implantation : les premiers contacts entre les cellules du trophoblaste et l'épithélium de l'endomètre qui marquent le début de l'implantation	

Tableau 03: Segmentation d'embryons normaux (j 0 – j10) (Wintenberger-Torres et Sevellec ; 1987)

Jours	Stade de développement	Schéma théorique	Coupes histologiques des différents stades d'embryons frais
J1	stade deux blastomères		
J2	stade quatre blastomères		
J3	stade huit blastomères		
J4	stade seize blastomères		
J5	stade 40 blastomères		
J6	stade 80 blastomères Limites cellulaires moins distinctes		

jours	Stade de développement	Schéma théorique	Coupes histologiques des différents stades d'embryons frais
J7	Stade jeune blastocyste -Formation du la blastocoele -Amincissement de la pellucide		
J8	Stade blastocyste. -Agrandissement du blastocoele -Poursuite de l'amincissement de la pellucide		
J9	Embryon stade blastocyste -Rupture de la pellucide (hatching)		
J10	Blastocyste libéré de sa pellucide -Début de migration de l'endoderme.		

CHAPITRE III

MAITRISE DU CYCLE SEXUEL CHEZ LES OVINS

1-Introduction :

La maîtrise de la reproduction présente plusieurs avantages considérables. Elle permet de choisir la période de mise bas, de diminuer les périodes improductives, d'optimiser la taille de la portée et enfin d'accélérer le progrès génétique. C'est également un outil de base indispensable à la mise au point de nouvelles biotechnologies de l'embryon ou de conservation du patrimoine génétique.

2-Détection de l'oestrus :

La détection des chaleurs (oestrus) représente un des facteurs essentiels d'obtention d'une fécondité et d'une fertilité normale. Multiples sont les facteurs qui conditionnent l'extériorisation normale des symptômes de l'oestrus. Divers sont également les moyens qui directement ou indirectement améliorent la qualité de la détection des chaleurs (Hanzen, 2005).

La détection de l'oestrus peut être basée sur l'observation directe des étapes successives du comportement d'oestrus par des personnes entraînées, (cf. figure10) (Baril et al 1993):

- grâce à des males entiers portant un tablier abdominal.
- Avec des males vasectomisés.
- Avec des femelles endrogenésées ou des males castrés.
-

La femelle, au moment de l'oestrus, est sensible à l'odeur du mâle et répond à sa cour par l'immobilisation posturale, nécessaire à l'accouplement.

Outre la recherche active du mâle, les brebis manifestent d'autres signes externes qui sont plus ou moins perceptibles, selon les races ou les individus, au moment de l'oestrus. Il s'agit de: L'agitation de la queue ; la tête tournée vers le mâle, souvent complètement, si celui ci se trouve derrière elle; des bêlements, plus fréquents si le mâle est absent. Ces signes apparaissent et disparaissent progressivement avec le début et la fin du comportement d'oestrus. Ces événements sont responsables des modifications des comportements alimentaires et de repos chez la femelle. La présence des mâles et les accouplements répétés est capable de réduire la durée de l'oestrus (Hanzen, 2005)

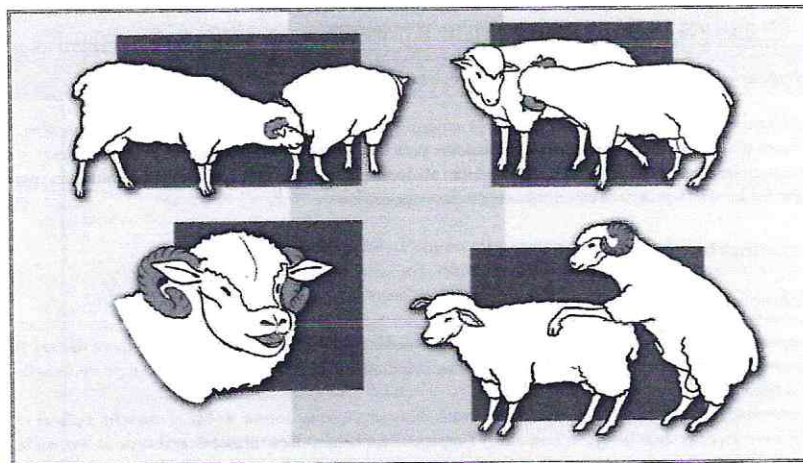


Figure 10: comportement sexuel lors de l'oestrus (Florence et al, 2005)

3-Maîtrise du cycle sexuel :

3-1-Méthodes zootechniques :

3-1-1-Effet bélier :

L'effet mâle est une méthode employée depuis très longtemps chez les ovins puisque la première référence connue date de 1813 (*Girard, 1813*). "L'effet bélier" est utilisé, soit pour avancer le début de la saison sexuelle ; soit pour rompre l'anoestrus post-partum. L'introduction de béliers entiers ou de leurs substituts (mâles castrés et traités aux stéroïdes, femelles traitées aux androgènes, ou odeur des béliers) dans un troupeau de femelles non cyclées induit l'ovulation chez la grande majorité des brebis. Cet effet est d'autant plus marqué que l'on se rapproche du début de la saison sexuelle. Le stimulus du mâle induit une accélération des décharges pulsatiles de LH conduisant à un pic préovulatoire et donnant lieu à l'ovulation 48 h environ après la mise au mâle. (*Thimonier et al, 1986*).

Après une période d'isolement sensoriel complet, l'introduction d'un mâle dans un troupeau de femelles provoque immédiatement une brusque augmentation de la fréquence et de l'amplitude des pics de LH. Au plan physiologique, les échanges sensoriels mis en jeu peuvent intervenir sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et contrôler l'activité ovarienne. La perception du mâle se fait essentiellement par voie olfactive. Cependant, les stimuli tactiles (activité mâle, poursuites sexuelles) peuvent également jouer un rôle. (*Hanzen, 2005*)

Chez la brebis, la durée de l'isolement sensoriel doit être au minimum de trois semaines. Les premières ovulations ont lieu dans un délai de 48 heures après l'introduction du bélier, elles sont silencieuses. Les œstrus se manifestent en moyenne 18 à 25 jours, (*Hanzen, 2005*) où il existe deux pics d'apparition des chaleurs, respectivement 18-20 jours et 24-26 jours après introduction des béliers. (*Thimonier, 2000*).

L'effet mâle ne sera optimisé que moyennant le respect de quelques conditions préalables (*Hanzen 2005*) :

- On évitera de pratiquer au cours du mois précédant la lutte, des interventions quelque peu « stressantes » telles la tonte, les vaccinations, le déparasitage, la taille des onglons, le changement d'environnement
- Compte tenu de la longueur du cycle spermatogonique (60 jours), la préparation des béliers commencera deux mois environ avant la lutte : examen du tractus génital, examen du sperme, augmentation de la surface d'hébergement pour augmenter l'activité physique, stimulation de l'ardeur sexuelle par mise en présence de femelles en chaleur.
- Mise en place d'un flushing chez les mâles et les femelles

3-1-2-Eclairage artificiel (photopériode) :

L'existence de variations saisonnières de l'activité sexuelle des brebis et des chèvres est connue depuis plusieurs dizaines d'années (*Ortavant et al 1988*).

Des équipes travaillant depuis de nombreuses années sur le contrôle de l'activité sexuelle des petits ruminants par la photopériode, ont permis d'expérimenter, puis de proposer aux professionnels de la filière, une palette de traitements "photopériodiques". Ceux-ci leur permettent précisément d'atténuer ou d'abolir les effets néfastes des variations saisonnières d'activité sexuelle. (*Chemineau et al 1988*)

Le principe du traitement photopériodique est le suivant :

On fait croire aux animaux qu'ils sont au printemps ou en été alors qu'on est en fin d'automne ou en hiver. A cette période de jours longs succédera une période jours courts. En pratique, la méthode

consistera à éclairer la bergerie (tubes néons si possible car moins agressifs pour les yeux ou halogènes fournissant 200 lux au niveau des yeux des animaux) pendant 15 à 18 heures d'une part dès 6 heures du matin jusque l'aube et d'autre part du crépuscule jusque 22 voire 24 heures. La phase d'éclairage en jours longs doit durer au moins 75 voire 90 heures. Cette phase de jours longs est suivie d'une phase de jours courts qui correspondra à l'éclairage naturel si la phase de jours longs se termine avant la mi-mars. Si ce n'est pas le cas, la phase de jours courts est créée en occultant la bergerie. Le retour des jours courts déclenche l'apparition des chaleurs dans les jours qui suivent.

Ce schéma d'intervention peut dans le cas de bâtiments ouverts être reproduit par l'administration de mélatonine) soit sous forme d'injection journalière soit sous forme d'implants sous-cutanés (Mélovine) de manière à avoir des concentrations plasmatiques voisines de 50 % du niveau nocturne des animaux témoins. Une combinaison des deux traitements photopériodisme et mélatonine est envisageable en recourant à la succession éclairage - mélatonine « flash mélatonine ». Une période dite de jours longs sera appliquée pendant deux mois au moins au cours de l'hiver. Elle sera suivie par un traitement au moyen de mélatonine au cours du printemps de manière à prévoir une période de lutte à la fin de celui-ci (introduction des béliers 70 jours après le début du traitement à la mélatonine). (Hanzen, 2005)

A ce jour, cette technique est encore peu employée en élevage ovin, toutefois, les premiers résultats obtenus montrent qu'en lutte naturelle, la fertilité et la prolificité sont proches de celles de la saison sexuelle alors que les brebis sont fécondes en avril -mai.

Sur le plan du travail et des équipements, l'emploi de cette technique nécessite des adaptations de l'installation électrique. La nécessité de maintenir les brebis en bergerie au moins pendant la nuit au cours de la période des flashes lumineux peut engendrer des coûts supplémentaires d'alimentation en cas de conduite à l'herbe en hiver. (Bonne, 2005)

3-1-3-Flushing :

Chez la brebis, le poids vif avant la lutte, reflet de l'état nutritionnel moyen du troupeau, a une influence déterminante sur le taux d'ovulation, la fertilité et la prolificité. De plus, la prise de poids avant la lutte est un facteur d'amélioration des performances de reproduction. Le flushing consiste à augmenter temporairement le niveau énergétique de la ration, de façon à compenser les effets d'un niveau alimentaire insuffisant ou d'un mauvais état corporel. En pratique, l'apport de 300g de concentré supplémentaire par brebis et par jour, quatre semaines avant et trois semaines après la lutte permet d'augmenter le taux d'ovulations et de réduire la mortalité embryonnaire. (Hanzen, 2005)

➤ Aussi ce sont toujours les brebis les plus lourdes qui ont la prolificité la plus élevée.

➤ Une complémentation minérale et vitaminique à cette période est aussi une bonne précaution. Chez les males, cette suralimentation doit commencer 2 mois avant la lutte (car la durée de formation des spermatozoïdes est de 40 jours et leur durée de transit est de 20 jours) par un apport de fourrage de bonne qualité ou par une supplémentation de 300 à 500 g de concentré. (Issif, 2001)

3-2-Méthodes hormonales :

3-2-1-Progestérones :

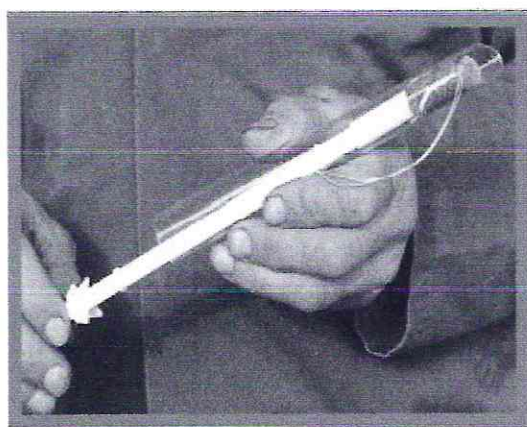
Pour de raisons de gestion de la reproduction chez les brebis, on fait parfois recours à des méthodes de synchronisation des chaleurs dont la principale est basée sur l'utilisation de progestagènes (FGA - Acétate de fluorogestone, MAP - Acétate medronyprogestérone) se sont les protocoles les plus répandus (Boukhliq, 2005)

Le principe est d'induire pendant un temps donné chez l'animal une source exogène de progestérone afin de mimer la présence d'un corps jaune et ainsi bloquer tout les animaux au même stade du cycle (dioestrus). Différents dispositifs permettent la diffusion progressive de l'hormone, éponge vaginale (cf photo 4 et 5), des CIRDS (Controlled Internal Drug-Releasing Device) (Whitly et Jackson, 2004)

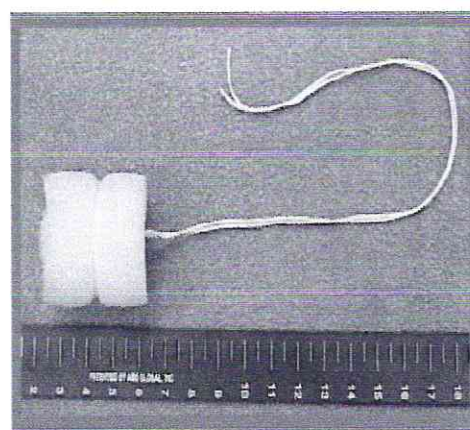
La progestérone peut être combinée aux gonadotrophines (PMSG, HCG, GnRH) pour avancer la saison sexuelle, pour synchroniser les chaleurs ou améliorer la prolificité.

La méthode de synchronisation avec des éponges vaginales comprend trois étapes:

- la mise en place dans le vagin de la brebis ou de l'agnelle d'une éponge, en mousse de polyuréthane imprégnée de progestérone, (30 à 40 mg d'acétate de fluorogestone).
- l'injection intramusculaire d'une dose de PMSG lors de retrait de l'éponge.
- le contrôle des conditions de fécondation (saillies ou insémination artificielle).



(A)



(B)

Photo 4 : (A) Dispositif de mise en place. (B) Eponge vaginale (CLEMENT, 2006)

La progestérone contenue dans l'éponge est absorbée par la muqueuse et agit en bloquant les décharges cycliques d'hormones gonadotropes hypophysaires (cas des brebis en activité sexuelle), et en préparant l'action de la PMSG (cas des brebis en anœstrus). La durée et la dose de FGA est tributaire de la saison (tableau 1) (Hanzen, 2005)

Tableau 4: Modalités pratiques d'utilisation des progestagènes (FGA) chez les ovins (Hanzen, 2005)

Paramètres	Saison sexuelle	Contre saison
Dose de FGA	40 mg	30 mg
Durée du traitement	14 jours	12 jours
Dose de PMSG	300 à 600 UI	400 à 700 UI
Moment d'injection	Au retrait	Au retrait
Moment de la saillie (monte en main)	48 à 60 h 1 bélier / 10 brebis 1 bélier / 7 à 8 agnelles	48 à 60 h 1 bélier / 5 brebis 1 bélier / 3 à 4 agnelles
Moment d'insémination	Brebis : 55 heures Agnelle : 52 heures	Brebis : 55 heures Agnelle : 52 heures

3-2-2- Les prostaglandines :

L'effet lutéolytique de la prostaglandine $F_2\alpha$ est connu depuis 1972/1973 (Lauderdale *et al*, 1974). Elle peut être injectée seule (injection unique ou multiple) ou bien associée avec les progestagènes.

A-En injection unique ou répétée :

La maîtrise de la phase lutéale peut chez les femelles cyclées être obtenue en faisant appel à la prostaglandine $F_2\alpha$ seule.

Chez les petits ruminants, la prostaglandine n'induit la lutéolyse qu'entrent le 5^{ème} et le 14^{ème} jour du cycle. La progestéronémie diminue au cours des 24 heures suivant l'injection, l'oestrus apparaissant chez la brebis dans un délai de 38 heures en moyenne. L'ovulation survenant 93 ± 8 heures après l'injection de la prostaglandine.

Des résultats forts variables ont néanmoins été observés compte tenu de la dose utilisée et du moment du cycle auquel la $PGF_2\alpha$ a été injectée.

- Le cloprostenol est lutéolytique aux doses comprises entre 31 et 125 mg chez la brebis. La plupart des auteurs recommandent l'utilisation chez la brebis d'une dose de cloprostenol comprise entre 100 et 125 mg.
- En ce qui concerne le dinoprost, le même effet est observé à la dose de 20 mg chez la brebis quoique des doses de 4 mg chez la brebis ait également permis d'obtenir le même effet (Berthelot *et al* ; 2002). Une dose de 8 mg de dinoprost administrée entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle est moins efficace qu'une dose de 16 ou 24 mg.

Chez la brebis, en cas de double injection de 125 mg de cloprostenol, un intervalle de 11 jours semble devoir être préféré à un intervalle de 9 ou 10 jours. (Ott *et al* ; 1980).

B-En association avec les progestagènes :

Chez les brebis, l'induction et/ou la synchronisation de l'oestrus peut être obtenue par un traitement combinant progestagènes et prostaglandine avec ou sans PMSG ou par une injection unique ou double de prostaglandine.

Chez la brebis, des éponges vaginales imprégnées de 60 mg de MAP sont laissées en place pendant 7 à 8 jours et 20 mg de dinoprost ou 125 mg de cloprostenol sont injectés 24 heures avant ou au moment du retrait. La fertilité ainsi obtenue est comparable à celle des animaux témoins non traités. (Hanzen 2005).

3-2-3-la PMSG :

Les principes qui déterminent le choix de la dose de la PMSG découlent de l'action de la PMSG, et des caractéristiques des femelles.

Les principales informations qui doivent être prises en compte sont les suivantes:

- La prolificité habituelle du troupeau: en saison sexuelle, la dose de PMSG nécessaire à l'obtention d'une même prolificité, devra être plus élevée pour un troupeau à prolificité faible que pour un troupeau à prolificité habituellement élevée; sans oublier que la prolificité souhaitable doit être adaptée aux possibilités des femelles et de l'élevage.
- L'état physiologique des femelles: allaitantes, traites, taries, la dose de PMSG devant baisser dans cet ordre.
- L'intervalle depuis la mise bas précédente: la dose doit diminuer avec l'allongement de cet intervalle.

- Les caractéristiques de reproduction de la race et du troupeau considérés: par exemple, une race à œstrus saisonnier "profond" nécessitera à contre-saison une dose de PMSG plus élevée qu'une race à œstrus "léger".
- La date d'intervention: plus on se rapproche du milieu de la saison sexuelle, moins la dose de PMSG nécessaire est élevée puisque la proportion de femelles en œstrus diminue.

Les doses les plus couramment utilisées pour les femelles adultes, varient entre 400 et 700 unités internationales (UI) à contre-saison, 300 et 600 UI en saison sexuelle. (Boukhliq, 2005)

3-2-4-Implant de mélatonine :

L'utilisation de la mélatonine pour avancer le début de la saison sexuelle a été largement étudiée. (Kennaway et al, 1982; Crocker et al, 1987) et a conduit à la fabrication d'une mélatonine synthétique. La libération continue de mélatonine par des implants induit un effet des 'jours courts' tout à fait comparable à celui obtenu par un apport particulier de mélatonine dans la nourriture ou par des photopériodes courtes (Arendt, 1988).

Dans l'espèce ovine, une distribution quotidienne de mélatonine est indispensable pour induire une avance de l'activité ovulatoire. Dans ce contexte, les implants offrent un avantage certain par rapport à une distribution orale (2 à 3 mg par jour en fin d'après-midi).

Ils sont constitués d'un mélange de *silastic* et de *mélatonine* ou d'un cœur de mélatonine compactée entourée d'un polymère (Mélovine en France : 18 mg de mélatonine, poids de l'implant : 20 mg). Le retrait n'est pas nécessaire puisque l'implant est biodégradable. (cf tableau 05)

Divers facteurs sont de nature à influencer la réponse au traitement. La durée du traitement nécessaire à l'obtention d'une activité ovulatoire chez plus de 70 % des brebis est comprise entre 36 et 90 j. La dose efficace d'administration est celle qui permet d'obtenir une concentration plasmatique au moins égale à 50 % de celle enregistrée pendant la nuit. Sous ce seuil, la réponse semble dépendre du niveau endogène de mélatonine propre à chaque brebis. La réponse dépend également du caractère saisonnier ou non des races traitées.

Les implants de mélatonine peuvent être employés avec d'autres traitements zootechniques ou hormonaux. Ainsi, il a été démontré que "l'effet bélier" est maximal quand les béliers sont introduits 30 à 40 jours après la pose de l'implant. De même, les implants seront le plus souvent insérés 30 à 40 jours avant l'insémination c'est-à-dire 18 à 28 jours avant la mise en place de l'éponge vaginale (tableau 2) Témoinnant d'une grande innocuité et un délai d'attente nul (lait, viande, abat), la mélatonine présente un intérêt zootechnique certain puisqu'elle permet d'augmenter de 2 à 23 le nombre d'agneaux obtenus pour 100 brebis traitées. Par ailleurs, elle offre la possibilité d'avancer de 4 à 8 semaines la période de commercialisation des agneaux et donc d'en tirer un meilleur profit. Elle permet également de regrouper les agnelages et donc d'en augmenter la qualité de la surveillance. (Hanzen, 2005)

Tableau 5 : Schéma d'utilisation des implants de mélatonine (espèces ovine et caprine)
(Hanzen, 2005)

Lutte naturelle	
J - 7	Isolement des béliers
	Implants sur les béliers
J 0	Implants sur les brebis
J 40	Introduction des béliers
J 60 à J70	Saillies
Synchronisation et IA	
J 0	Implant sur les brebis
J 18 à J 28	Pose des éponges vaginales
J 30 à J 40	Retrait des éponges
	Injection de PMSG
55 heures après le retrait	IA
J 35 à J45	Introduction des béliers
	Saillies des retours

4-Insémination artificielle :

Cette méthode de reproduction répond à plusieurs objectifs. D'abord l'amélioration génétique du cheptel : en effet grâce à cette technique il est possible de féconder un grand nombre de femelles avec la semence d'un seul mâle. Comme ses descendants hériteront d'une partie de son patrimoine génétique, ce mâle sera choisi en fonction de ses qualités ; D'autres raisons sont aussi mises en avant : l'économie permise par la réduction de la population de reproducteurs mâles, la limitation des risques sanitaires (maladies sexuellement transmissibles), ou encore le contrôle de la période de mise bas.

1-Technique d'insémination :

L'essor de l'insémination artificielle chez les ovins est consécutif d'une part aux propriétés particulières du sperme chez cette espèce (résistance aux procédés de congélation) et d'autre part à la relative difficulté du cathétérisme du col utérin. (Fieni, et al 1992). Il existe trois techniques différentes sur le terrain, la technique par dépôt vaginal, la technique par dépôt cervical /transcervical et la technique endoscopique. (cf tableau 06)

Tableau6 : quantité minimales (en millions) de spermatozoïdes mobiles nécessaires selon le site d'insémination (D'après ; Youngquist ,1997)

	Type de semence		
	Fraîche	Réfrigérée	Congelée
Insémination vaginale	300	inefficace	inefficace
Insémination cervicale	100	150	180
Insémination transcervicale	60	60	60
Insémination endoscopique	20	20	20

a-Insémination par voie vaginale :

la technique vaginale ne peut être utilisée qu'avec de la semence fraîche et en quantité élevée (300 millions de spz) par rapport aux autres techniques (Youngquist, 1997)

b-Insémination par voie cervicale :

La technique cervicale ou transcervicale est effectuée par n'importe quel type de semence en tenant compte du degré d'altération des spermatozoïdes selon le type de conservation (il faut 180 millions de spz congelés contre 100 millions en frais). Dans cette technique d'insémination trans-cervicale, l'animal est soulevé par les pattes arrière par un aide. L'inséminateur introduit un spéculum dans le vagin afin de bien visualiser le col de l'utérus par une petite lampe, ensuite le pistolet d'inséminateur est doucement amené au travers le col en essayant de ne pas le franchir trop brutalement. Pour s'assurer de ne pas endommager l'utérus, il ne faut pas introduire le pistolet de plus de 38 mm dans l'utérus. (Youngquist, 1997) (Cf figure 11)

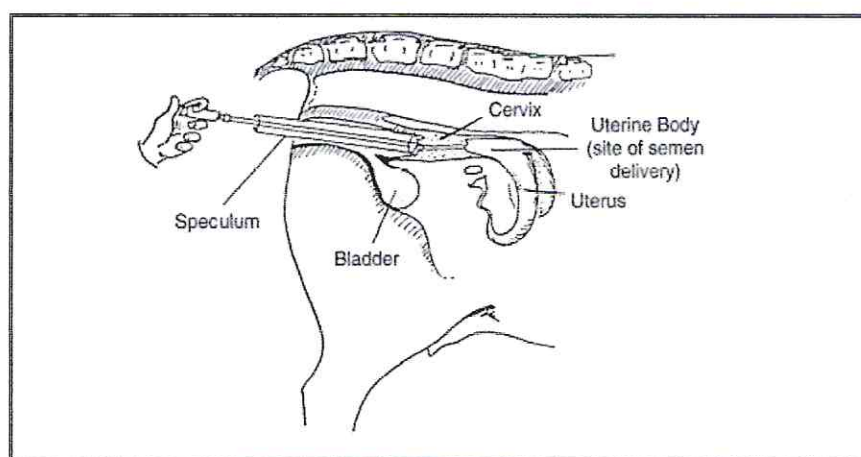


Figure 11: insémination cervicale ou transcervicale (d'après ; Youngquist 1997)

Cependant, des problèmes techniques liés aux caractéristiques du sperme, font que ces inséminations utilisent uniquement de la semence fraîche mise en place dans les 6 à 12 heures suivant le prélèvement. Si l'utilisation de la semence fraîche, par voie cervicale, donne sur le plan de la réussite une fertilité de l'ordre de 65 à 70%, il n'en reste pas moins de cette méthode présente certaines limites d'utilisation : organisation du travail au laboratoire et à l'air d'expédition. (Fieni, et al 1992)

c-Technique de l'insémination artificielle sous contrôle endoscopique :

Afin d'améliorer chez l'espèce ovine le taux de réussite en insémination artificielle, de permettre une meilleure diffusion du patrimoine génétique et de pouvoir utiliser de la semence congelée, il a été proposé de déposer la semence non pas à l'entrée du col ou dans le canal cervical mais directement à l'intérieur de l'utérus sous contrôle endoscopique : c'est l'insémination intra utérine. (Fieni, et al 1992)

Les femelles sont soumises à une diète de 24h afin de réduire l'encombrement du tractus digestif, et de faciliter la localisation et la manipulation instrumentale de l'appareil génital. Les inséminations sont réalisées en plaçant l'animal en décubitus dorsale cranialement incliné à 45°, le champ opératoire est tendu puis désinfecté, les zones de ponction sont insensibilisées par une anesthésie locale. L'introduction des tocards se fait de part et d'autre de la ligne blanche. Après

mise en place des instruments et localisation du tractus génitale la semence est déposé dans chacune Sdes cornes utérines .Les trocards sont ensuite retirés, un antibiotique est appliqué sur chaque point de ponction. (Maxwell et al ,1984) (Cf figure12)

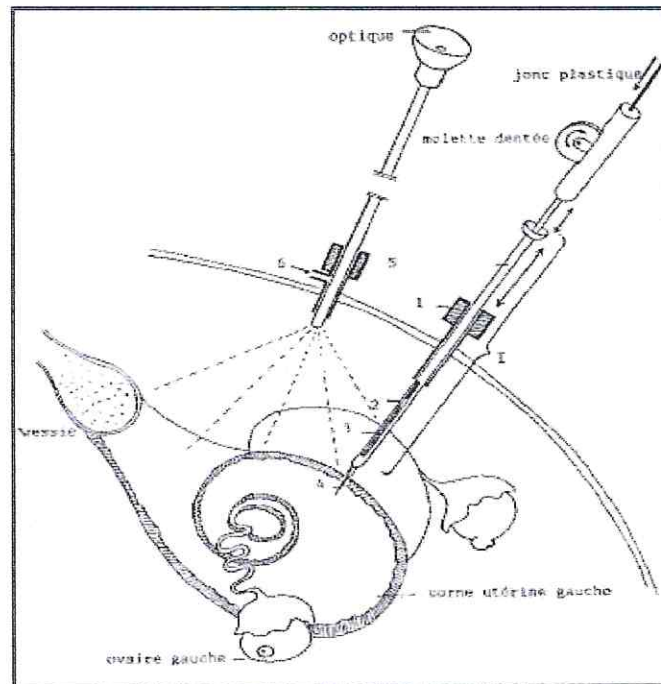


Figure12: Descriptif de la technique d'insémination intra-utérine sous contrôle laparoscopique I=palpateur; 1=canule de 5mm; 2=lumière du palpateur, 3=paillette fine (0.25ml) ; 4=aiguille long 5mm diamètre 0.7mm ; 5=canule de diam 7mm ; 6=gaz du pneumopéritoine) (d'après ;Loebeuf et al ,1991)

CHAPITRE IV

BIOTECHNOLOGIE DE L'EMBRYON

I/introduction :

On appelle biotechnologies de l'embryon l'ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l'embryon (cf figure13) (Colleau et al, 1998). Leur essor est récent et encore à bien des égards modeste. Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80, d'abord dans l'espèce bovine où la reproduction des animaux était, depuis déjà 30 ans, largement organisée autour de l'insémination artificielle. Aujourd'hui elles sont également de plus en plus largement appliquées dans d'autres espèces telles, la chèvre la jument, et la brebis. (Hanzen, 2005)

Il est classique de distinguer trois générations de biotechnologies de l'embryon. La première génération a permis de produire des embryons in utero après stimulation hormonale des femelles donneuses (superovulation).

Plus récemment, une deuxième génération de technologies est apparue qui s'appuie sur la production d'embryons en culture, après maturation et fécondation in vitro d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant ou après abattage (FIVETE : Fécondation in vitro et transfert d'embryons, OPU : Ovum Pick Up).

Les progrès de nos connaissances sur la physiologie de l'embryon de mammifère permettent maintenant l'émergence d'une troisième génération de techniques. Celles-ci tirent parti de l'extraordinaire plasticité des premiers de l'embryogenèse et visent à modifier encore plus en avant les caractéristiques de l'embryon: stades le transfert nucléaire qui aboutit à la production de clones, et la transgénèse qui consiste à introduire un gène étranger dans les cellules de l'embryon en sont les illustrations. A ces techniques viennent s'ajouter le sexage de l'embryon, sa congélation ou encore l'ICSI (Intra Cytoplasmic Spermatozoa Injection). (Hanzen, 2005)

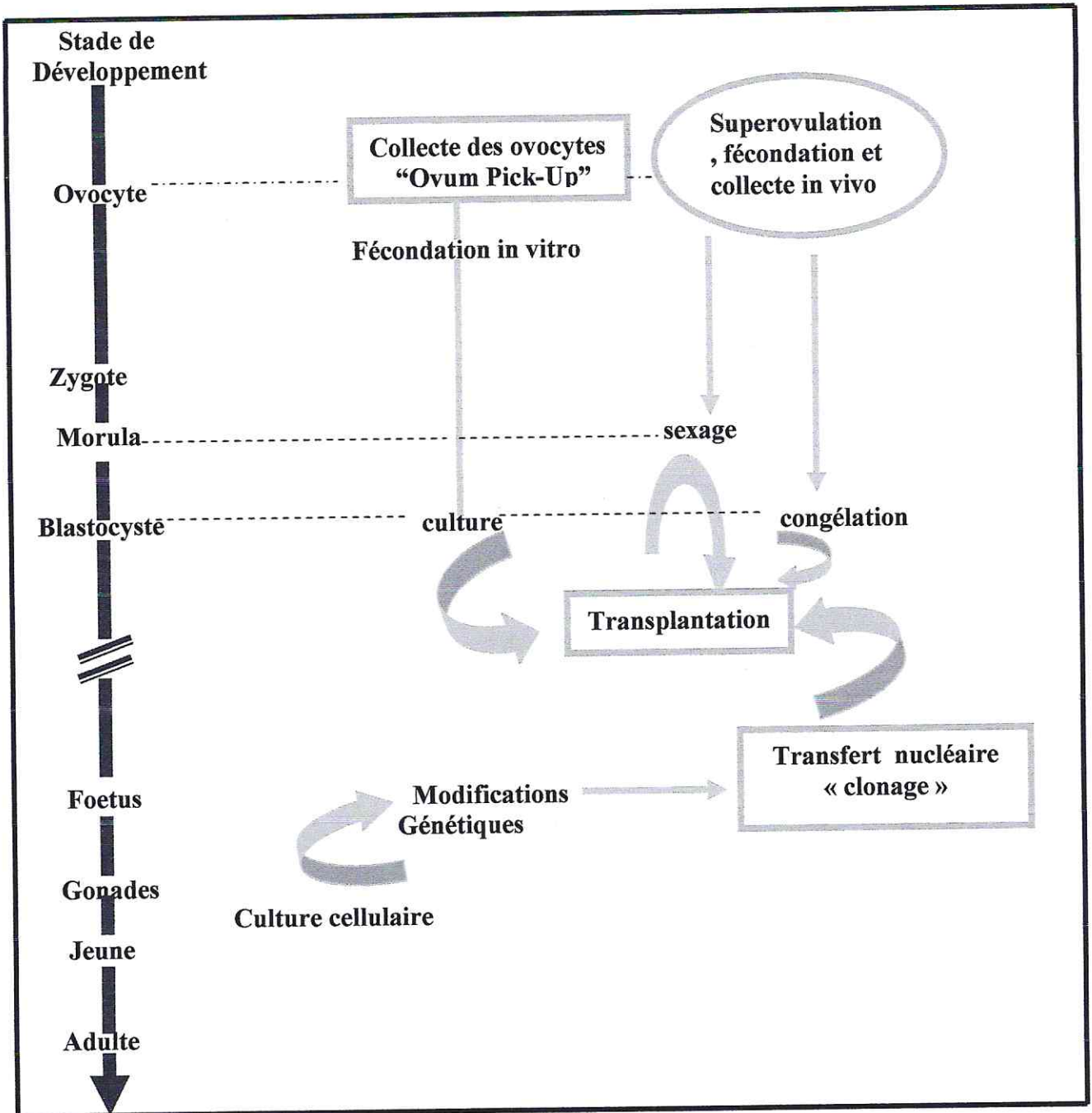


Figure 13 : Les principales biotechnologies de l'embryon. (D'après Colleau et al, 1998)

II/ La Superovulation :

La superovulation au sens large, est un traitement utilisé en vue d'augmenter le nombre d'embryons transférables, chez une donneuse sélectionnée. Son principe consiste à multiplier le nombre de descendants d'une brebis de haute valeur génétique en lui faisant produire un nombre élevé supérieur à la production naturelle d'embryons. Ces embryons seront transférés chez des brebis receveuses de moindre valeur génétique et économique. Il faut noter que contrairement à la synchronisation des chaleurs, la superovulation ne se pratique généralement que sur les donneuses cependant, certains auteurs préconisent d'injecter des hormones gonadotropes à des doses plus faibles aux receveuses dans le but d'obtenir la maturation de plusieurs corps jaunes qui favoriseront ainsi leur gestation. (Vallet et al, 1991)

La superovulation des donneuses est induite au terme d'un traitement classique de synchronisation des chaleurs (éponges vaginales). La fonction ovarienne peut être stimulée par une variété de préparation hormonale à activité gonadotrope (Chupin; 1988).

Il existe un relatif consensus sur le principe d'une stimulation de qualité (Cognie et al, 1986) :

- La durée de stimulation doit avoisiner celle de la croissance folliculaire.
- L'activité FSH doit nettement prédominer sur celle de LH contaminante en début de traitement ; ceci condamne notamment l'usage de l'eCG, molécule dont l'activité intrinsèque LH est environ 4 fois supérieure à l'activité FSH, un enrichissement en LH semble en revanche nécessaire en fin de traitement (FSH/LH<0.4) conditionnant l'induction des ovulations.

1-Critères de choix des femelles donneuses :

Les animaux entrant dans un protocole de superovulation doivent être choisis le plus tôt possible avant le début des opérations.

Si les qualités génétiques sont déterminantes dans le choix des donneuses, l'état physiologique et sanitaire l'est tout autant. La donneuse ne doit pas être trop âgée, doit avoir eu une carrière de reproduction sans troubles notable et se présenter en parfait état de santé à l'examen clinique et gynécologique (3 mois avant les opérations).

De plus, il est recommandé de respecter un intervalle d'au moins 2 mois entre la dernière mise bas et le début du traitement. (Vallet et al, 1991)

2- Préparations physiologique des donneuses :

La préparation alimentaire ou flushing provoque une prise de poids rapide et stimule l'activité sexuelle des animaux. Elle est systématique chez les donneuses. Le flushing débute trois semaines avant les chaleurs des donneuses. (Casamitjana, 1991)

Les traitements antiparasitaires et les vaccinations doivent être effectués 30 jours au moins avant le traitement de superovulation. (Hanzen, 2005)

3- Les Traitements de superovulation :

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

3-1- Molécules utilisable :

A/PMSG (*prégnant mare serum gonadotrophin*) :

C'est une gonadotrophine d'origine placentaire, sécrétée par les cupules endométriales de la jument gravide à partir des 35 jours de gestation, et qui est présente dans le sang entre le 40 et le 150 j de gestation (Del Campo et al, 1985).

C'est une grosse molécule (64000 daltons) constituée pour environ 10% de son poids d'acide sialique, ce qui lui confère une bonne stabilité et limite donc son catabolisme in vivo. Sa demi-vie dans l'organisme est de l'ordre de 4-6 jours (vache) (Del Campo et al, 1985) et d'une vingtaine d'heures chez la brebis (Lyngset, 1964).

Cette propriété le rend pratique d'utilisation car une seule injection permet de réaliser une stimulation sur plusieurs jours (Cahill et al, 1981). L'activité de cette molécule est à la fois, LH et FSH, malheureusement la variabilité du rapport d'activité FSH/LH en modifie énormément l'efficacité (Mori, Kano ;1984).

B/ FSH (Follicule stimulating hormone):

La FSH est l'hormone de croissance folliculaire d'origine hypophysaire, c'est une glycoprotéine de taille moyenne (30000 daltons) pauvre en acide sialique (5%) ; sa demi vie est donc courte par rapport à celle de la PMSG : 4à6 heures chez la vache (Del Campo et al, 1985), et seulement 20à70 mn chez la brebis. (Akbar et al ; 1974).

Les FSH utilisés dans les protocoles de super ovulation sont extraites de broyas d'hypophyses de porc. Le porc étant l'espèce la plus intéressante pour la préparation d'extraits pituitaire du fait de la grande disponibilité en hypophyse et surtout de leurs teneurs élevées en hormones. Les différentes FSH varient en fonction de leurs procédés d'extraction et surtout de leurs degrés de putréfaction, c'est à dire leurs rapports FSH /LH (Leufeuve, 1992)

La FSH décongelée se conserve sans dommage au réfrigérateur (4°C) pendant le traitement. Une fois décongelée, la solution ne peut être recongelée. Compte tenu de sa dégradation rapide dans l'intestin de l'homme, la FSH ne présente aucun risque pour la santé humaine. La FDA américaine ne préconise aucun délai de retrait de lait ou d'abattage des animaux ainsi traités (Hanzen, 2005).

B-1-Les préparations commerciales :

La FSH fut d'abord caractérisé par la société ARMOUR la même qui a mis au point l'unité amour à partir d'activité in vivo. Les préparations ne sont pas standardisées et le rapport FSH/LH varie selon les lots de 0.4 à 1.1 (Driancourt et al ; 1988).

B-1-1-Les FSHp : Elle se caractérise par leur plus grand degré de purification et se présente sous de nombreux types de préparations commerciales :

❖ FSH "INRA":

Cette FSH a été mise au point par l'INRA de Tours; elle se caractérise par une méthode de purification qui permet l'obtention d'un produit dont le rapport FSH/LH peut être modulé et fixé (entre 3 et 10). (Driancourt et al ; 1988). Cette préparation est commercialisée sous la forme de 3 flacons (le premier contenant 32mg Armour de FSH en poudre, le second contenant la LH, pour faire un rapport FSH/LH =1, et le troisième contenant le solvant).

❖ Folltropin(ND) :

Elle est commercialisée au Canada et contient moins de 5 % de LH (Armstrong et al, 1986). Elle se présente sous la forme d'un flacon de 20mg de poudre lyophilisée (correspondant à 35mg du standard NIH, National Institute of Health) accompagnée de 20mg de solvant.

❖ FSH BECKERS ou STIMUFOL (ND) :

Elle présente la particularité d'être particulièrement bien purifiée contenant moins de 0.5% de LH, et séparé de la LH (également très purifiée) .Elle est fournie prête à l'emploi, c'est à dire dans des flacons contenant les différents rapports FSH/LH nécessaires aux besoins de l'expérience (Beckers et al, 1977).

B-2-Le rapport FSH/LH :

La LH intervient à deux niveaux principaux : le premier consiste en la sélection finale des follicules vers l'ovulation ou l'atresie alors que le deuxième est l'ovulation proprement dite (pic de LH ovulatoire) (Gonzalez ; 1984).

Les préparations commerciales de FSH contiennent toutes de la LH mais dans les proportions très variable (Leufeuvre ; 1992) : cette quantité peut être mesurée par 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). Cependant, durant un traitement de superovulation, diminuer le rapport FSH/LH lors des dernières injections n'améliore les résultats que si l'on se trouve à contre saison (Cognie et al ;1986).Par ailleurs, si le rapport FSH/LH trop faible par excès de LH, l'ovulation se trouve prématurée et les résultats sont moins bons(Murphuy et al ;1984) ; inversement, si le rapport FSH/LH est trop élevé par manque de FSH, l'oestrus est retardé et les résultats sont aussi moins bons. Il convient donc, pour avoir les meilleurs résultats possibles, de bien contrôler l'évolution de ce rapport jusqu'à l'ovulation (Gonzalez, 1984).

B-3-Distribution au cours du traitement :

Une évolution décroissante du rapport FSH/LH permettrait d'obtenir de meilleurs résultats à contre saison, COGNIE et al (1986), proposent un protocole avec un rapport diminuant de 56/10 à 14/94 sur 3j. Le taux de brebis ovulant passe de 1 sur 10 avec un traitement normal, à 10 sur 11 avec ce protocole.

D'autres comme BARIL et BREBION (1992), préfèrent modifier le rapport uniquement au moment de la dernière injection, passant d'un rapport de 8 à 0.4 ou 0.13.

C/ HAP (Horse Anterior Pituitary):

C'est un extrait pituitaire équin qui a donné des résultats intéressants en superovulation équine (Armstrong ,1983) cependant ceux-ci ne sont pas meilleurs qu'avec la PMSG (Corteel, 1968) sa difficulté d'obtention est responsable de sa moindre compétitivité par rapport à la PMSG ou la FSH.

D/ HMG (Human Menopausal Gonadotrophin):

Elle est extraite de l'urine de femme ménopausées et est utilisée en médecine humaine aux Etats Unis sous le nom de PERGONAL (ND) (Whitley , et al 2004)

E/ HCG (Human Chorionic Gonadotrophin):

C'est une glycoprotéine sécrétée par le placenta et éliminée dans les urines de la femme enceinte dès les premiers jours de gestation .Son action est essentiellement de type LH (Nuti et al ,1987), avec une demi-vie plus longue que la LH (respectivement 8h et 12 à50 minutes) (Del Campo et al, 1985)

F/Traitement cocktail associant FSH et PMSG :

Le traitement avec l'eCG est économiquement peu coûteux et, en raison de sa longue demi-vie, peut être administré dans une injection simple. Cependant, donné à des doses importantes, l'eCG

a des effets néfaste sur: l'ovulation, la fertilisation, la viabilité de l'embryon (Shelton et Moore, 1967 ; Evans et Robinson, 1980 ; Bindon et Piper, 1982). Pour éviter son effet néfaste, l'eCG a été associé à divers composés de FSH.

Les travaux de Simonetti et al ; (2007) montrent que la combinaison de l'eCG et FSH donne de bons résultats et avance le début de l'oestrus chez les brebis de race Corriedale, (cf tableau 7)

Tableau 7: réponse ovulatoire et production d'embryons chez les brebis suite au traitement avec oFSH ou oFSH+eCG (Simonetti et al ; 2007)

	Traitement		
	oFSH(176UI) + eCG en injection simple	oFSH (132 UI) + eCG en injection simple	oFSH (176 UI) en 8 injections IM
Nb de brebis en oestrus (%)	15/16 (93.8)	14/14 (100)	17/17 (100)
Début de l'oestrus (h)	22.0±1.4	± 20.1 1.0	30.4± 1.7
Taux d'ovulation	13.7±1.7	10.3±1.3	10.7±0.9
Gros follicule	1.3 ± 0.5	1.0 ±0.3	0.3 ± 0.2
Taux de viabilité (%)	50/118 (42.4)	52/76 (68.4)	94/132 (71.2)
Nb d'embryons viables	3.3± 1.0	4.0 ±0.8	5.5 ±0.8

3-2-La dose et le régime d'injection :

a/PMSG :

La première gonadotrophine utilisée pour obtenir une superovulation a été la PMSG maintenant nommée eCG pour (équine chorionique gonadotrophine) administré par voie intramusculaire en une seule injection de 1000 à 2000 UI un ou deux jours avant le retrait de l'éponge (Cognie;1984) (cf Tableau 8).

Tableau 8: effet du traitement de stimulation ovarienne sur la réponse et le nombre d'embryons transférables (Cognie ; 1984)

Espèces	Dose	Corps jaunes	Embryons transférables
Ovins	PMSG (1200 UI)	9.3	1.9
	PMSG (3000 UI)	10.7	1.1

Les inconvénients de la PMSG :

- Forte activité LH peut induire une activation prématurée de la méiose ovocytaire.
- L'action prolongée de la PMSG due à sa longue demi-vie (plusieurs jours) provoque des modifications des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales.

b/Extraits purifiés FSH:

La demi vie de FSH étant courte (de l'ordre d'une heure chez la brebis), elle nécessite une administration de façon séquentielle (6 à 8 injections à 12 h d'intervalle les 3 ou 4 derniers jours du traitement progestagènes, la dernière injection ayant lieu 12 h après le retrait de progestagènes). (Akbar et al, 1974).

Selon Baril et al (1993) la dose totale de la pFSH varie de 12 à 24 mg. Elle est répartie en doses décroissantes et est enrichie en pLH lors des deux dernières injections.

Selon les travaux de (Cognie ; 1986 et Baril ; 1988) l'utilisation d'un rapport FSH/LH décroissant au cours du traitement permettait d'obtenir une meilleure stimulation qu'avec des rapports constants. (cf Tableau 9)

Tableau 9: Effet du type de traitement de stimulation ovarienne sur la réponse et le nombre d'embryons transférables par femelles traitées (Baril ; 1986)

Espèces	Traitements	Corps jaune	Embryons transférables
Ovins	pFSH (1)	13.2	6.5
	pFSH (2)	18.5	7.5

FSH/LH constant (1).

FSH/LH décroissant (2).

Selon Smith ; 1984, la dose optimale pour un traitement de superovulation chez la brebis CROSSBRED TARGHEE est de 20mg. Des résultats obtenus par certains travaux sont résumés dans le tableau 10 suivant :

Tableau 10: effet du rythme d'injection sur la réponse ovarienne

Dose de FSH (mg)	Durée de mise de l'éponge	Rythme d'injection de FSH	Retrait de l'éponge	Nombre de corps jaunes	Auteurs
20	14 j	6 injections pendant 3j: (5mg×2) (3mg×2) (2mg×2/ 0,3-0,4 FSH/LH)	J14	11	BREBION et al (1990)
20	16 j	7 injections pendant 3,5j :(5mg) (2,5mg×2) (2,5mg×2)(2,5mg×2)	J16	12,1±2,3	REXROAD et POWELL (1991)
20	16 j	5 injections pendant 2, 5j : (5mg)(5mg)(5mg)(2,5mg×2)	24 h avant la dernière injections	11,5±1,6	REXROAD et POWELL (1991)

3-3-Effet des prétraitements sur les résultats du traitement FSH :

Chez la brebis superovulée avec pFSH, le taux d'ovulation est positivement corrèle au nombre de follicules présents au début de la stimulation. Brebion et Cognie (1989) rapportent qu'un prétraitement anti gonadotrope par des agonistes ou un antagoniste du GNRH (Cf Tableau 11) permis :

- D'enrichir la classe de follicules de 1-2 mm.
- De doubler le nombre moyen d'ovulation.
- D'éliminer les faibles réponses.

Tableau 11: effets d'un prétraitement de 11j par un antagoniste du GNRH sur la réponse ovarienne chez la brebis Lacaune. (Brebion et al ; 1991)

	GnRH-Antag	Témoins
	(n=14)	(n=13)
Nb follicules de diamètre 1-2mm avant FSH	24.7	12.5
Nb d'ovulation après FSH (m±sem)	19.2 ± 3.4	9.9 ± 1.6
%de collecte des embryons	67.5	66.0
Nb d'embryons viables (%)	10.6 (81)	6.1 (62)

4/La saillie :

Bien qu'ayant la plus couramment utilisé avec succès au cours de la saison sexuelle, chez les ovins et les caprins, cette technique ne permet pas une diffusion et une utilisation rationnelle des mâles de haut niveau génétique .Par ailleurs, en contre saison, la faiblesse ou l'absence de libido des mâles ne permet pas d'être assurer de leur aptitudes à la saillie et du pouvoir fécondant de la semence plus faible à cette période (Baril et Vallet.1990) (Cf tableau 12).

Tableau 12 : effet de la période de traitement sur les taux de fécondation (Baril et Vallet.1990)

	Contre saison (mars-out)	Saison de reproduction (septembre-février)	Contre saison et saison
(œufs divisés/œufs collectés) %	75.0	88.5	80.9
Embryons transférables/œufs collectés)%	57.5	75.2	65.2
(Nombre d'œufs collectés-nombre d)	(452-55)	(347-41)	(799-96)

5- Insémination artificielle :

L'étape suivant la synchronisation/superovulation dans un protocole de production embryonnaire est l'insémination au moment de l'oestrus .Le plus souvent, on utilise l'insémination artificielle car la production d'embryons in vivo concerne des mâles de très haute valeur génétique, qui sont géographiquement éloignés, voire déjà réformés.(Baldassarre et al ,2004)

Chez les ovins, seule la semence fraîche peut être utilisée. En effet, les techniques de conservation des spermatozoïdes de bélier ne permettent pas en IA classique d'obtenir des taux de fécondation satisfaisants (<40%) .Les recours à la semence fraîche est donc nécessaire .Dans ce cas, 400×10^6 Spz seront mis en place à l'entrée du cervix, l'anatomie du col de la brebis ne permettant pas le passage des instruments classiques d'insémination.

Cependant, le dépôt de la semence 48-50 h après le retrait de l'éponge directement dans les cornes utérines (80×10^6 spz) sous contrôle laparoscopique permet d'obtenir des taux de fécondation élevés chez les donneuses ayant moins de 30 ovulations. Les ovocytes des femelles fortement superovulées conservent donc leur aptitude à être fécondés et à se développer normalement. Pour les femelles ayant plus de 30 ovulations le problème de fécondation persiste et il est associé à une faible proportion d'embryons transférable.

Tableau 13 : Taux d'œufs collectés fécondés et qualité des embryons après IA intra-utérine avec du sperme frais chez la brebis (Cognie et Baril ; 2002)

Nombre d'ovulation	Nombre de brebis	Œufs collectés (%)	Œufs fécondés/collectés (%)	Embryons transférables/collectés (%)
5-9	26	60	84	69
10-14	39	62	93	76
15-19	41	62	89	79
20-24	17	67	85	73
25-29	13	67	82	77
≥ 30	13	53	72	47

6-Récolte des embryons :

Le but de cette opération est de récolter l'ensemble des embryons produits par la brebis de la façon la plus efficace et la moins traumatisante possible. Il est essentiel que celle-ci puisse rapidement retourner à la reproduction. Les embryons sont généralement recueillis au stade « morula compacte » à « blastocyste » (80 – 300 cellules) correspondant à J6-J7 chez la brebis, J1 étant le jour de fécondation.

La difficulté de franchissement du cervix impose raisonnablement une approche transpéritoniale (Kraemer, 1989).

De nombreuses variantes techniques sont possibles pour parvenir à perfuser chaque corne utérines avec 40ml de milieu PBS dans le sens anté grade ou rétrograde. Le véritable choix qui s'offre aux praticiens porte entre la laparotomie classique et une technique moins invasive sous contrôle laparoscopique (Brebion et al ; 1991)

6-1-Techniques d'anesthésie et de préparation aux opérations de collecte ou de transfert :

Les opérations de collecte ou de transfert sont conduites sous anesthésie générale, les animaux doivent être préalablement soumis à une diète alimentaire et hydrique au cours des 24h qui précèdent les opérations.

Divers produits peuvent être utilisés, leurs choix dépendra essentiellement de la disponibilité du praticien en matériel pour conduire ou non une anesthésie volatile. Sans elle, la Xylazine 2

% est le produit le plus couramment utilisé. Dans le cas d'une induction narcotique suivie d'une anesthésie halogène, les barbituriques seront préférés, seuls ou en association, à la suite d'une prémédication au sulfate d'atropine. Le maintien de l'anesthésie gazeuse pendant la durée de l'intervention est assuré par une intubation trachéale.

6-2-Chronologie de la récolte :

On sait que l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine se fait entre le 10ème et le 11ème jour de gestation. De plus la manipulation d'un embryon ne se trouvant plus protégé dans sa zone pellucide est bien plus compliquée, il est donc idéal de récolter les embryons dans les 8 premiers jours après l'ovulation (Youngquist ; 1997). Durant cette première semaine de développement, l'embryon se trouve dans l'oviducte de J1 à J4 et dans l'utérus de J4 à J8. Il faut donc adapter la méthode de récolte selon la période (Hfezese ; 1962) (Youngquist, 1997). Actuellement la plupart des équipes de transfert d'embryon préfèrent travailler entre J6 et J8, période correspondant au stade de développement embryonnaire morula ou blastocyste et à localisation utérine. (Chemineau et al, 1991)

6-3- Milieu de récolte :

Une solution tamponnée est nécessaire, on utilise le plus souvent du PBS (Phosphate Buffered Saline) qui est une solution de chlorure de sodium tamponnée par des phosphates (Proteau ; 1989). A cette solution il est possible d'ajouter des antibiotiques tels que pénicilline, streptomycine, ou amphotéricine (Pereira 1998 et Proteau 1989). De plus on peut ajouter différentes protéines dans le milieu, telle que le sérum de veau foetal (Proteau ; 1989).

6-4- Choix de la technique de récolte :

Il existe 2 techniques différentes de récolte des embryons : chirurgicale, laparoscopique. Pour le choix entre la technique chirurgicale ou laparoscopique, il faut considérer le devenir de la brebis donneuse car il est rarement possible de collecter plus de 4 fois par technique chirurgicale. Avec la technique laparoscopique, jusqu'à 7 collectes sur une même donneuse ont été rapportées. (Vallet et al; 1991). De plus, le choix de la technique dépendra du matériel dont dispose l'équipe de transfert embryonnaire et de ses habitudes. (Youngquist ; 1997)

a/ Technique chirurgicale :

➤ Préparation de l'animal :

Les brebis sont placées à la diète hydrique un minimum de 18 à 24 heures précédant la collecte. Pour la réalisation de cet acte chirurgical, la tranquillisation de l'animal est nécessaire. Il est aussi possible d'anesthésier la brebis en utilisant un protocole xylazine / kétamine avec relais gazeux. L'animal une fois tranquilisé est tendu au niveau de la paroi abdominale ventrale, crânialement à la mamelle. On le place alors en décubitus dorsal avant de la préparer de façon aseptique. (Youngquist ; 1997)

➤ Collecte des embryons :

La technique chirurgicale permet de collecter selon son adaptation aussi bien les oviductes que les cornes utérines. Il existe des techniques de flush rétrograde permettant de collecter les embryons encore en migration dans l'oviducte en injectant le milieu de collecte au niveau de la jonction utéro-tubaire, la récolte se faisant au niveau de l'infundibulum. La collecte se faisant le plus souvent entre J6 et J8, (Vallet et al ; 1991) c'est la technique permettant de flusher les cornes utérines qui sera présentée ici :

◆ l'incision de laparotomie se fait au niveau de la ligne blanche juste en avant de la mamelle. Cette incision doit être d'une longueur suffisante pour extérioriser les 2 cornes utérines.

◆Après vérification des ovaires (présence de multiples corps jaunes), une corne utérine est ponctionnée juste après la bifurcation et on y introduit une sonde de Foley pédiatrique. Le ballonnet de cette sonde est gonflé à l'aide d'une faible quantité de milieu de collecte à 37°C afin d'obstruer l'ensemble de la base de cette corne.

◆Puis à l'aide d'un cathéter (Argyl Medicut 1,69mm de diamètre) au niveau de la jonction uterotubaire, on injecte 40 à 50 ml de milieu de collecte (PBS) à 37°C que l'on récupère par la sonde de Foley. (Cf Figure14)

◆On renouvelle ensuite l'opération sur l'autre corne utérine. Il arrive par cette technique que la muqueuse utérine ressorte par l'incision faite pour placer la sonde de Foley. Dans ce cas, il est nécessaire de refermer la brèche avec un point simple.

◆Après suture en deux plans par des points simples de la ligne blanche et de la peau, une antibioprofylaxie est mise en place. (Vallet, et al ; 1991)

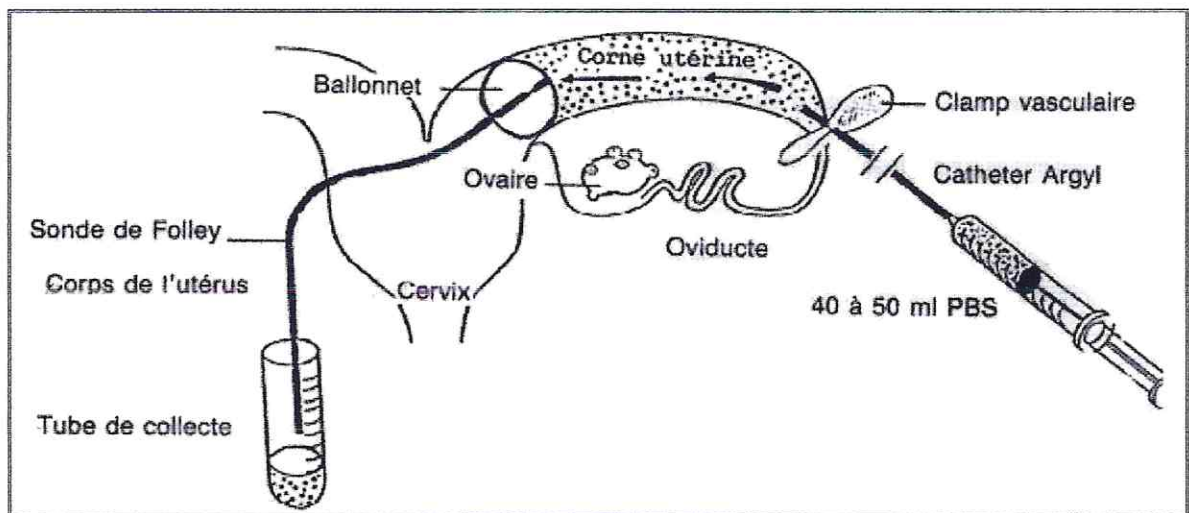


Figure 14: Méthode de collecte chirurgicale des embryons. (D'après Vallet et al; 1991)

➤ Avantages et inconvénients :

Le principal avantage de cette technique est l'efficacité de la récolte : le taux de récolte (défini comme le nombre de structures collectées rapporté au nombre de corps jaunes) est proche de 85%. Elle est aussi très accessible étant donné le peu de matériel qu'elle nécessite. (Youngquist ; 1997). Cependant de telles manipulations de l'utérus l'endommagent et provoquent l'apparition d'adhérences compromettant l'avenir reproductif de la brebis donneuse. (Vallet et al ; 1991)

b/ Technique laparoscopique :

➤ Préparation de l'animal :

Comme dans la technique chirurgicale, la mise à la diète hydrique de la brebis donneuse est nécessaire. Il est possible de réaliser une collecte laparoscopique sous anesthésie générale, mais le plus souvent on utilisera une tranquillisation à base de xylazine par voie intraveineuse associée à une anesthésie locale traçante. La préparation du site d'introduction des trocarts d'endoscopie est la même que pour la technique chirurgicale. L'animal est ensuite placé en décubitus dorsal en l'inclinant la tête en bas avec un angle de 30-40° afin de dégager l'accès à l'appareil génital. (Vallet, et al ; 1991)

➤ Collecte des embryons (figure15) :

1- Une canule de 7 mm de diamètre est introduite 8 à 10 cm craniâlement à la mamelle et 2 à 3 cm à la gauche de la ligne blanche afin de recevoir l'optique et de créer un pneumo-péritoine en insufflant du CO₂.

2- Une première canule de 5 mm est introduite à la même hauteur à droite de la ligne blanche, afin d'y introduire une pince atraumatique permettant de manipuler l'utérus et de vérifier la bonne réponse des ovaires au traitement de synchronisation/superovulation.

3- Enfin, une seconde canule de 5 mm est mise en place sur la ligne blanche 2 cm plus craniâlement que les 2 autres, on y passera d'abord une aiguille de 25 cm de long afin de ponctionner la paroi utérine juste en avant de la bifurcation, puis une sonde 3 voies (du même type que celle utilisée en collecte d'embryons chez la vache). Le ballonnet est alors gonflé, le cathéter flexible de la seconde voie est poussé jusqu'au tiers supérieur de la corne.

4- On injecte 40 à 50 ml de milieu de collecte dans la corne avant de les récupérer via la 3^{ème} voie de la sonde. Afin d'éviter la remontée du milieu de collecte vers l'oviducte, on placera par précaution la pince atraumatique juste au niveau de la jonction utéro-tubaire avant de flusher. (Youngquist ; 1997)

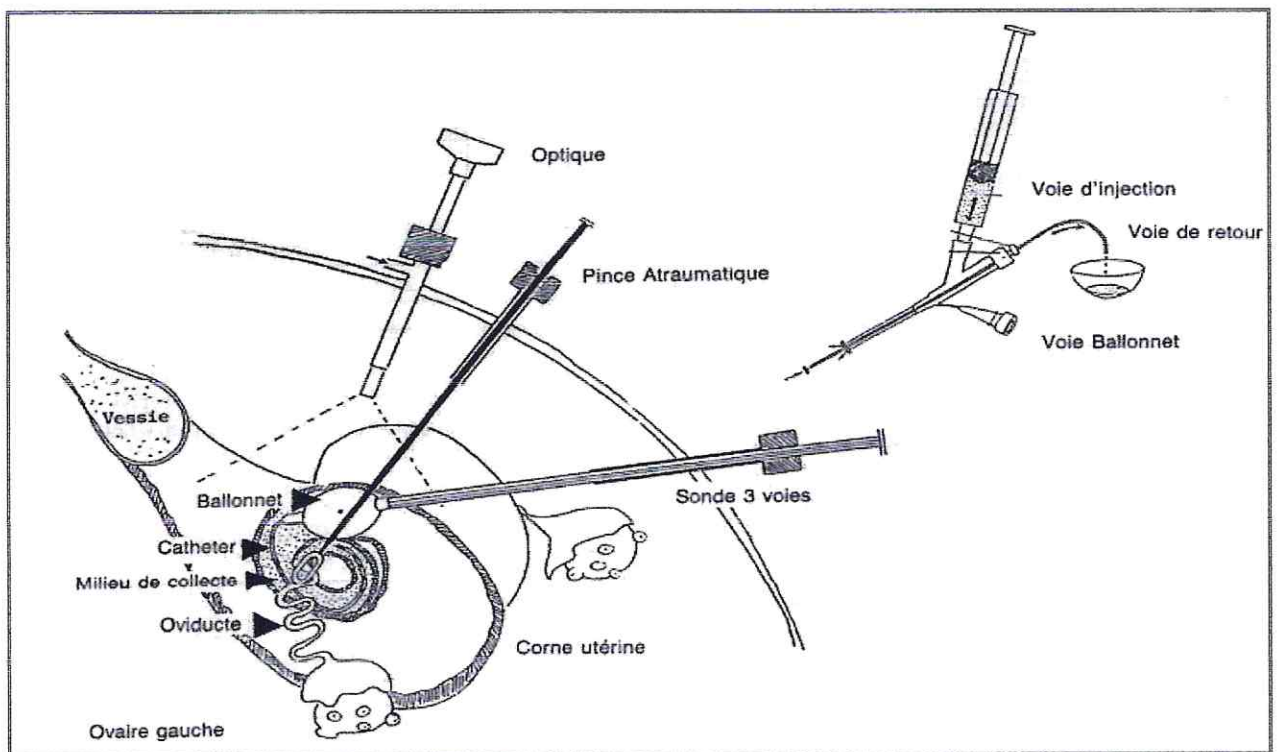


Figure 15: Collecte par technique laparoscopique avec sonde 3 voies. (D'après Vallet et al; 1991)

Par cette technique, les taux de collecte sont de 60 à 65% soit 10 à 15% inférieure à ceux obtenus par collecte chirurgicale, cependant la répétabilité de la collecte peut être considérablement augmentée sans apparition d'adhérence, et diminution du taux de collecte. (Baril et al 1988)

➤ **Avantages et inconvénients :**

L'avantage principal de cette technique est sa répétabilité. De plus, les brebis récupèrent rapidement après cette intervention. Les taux de récolte sont en moyenne inférieurs de 10 à 15% par rapport à la technique chirurgicale, soit de l'ordre de 60 à 65%. Le matériel nécessaire est bien plus important, et la technicité de l'opérateur doit être bonne. De plus, comme dans la

technique chirurgicale, il est possible que la muqueuse utérine ressorte au travers du site de ponction de la sonde 3 voies, il n'y alors pas de prévention possible et la suite de la reproduction de la brebis peut être compromise. (Youngquist ; 1997)

6-5- Examen des embryons:

Il s'agit d'un dernier élément conditionnant la qualité d'une récolte ; en effet pour que celui-ci soit satisfaisant, les embryons doivent être de bonne qualité pour pouvoir être transférés. Pour apprécier ce paramètre, deux éléments sont importants : le pourcentage d'embryons transférables pour chaque traitement, et le nombre moyen d'embryons transférables par chaque brebis récoltée (Robertson, Nelson ; 1998).

Une fois les embryons récoltés dans leur milieu, il est important de les observer à la loupe binoculaire afin de vérifier l'adéquation entre leur stade de développement et la date de récolte. On évalue leur qualité en se basant sur la classification décrite par l'INRA-UNCEIA, 1990 (cf tableau 14)

Classification	Qualité	Description
1	Excellent	-embryon idéal pour son jour de collecte, sphérique, symétrique, avec des cellules de couleur et texture comparable. -blastomères polygonaux au stade morula, aspect compact.
	Bon	- embryon un peu en retard de développement par rapport à son jour de collecte, - ou embryon semblable à l'embryon excellent mais asymétrique, - ou exclusion de quelques blastomères dans l'espace périvitellin.

Tableau 14: classification des embryons selon leur qualité (d'après l'INRA-UNCEIA, 1990)

2	Moyen	- Embryon en retard de développement de 1 à 2 jours (blastomères sphériques au stade morula) ou des défauts bien précis comme : -nombreuses cellules échappés dans l'espace périvitellin, des vésicules, des cellules dégénérées, blastomères de taille variable. -aspect plus clair ou plus sombre que normal.
3	Médiocre	- nombreux défauts comme de nombreuses cellules échappées, dégénérées, de tailles différentes des vésicules grosses et nombreuses - mais présence d'une masse cellulaire homogène qui apparaît viable
4	Mort ou dégénérés	- arrêt de développement à un stade précoce - cellules dégénérées.

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

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

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

7-Les limites de la production d'embryons 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 être pris en compte : variabilité de la réponse au traitement hormonal, fécondité difficile des femelles fortement super ovulées, la régression prématuré des corps jaunes. (Cognie et Baril, 2002)

7-1/Variabilité de la réponse au traitement de la superovulation :

La variabilité de la réponse ovulatoire rend difficile la planification rigoureuse du nombre de femelles receveuses et limite le développement du transfert embryonnaire. En effet ,23% des brebis Lacaune et 10% des chèvres Alpines et Sananen ont moins de 5 ovulations après le

traitement pFSH et par conséquent sont éliminés de la collecte d'embryons tandis que 17-20% des femelles traitées ont plus de 20 ovulations. (Baril et Cognie ,2004) (cf. figure16)

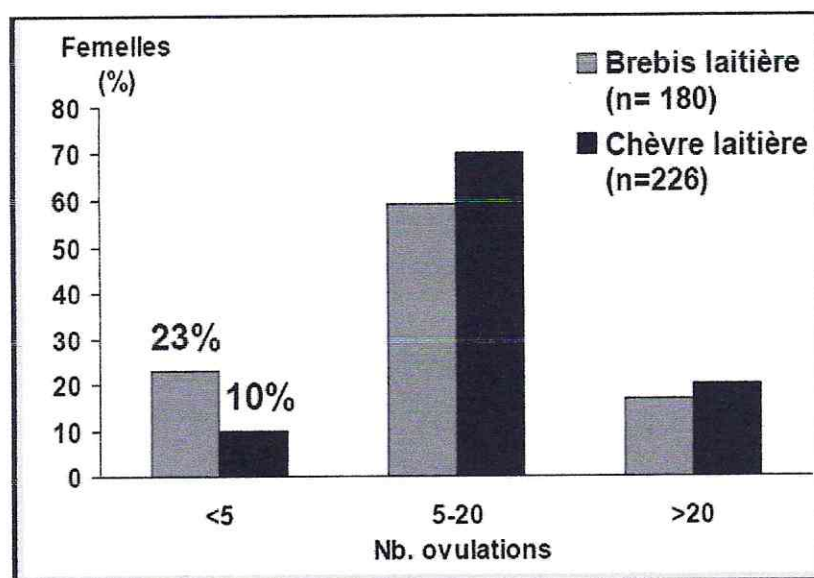


Figure16: Variabilité de la réponse ovulatoire : distribution des femelles donneuses en fonction du nombre d'ovulation après traitement FSH (Baril et Cognie ,2004).

En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats de la superovulation :

A) Influence de la race :

Plusieurs études ont montré pour les caprins et les ovins, des différences de réponses au traitement de superovulation en fonction de la race . Pour la brebis Romney Marsh, Armstrong et Evans (1983) constatent une plus faible réponse au traitement pFSH que pour la brebis Mérinos. Suite à l'administration de 16 mg de FSH porcine, la réponse ovulatoire des brebis de race Lacaune est inférieure à celle des brebis prolifiques Romanov x Préalpe (Torres et al, 1984).la réponse ovulatoire au traitement de la superovulation chez certaines races est résumée dans le tableau ci-dessous :

La race	Type de traitement	La dose	Nombre de corps jaunes	Nombres d'embryons	Auteur
Rombouillet	FSH/LH	33mg (FSH) 25mg (LH)	27	/	(Sam et al, 2008) (Texas)
Targhee× Rombouillet	FSH/LH (10%)	24UI	16.2	/	(Anna et l ,2007) (USA)
Rideau-Arcott (canadienne)	FSH/LH ECG	8.75ml 500UI	9.9	2.5	(Bartlewski et al, 2007) (Canada)

Rasa-Aragonesa	oFSH	76UI	11.4	5.3	(Forcada et al,2000) (Spain)
Manchega	FSH anti -GnRH	10ml 5mg	9.6	/	(Lopez Alonso et al, 2005) (Madrid)

Tableau 15: Effet de la race sur la réponse ovulatoire au traitement de stimulation ovarienne

B) Influence de l'âge :

L'âge de l'animal peut également constituer un facteur limitant compte tenu du fait que le nombre de follicules qui quittent la réserve diminue avec celui-ci (Hanzen, 2000). En revanche, les résultats rapportés par Forcada et al (2000), Simonetti et al, (2007) Bartlewski et al, (2007) la réponse ovulatoire est plus importante chez les brebis adultes que celle des plus jeunes (Cf. Tableau 16).

Tableau 16: résultats des réponses ovulatoires en fonction de l'âge des brebis donneuses.

Age des brebis	Type de traitement	La dose	Nombre de corps jaunes	Nombres d'embryons	Auteur
3-6 ans (Corrieaddle)	oFSH	176UI	1.7	2.9	(Simonetti et al, 2007)
5-7 ans (Rideau-Arcott)	FSH/LH ECG	8.75ml 500UI	9.9	2.5	(Bartlewski et al, 2007)
plus de 8 ans (Rasa-Aragonesa)	oFSH	176UI	11.4	5.3	(Forcada et al, 2000)

C) Influence de l'alimentation :

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

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

Toutefois, ce phénomène n'est sans doute pas seulement assimilable à une mauvaise alimentation, la régression prématurée des corps jaunes implique sans doute une sécrétion prématurée de PGF2 α .

D) Influence des doses utilisées :

Les quantités de FSH à administrer pour obtenir la superovulation sont souvent exprimées en mg d'ustandard Armour. La dose totale efficace varie largement selon la préparation hormonale et le génotype de la donneuse, et devrait être déterminée probablement au moyen d'une courbe dose réponse. Selon Smith et al, 1984 la dose optimum de FSHp à recommander est 22 mg Armour, dose pour laquelle le nombre le plus élevé d'embryon est atteint. Les doses totales de FSHp les plus souvent préconisées chez la brebis sont comprises entre 16 et 21 mg Armour (Brebion et al, 1992 ; Tervit et al, 1984), mais ces doses peuvent s'avérer soit insuffisantes, soit au contraire excessives pour certains génotypes particuliers

E) Influence de l'état de la population folliculaire :

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), plusieurs approches visant à contrôler cette population folliculaire ont été étudiées :

La première approche consiste à augmenter la concentration des gonadotrophines endogènes chez la donneuse en limitant la rétroaction négative de l'ovaire sur le système hypothalamo-hypophysaire par immunisation active contre l'androsténédione ou contre l'inhibine. Cette approche qui permet d'augmenter le nombre d'ovulations et la prolificité des femelles immunisées, n'a pas diminué la variabilité de la réponse au traitement de superovulation et n'a pas été poursuivie. (Cognie, 1998).

Une autre stratégie qui a donné des résultats encourageants chez la génisse (Gongnie et al, 1995), consiste à stimuler la synthèse d'IGF1 afin d'augmenter la population de follicules recrutables par administration de somatotrophines (hormone de croissance ou GH) la semaine précédant la stimulation gonadotrope. Cependant, chez les brebis ayant été traitées dans les mêmes conditions avec l'hormone de croissance, la réponse ovarienne après FSH n'est pas améliorée. Un effet bénéfique de l'hormone de croissance sur la qualité et le nombre d'embryon ovins transférables a été mis en évidence lors que celle-ci est administrée seulement le jour du retrait du support de progestagène, au moment des deux dernières injections de FSH (Folch et al, 2001). Ces auteurs attribuent cet effet bénéfique à une action indirecte à travers l'environnement utérin.

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

7-2-Fécondation difficile des femelles fortement superovulées :

La fécondation in vivo des ovocytes de femelles superovulées pose des difficultés particulières (Armstrong et Evans, 1983), liées non au traitement lui-même (sauf utilisation de PMSG), mais dépendantes de la réponse ovarienne. Le taux de fécondation après IA classique est corrélé négativement au taux d'ovulation (chèvre : Baril et al, 1989).

Le passage des spermatozoïdes à travers le cervix est perturbé chez la brebis superovulée (Evans et Armstrong, 1984) celui impose de déposer les spermatozoïdes le plus près possible du site de fécondation. chez la brebis et la chèvre superovulée avec pFSH, l'insemination intra utérine (IAU) sous contrôle laparoscopie permet d'obtenir un pourcentage élevé d'embryons viables quel que soit le niveau de réponse. chez la brebis inséminée in utero avec $100 \cdot 10^6$ spz conservés à $+15^{\circ}\text{C}$, la qualité embryonnaire est maximale si l'IAU est réalisée 2-6 h après l'ovulation (78% de fécondation alors que la moyenne générale est de 70 % par cette technique) 49h après la fin du traitement progestatif (77% d'embryons viables)

Bien que la saillie est la plus couramment utilisée avec succès au cours de la saison sexuelle, chez les ovins et les caprins, cette technique ne permet pas une diffusion et une utilisation rationnelle des mâles de haut niveau génétique. Par ailleurs, en contre saison, on peut avoir une

faiblesse ou absence de libido des mâles d'une part et d'autres part un pouvoir fécondant plus faible de la semence (Baril et Vallet.1990).

7-3- Répétabilité du traitement de la superovulation :

Chez la brebis ,avec un intervalle de 2 mois entre traitement pFSH 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 à été montré chez la chèvre traité de façon répétitive avec pFSH ,chez la quelle une forte corrélation négative existe entre le titre d'anticorps et le nombre d'ovulation(Remy et al ;1992) .Cependant ,l'administration répétée de oFSH ne provoque pas de diminution du nombre d'ovulation chez les brebis (Baril et al ;2001) .

En revanche Brebion et al, (1990) la répétabilité de la superovulation, varie selon l'espèce considérée. Chez la brebis de génotype croisé hyper prolifique Boorola×Romanov traitée 6-7 fois a intervalles de 60 j par 20 mg pFSH, aucune diminution significative de la réponse n'a été observée (Brebion et al, 1990 ; Forcada et al, 1999) (Cf tableau 17).

Tableau 17: Effet de l'année et du traitement superovulatoire avec l'oFSH sur la réponse ovulatoire et la production d'embryon chez les brebis de Rasa Aragonesa à la fin de leurs vies reproductrices (Forcada, et al 1999)

Nombre	Année			Total
	1996-1997	1997-1998	1998-1999	
Corps jaune	11.4±0.8	10.4±1.4	10.9±1.0	11.0±0.6
Ovules récupérés	7.7±0.6	6.7±1.3	6.9±0.8	7.3±0.5
Embryons fertilisés	6.2±0.6	4.6±1.0	5.6±0.8	5.7±0.4

7-4- Régression prématurée des corps jaunes :

Chez la brebis le phénomène de régression prématurée des corps jaunes est plus rare et n'est signalé que chez des femelles superovulées ayant un déficit alimentaire énergétique (Jabbour et al ,1991).

8-Conservation des embryons avant transfert (frais/réfrigéré/congelé) :

Il existe toujours un délai plus ou moins long entre la récolte d'un embryon et son transfert chez une receveuse. La conservation des embryons durant cette période peut se faire soit à température ambiante (conservation en frais), soit à +4°C (conservation réfrigérée), soit à une température stoppant toute réaction chimique (-196°C conservation par congélation) (Clement ; 1981).

A/Rapport conservation/utilisation:

Il est difficile de prévoir les résultats d'un protocole de collecte d'embryons. Chez la brebis, il est possible d'obtenir en une collecte sur une donneuse plusieurs embryons transférables. Un embryon conservé à température ambiante pendant quelques heures peut être transféré dans une receveuse synchronisée sans aucun problème. Mais si le nombre d'embryons collectés est supérieur à la capacité de gestation (2 à 3 embryons par animal) des receveuses disponibles, il faudra alors conserver ces embryons surnuméraires. Un embryon gardé à température ambiante ou proche de 37°C continue plus ou moins rapidement son développement. Pour être conservé

plus de quelques heures, il faut stopper ou ralentir son développement. Si la conservation doit durer moins de 4 jours en attendant la synchronisation de nouvelles receveuses, la conservation par réfrigération est adaptée. En revanche, si les embryons doivent être conservés pour une période supérieure à 4 jours ou envoyés pour des échanges commerciaux, c'est la cryoconservation qui s'impose. (Bondurant et al ; 1982)

B/ Cryoconservation des Embryons :

Les méthodes réussies pour congeler des embryons de moutons ont été disponibles depuis les années 70, quand le premier agneau a été né après un transfert d'embryon congelé-dégelé (Willadsen et al, 1976)

On ne congèle actuellement avec succès que les morulas compactées et les blastocyste selon une technologie dérivé du modèle bovin. Les variantes concernent le choix du cryoprotecteur.

Chez la brebis et la chèvre l'éthylène glycol 1,5 mol .l⁻¹ ajouté au milieu (20% de sérum de veau fœtal additionné au PBS peut être retenu. L'avantage de fonctionner en trois étapes avec l'addition du cryoprotecteur n'est pas net.

La courbe de refroidissement comporte un palier à -7°C puis une pente de -0.3°/min jusqu'à -30°C, où a lieu l'immersion dans l'azote liquide (-196°C). Si l'on part d'embryons exempte de toutes anomalies morphologique (classe A) on peut prévoir un taux de ranimation moyen de 70%, dont la variabilité (50à90%). (Folch et al ,1991)

L'intérêt de pouvoir congelé ces embryons plus jeunes serait grand. Car le rendement d'une collecte plus précoce est supérieur, particulièrement dans l'oviducte à J3,5. (Folch et al ,1991)

Chez la brebis, la vitrification et la congélation lente d'embryons produits *in vivo* donnent de très bons résultats après transfert, de l'ordre de 50 à 60 % de mise bas (Mermillod *et al* 1999, Baril *et al* 2001).

9-Transfert des embryons :

Chez la plus part des espèces domestiques, la finalité première de l'utilisation de la transplantation embryonnaire (TE) est de parvenir à multiplier la descendance de femelles à haut potentiel génétique au delà de leur possibilités naturelles.

Le premier transfert d'embryon chez les moutons a été rapporté par Warwick et al (1934) et Hunter (1955). Aujourd'hui, leur procédé demeure la base pour le transfert chirurgical d'embryon chez les moutons.

Chez la brebis le transfert embryonnaire par la voie cervicale ne peut pas être utilisé à cause de la forme du canal cervicale. Le transfert est réalisé après extraction de l'extrémité de la corne utérine par une petite incision ventrale sous contrôle laparoscopique. Dans tous les cas le (ou les) embryon doit être déposé (s) dans la corne dont l'ovaire adjacent est porteur d'un corps jaune.

Le transfert d'embryons, utilisé à partir des embryons de géniteurs soigneusement choisis, permet un progrès génétique supplémentaire non négligeable et peut servir à des objectifs commerciaux ou sanitaires. Pour tous les échanges de gène, la voie du transfert embryonnaire est plus économique que le déplacement d'animal vivant, et surtout très sécurisant sur le plan sanitaire (Colleau et al ,1998).

9-1-Condition de réalisation :

L'utilisation de TE chez les petits ruminants est une technique dont l'efficacité économique ne peut se valoriser à échéance qu'avec la maîtrise complète d'un ensemble : structure, technicité,

conduite des élevages sont autant des paramètres à maîtriser de façon concomitante tant pour l'éleveur que pour l'équipe chargée de la réalisation des opérations .C'est la somme de ces compétences qui en assure le résultat.

A/ Choix et préparation physiologique des femelles receveuses :

La valeur génétique des receveuses importe peu, dans le cas d'acquisition des receveuses, leur sélection doit être stricte .Les femelles de réforme présentent souvent des problèmes de reproduction et des problèmes sanitaires.

Il est impératif que les animaux intègrent l'élevage où ils seront transférés au moins trois mois avant le début des traitements, ce délai est nécessaire à leurs adaptation avant les interventions, il faut noter aussi qu'un flushing qui débute trois semaines avant les chaleurs des receveuses et se prolonge trois semaines après les opérations est nécessaire. (Casamitjana ,1991)

Divers facteurs peuvent influencées sur les résultats de transfert embryonnaire qu'on doit éviter trois mois avant les opérations et jusqu'à la mise bas :

1/Le stress d'origine alimentaire : des changements alimentaires sans transition, une distribution même courte d'aliments de mauvaise qualité ou altérés sont nuisibles à partir de deux mois avant les opérations et jusqu'à l'échotomographie, l'alimentation doit être homogène.

2/stress traumatique : sont à prohiber pendant les périodes pré et post-transfert : trois mois avant les opérations et jusqu'à mise bas.

3/ stress prophylactique : les traitements des donneuses et des receveuses doivent être terminés et les vaccinations réalisées un à deux mois avant le début des traitements de préparation aux opérations de transfert.

4/stress sanitaire : tout soin prolongé sur un animal doit être enregistré et signalé.

Dans les trois mois précédant les opérations, une étude préliminaire précisera les conditions d'élevage, la réalisation 'examen individuels des animaux, de bilan sérologique et hématologique permettront d'évaluer la faisabilité des opérations de prélèvement et de transfert des embryons suit à cette visite un bilan est établi et détermine les corrections éventuelles.

B/Synchronisation receveuses / donneuses :

Il est essentiel qu'au moment du transfert, les receveuses soient au même stade physiologique que la donneuse. Elles doivent être en phase lutéale avec un corps jaune provenant d'une ovulation 6 à 8 jours auparavant. L'idéal est donc d'administrer aux receveuses le même protocole de synchronisation que les donneuses (progestagènes le plus souvent). En général, il faut retirer la source exogène de progestérone des receveuses avant les donneuses car leur oestrus est plus tardif (elles ne reçoivent pas d'hormones gonadotropes). (Youngquist ,1997)

Le plus souvent dans l'espèce ovine, contrairement à l'espèce bovine, on transfère 2 embryons par receveuse. De plus, il est préférable de transférer les 2 embryons du même côté que le corps jaune qui semble le plus actif. (Vallet et al ; 1991)

9-2-Décongélation des embryons :

Tout autant que la congélation, la décongélation est une phase critique pour la survie de l'embryon. Qu'il s'agisse d'une cryoconservation par la méthode de congélation lente ou de vitrification, la problématique est la même. Les petits cristaux de glace stables à -196°C peuvent subir une recristallisation lors de la décongélation. En effet entre -90 et -60°C, il peut y avoir réorganisation en plus gros cristaux qui peuvent détruire la cellule (Picard et al ; 1984).

La vitesse de décongélation doit donc être rapide pour empêcher cette recristallisation et préserver l'intégrité cellulaire. Les paillettes sont plongées rapidement dans un bain-marie à une température comprise entre 22 et 37°C pendant une trentaine de secondes, la vitesse de réchauffement est de l'ordre de 2500°C/min (Guignot ; 2005).

S'il ne s'agit pas d'une méthode par transfert direct, les embryons sont passés successivement dans 3 à 4 bains de PBS additionné de cryoprotecteur à concentration décroissante d'éthylène glycol (1.0M-0.5 M-0M) ou de glycol (1M-0.7M-0.3M -0M) permettant la réhydratation progressive des cellules embryonnaires .La qualité des embryons est à nouveau observée , ceux endommagés au cours de l'une des opérations précédentes sont éliminés (Vallet et al ; 1991).

9-3-Techniques de transferts :

a/ Transfert chirurgical :

La préparation de l'animal et son anesthésie / tranquillisation sont les mêmes que celles décrites dans la méthode de collecte chirurgicale.

La technique est décrite comme suit :

- ▶ L'abord utérin se fait par une laparotomie au niveau de la ligne blanche.
- ▶ Une fois repéré, l'utérus est manipulé de sorte à pouvoir observer les 2 ovaires et déterminer celui qui porte un corps jaune fonctionnel. (Youngquist ; 1997)
- ▶ On placera les embryons dans le dernier tiers supérieur de la corne ipsilatérale au corps jaune en la ponctionnant à l'aide d'une aiguille ronde, un cathéter ou une pipette de verre. Les embryons sont contenus dans un cathéter ou une pipette de verre contenant 5 à 20 µl de PBS connecté(e) à une seringue à insuline. (Vallet et al ; 1991)
- ▶ Une fois les embryons transférés, l'utérus est remis en position physiologique et la paroi abdominale est suturée.

Cette technique fut celle de référence jusqu'au début des années 90 à partir desquelles la technique laparoscopique s'est propagée. (Vallet et al ; 1991)

b/ Transfert laparoscopique (figure17) (Youngquist ; 1997) :

La préparation de l'animal et son anesthésie /tranquillisation sont les mêmes que celles décrites dans la méthode de collecte laparoscopique.

Cette technique se résume comme suit :

- ▶ Une fois la brebis en décubitus dorsal avec la tête placée vers le bas, un pneumopéritoine est créé en insufflant du CO₂.
- ▶ Puis deux incisions sont effectuées 2 à 3 cm de part et d'autre de la ligne blanche crânialement à la mamelle : une incision servira à l'introduction de l'optique et l'autre pour une pince atraumatique qui permet de saisir la corne ipsilatérale au corps jaune fonctionnel repéré.
- ▶ Pour ponctionner la paroi utérine, une aiguille de 14 gauges est insérée à travers la paroi abdominale juste crânialement à la pince atraumatique et va traverser la paroi utérine dans le dernier tiers de la corne.
- ▶ Un cathéter de type Tomcat de 16 gauges contenant les embryons est passé à l'intérieur de l'aiguille de ponction. Ce cathéter, relié à une seringue à insuline est alors inséré dans le lumière utérine et les embryons sont déposés.
- ▶ Les instruments sont ensuite retirés et les 2 incisions de la paroi abdominale suturée.

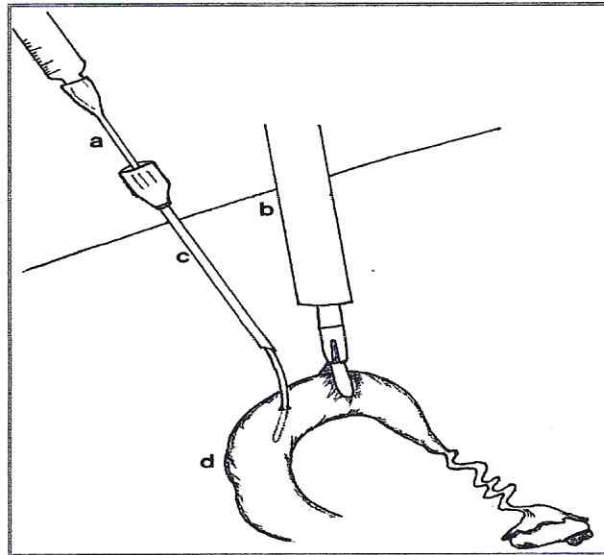


Figure 17 : Transfert embryonnaire chez la brebis par méthode laparoscopique.
 a : cathéter Tomcat de 16 gauges ; b : pince atraumatique ; c : aiguille de 14G servant de canule pour le cathéter ; d : corne utérine. (D'après Youngquist ; 1997)

9-4-Résultats du transfert embryonnaire :

le transfert laparoscopique d'embryons frais permis un taux de gestation de 38.9 % et un taux d'agnelage de 33.3% (Naohisa et al ; 1997). Par contre le transfert laparoscopique d'embryons congelés -décongelés permis des taux de gestation et d'agnelage très faible (soit 26.3%). (cf tableau 18)

Tableau 18: Résultats du transfert laparoscopique avec embryons frais et embryons congelés chez les ovins (Naohisa et al ; 1997)

Embryons	Nombre receveuses	Taux de gestation (%)	Taux d'annelage (%)
Frais	18	7 (38.9)	6 (33.3)
Congelés	19	5 (26.3)	5 (26.3)

En effet le transfert chirurgical classique peut être avantageusement remplacé par la technique laparoscopique, elle est aussi efficace et bien mieux adaptée aux conditions du terrain. le taux de fertilité après un transfert laparoscopique d'embryons frais est comparable a celui obtenus après un transfert d'embryons congelés (Vallet et al ; 1989; Brebion et al ; 1991) (cf tableau19).

Tableau 19 : Fertilité après un transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis (Vallet et al ; 1989; Brebion et al ; 1991).

Transfert

	laparoscopique		chirurgical	
	Embryons frais	Embryons congelés	Embryons frais	Embryons congelés
Taux de gestation	80% (37/46)	90% (18/20)	88% (22/25)	45% (5/11)

Le taux de viabilité après un transfert d'embryons frais et congelés –décongelés est respectivement de 24.3 % et 14.6 % (Naohisa et al ; 1997),(cf tableau 20)

Tableau 20: résultats de transfert d'embryons frais et congelés-décongelés.
(Naohisa et al ; 1997)

Embryons	Stade de développement	Nb d'embryons transférables	Nb d'embryons implantés (%)	Nb d'embryons vivants (%)
Frais	Morula	15	4 (26.7)	3 (20.0)
	Blastocyste	22	6 (27.3)	6 (27.3)
	Total	37	10 (27.0)	9 (24.3)
Congelés - décongelés	Morula	11	7 (63.6)	6 (54.5)
	Blastocyste	30	0	0
	Total	41	7 (17.1)	6 (14.6)

Le taux de mise bas et de survie embryonnaires après un transfert direct d'embryon vitrifiés est plus important par rapport au transfert traditionnel (Baril et al ,2001), (cf tableau 21).

Tableau 21: Taux de mise bas et de survie embryonnaires après transfert direct ou traditionnel d'embryons vitrifiés (Baril et al ,2001)

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

III/ Production D'embryons In Vitro Et Implications Potentielles Pour La Sélection Chez Les Petits Ruminants :

La collecte laparoscopique répétée d'ovocytes suivie de la FIV et de la culture des zygotes jusqu'au stade blastocyste permettent d'obtenir un plus grand nombre d'embryons et donc d'augmenter la descendance des femelles d'élite par rapport à la production d'embryons *in vivo*. (Besenfelder et al 1999)

Elle permet en outre de produire, en un temps relativement court, des embryons de plusieurs mâles pour une même femelle. En effet, la ponction folliculaire est moins invasive et plus simple que la collecte des embryons dans les cornes utérines, elle peut être répétée sans obligation d'un

traitement hormonal (Besenfelder et al 1999) et est efficace à des stades physiologiques (pré-puberté ou début de gestation) auxquels la production in vivo d'embryons est impossible.

La viabilité après transfert des embryons obtenus in vitro chez la femelle adulte est acceptable, puisque près de la moitié des embryons transférés évoluent normalement jusqu'au terme de la gestation. Elle est néanmoins plus faible que la viabilité des embryons obtenus in vivo. (Cognié et al ; 2001)

IV/Sexage et typage génétique pré-implantatoire :

La détermination du sexe de l'embryon par détection de séquences ADN du chromosome Y à partir de cellules biopsées est suffisamment précise et rapide après l'amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR).

Le sexage des embryons bovins peut être utilisé avec succès pour les embryons ovins (Kochhar *et al* 2000), mais, à l'heure actuelle, le coût dissuasif de l'agneau ainsi produit limite l'utilisation de cette technique. Cependant avec les progrès réalisés sur les techniques de biologie moléculaire et sur la connaissance du génome, la possibilité de typage génétique de l'embryon avant son transfert ouvre des perspectives d'utilisation de méthodes de sélection assistée par marqueurs. (Bishop 1995).

V/ La Transgénèse :

La transgénèse animale a été réalisée avec succès pour la première fois il y a 17 ans; elle consiste à ajouter, remplacer ou inactiver un gène particulier. Cette technique permet des progrès considérables dans la connaissance du fonctionnement des gènes et des mécanismes qui gouvernent les fonctions biologiques. Ses applications potentielles pour produire des médicaments, des vaccins, des protéines alimentaires ou en amélioration génétique sont très vastes, mais encore limitées en raison de son coût et de la difficulté de sa mise en oeuvre (Houdebine ; 1998).

• L'addition de gènes :

La technique de transfert de gènes la plus utilisée est la microinjection directe du gène étranger dans les pronoyaux des embryons au stade une cellule lorsque cela est possible (comme cela est le cas chez les mammifères) ou dans le cytoplasme (chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés). (Houdebine ; 1998)

Il est maintenant devenu possible chez la vache, le mouton et la chèvre de produire à un coût réduit des embryons au stade une cellule totalement in vitro, à partir d'ovocytes isolés d'ovaires collectés dans les abattoirs. Les embryons peuvent alors subir la microinjection de gène, puis être cultivés in vitro jusqu'au stade blastocyste, pour être ensuite transférés dans des femelles adoptives. La maîtrise de ces techniques contribue à améliorer la reproduction des animaux et à rendre plus aisée la transgénèse (Crozet, 1997).

VI/ Le clonage :

Le terme clone est utilisé pour désigner une population de cellules dérivées d'une cellule unique et donc génétiquement identique à cette cellule. Dans tous les cas et contrairement à une idée reçue, le clone au sens de copie conforme n'existe pas en biologie : même s'ils sont génétiquement identiques.

Depuis la naissance du mouton *Dolly* l'usage du mot clone a évolué. Il est utilisé maintenant le plus souvent pour désigner un animal, fut-il unique, obtenu à partir du noyau d'une cellule

somatique, prélevée sur un animal adulte. Cet animal possède le génome nucléaire de l'animal donneur de cellules, mais son génome mitochondrial est celui de l'ovocyte receveur. Il n'est donc pas tout à fait génétiquement identique à l'animal donneur. (Thibault; 2001)

- **Les applications du clonage :**

- **L'expérimentation animale :**

Pour mesurer l'effet d'un traitement sur des caractéristiques physiologiques ou des performances zootechniques nécessite la comparaison avec un groupe d'animaux témoins aussi semblables que possibles aux animaux traités. Les clones permettraient de réduire la variabilité et donc de mieux déceler l'effet du traitement tout en diminuant le nombre animaux nécessaires. (Colleau et al 1998)

- **La gestion des ressources génétiques :**

Le clonage pourrait devenir un outil précieux pour le maintien d'espèces en danger de disparition ou de races de mammifères domestiques que l'on souhaite conserver. Le clonage peut devenir un outil d'appoint dans les stratégies pour la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique. (Dominiko et al ; 1999)

- **La sélection des animaux :**

Les programmes de sélection visent à repérer les génotypes les plus performants dans les élevages en faisant la part de ce qui, dans l'expression d'un caractère zootechnique pour cela, on mesure des caractéristiques de production (comme par exemple la production laitière, le taux protéique du lait, l'efficacité alimentaire, la croissance musculaire, la qualité des tissus adipeux) sur des animaux apparentés. En corrélant ces mesures avec le degré de parenté des animaux, on établit des coefficients (index) qui permettent de prédire la part due aux gènes dans la valeur du caractère mesuré. Plus le nombre d'animaux mesurés (d'un degré de parenté donné), est élevé, plus on connaît avec précision la valeur génétique d'un reproducteur. (Colleau et al ,1998)

PARTIE
EXPERIMENTALE

OBJECTIFS

La production d'embryons in vivo a connue une amélioration très importante ces dernières années, plus importante chez les bovins que chez les petits ruminants.

Le cheptel ovin occupe une place très importante dans le marché de viande algérien. Ce cheptel repose principalement sur 03 races : Ouled Djelall, Hamra et Rumbi. Cependant, l'effectif de la race Hamra est en constante diminution, il a passé de 2.500.000 en 1980 a 55.000 en 2003 (MAP). A cet effet, les objectifs visés par notre étude sont les suivants :

- La maîtrise des techniques de collecte et de transfert embryonnaire in vivo.
- Evaluation de la réponse ovarienne après un traitement de synchronisation / superovulation avec une dose de 20 mg de FSHp chez la race Hamra.

CHAPITRE I

EVALUATION DE LA REPOSE OVARIENNE AU TRAITEMENT DE SYNCHRONISATION/ SUPEROVULATION

Lieu et période de l'expérimentation :

La superovulation représente une étape essentielle dans le cadre d'un protocole de transplantation embryonnaire, dans la mesure où elle permet une production importante d'embryons transférables.

Cette partie du travail s'est déroulée au niveau de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb de Blida du 17 Novembre 2007 au 30 Mars 2008.

I/ Matériel et méthodes :**I-1-Matériel :****A-/Animaux :****A-1-Les brebis :**

Sept (07) brebis ont été choisies pour la réalisation de notre travail, trois (03) brebis donneuses de race Hamra et quatre (04) brebis receveuses de race mixte. Les renseignements relatifs à l'identification des brebis sont reportés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 1 : Poids, âge et note d'état corporel des donneuses

Brebis (Hamra)	Poids (Kg)	Age (mois)	Note d'état corporel
1	42	15	2.5
2	40	15	2.25
3	48	36	3

Tableau 2: Poids, âge et note d'état corporel des receveuses

Brebis (mixte)	Poids (Kg)	Age (mois)	Note d'état corporel
R1	45	24	2.5
R2	46	15	2.75
R3	44	36	2.5
R4	47	24	2.75

A-2-Les béliers :

Trois béliers ont été choisis pour la détection des chaleurs et la saillie. Deux (02) béliers de race Ouled Djellal et Rumbi ont été utilisés pour la détection. Ils présentaient un âge moyen de 3 ans, un poids moyen de 56 kg et une note d'état corporel moyen de 3 points. Un (01) bélier de race Hamra, ayant un âge de 4 ans, un poids moyen de 55kg et une note d'état corporel de 3 points, été utilisé pour la saillie.

- Les animaux ont été identifiés, séparés du troupeau pendant toute la période de l'étude. Ils recevaient une alimentation constituée d'une ration de base de foin d'avoine et d'une ration complémentaire, à base de concentré.

- Le déparasitage du cheptel ovin a été fait auparavant par le vétérinaire de la station expérimentale, avec des antiparasitaires (ValbenzenND) et (IvomecND).

B / Appareils, instruments et produits :

B-1- Appareils et instruments:

a-Matériel Echographiques :

Le matériel utilisés pour la réalisation de l'examen échographique est le suivant :

- Un échographe de type pie médicale 100 LC pourvu d'une sonde bifréquences 6/8.
- Un tube de guidage
- Des gants.
- Un gel lubrifiant.

b-Matériel endoscopique : le matériel endoscopique utilisé est le suivant (Cf photo.1):

- Une table de contention inclinable.
- Endoscope avec vision directe (0°), diamètre externe 6.5mm (Storz).
- Générateur de lumière froide à intensité variable.
- Câble de fibre optique.
- Trocart avec canule à piston et orifice pour l'insufflation d'air (trocart 7mm de diamètre recevant l'endoscope).
- Trocart avec canule de 5mm recevant la pince à préhension.
- Pompe avec filtre et commande de pompe au pied.
- Tuyau de connexion entre la pompe et le robinet d'arriver de l'air fixé su le trocart recevant l'endoscope.
- pistolet d'insémination intra utérine
- Pince à préhension atraumatique.

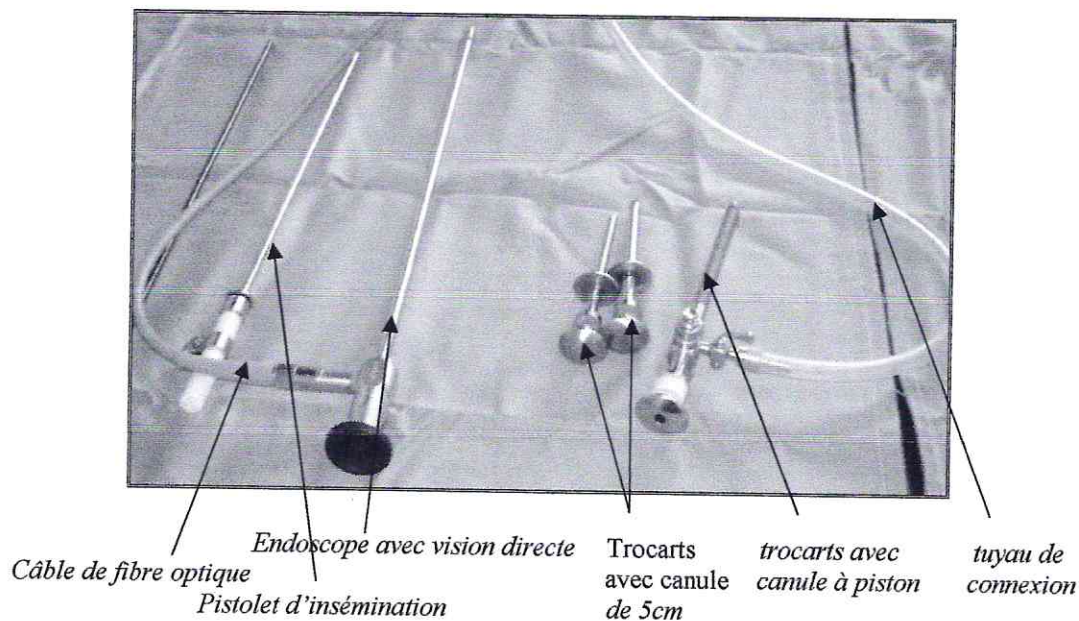


Photo 1 : matériel endoscopique

B-2- Produits :

1- **Eponges vaginales** : Les éponges vaginales utilisées sont imprégnées chacune de 40 mg d'acétate de fluorogestone (FGA), commercialisées sous le nom de (CHRONOGESTND).

2- **pFSH** : Extrait hypophysaire porcine purifié (STIMUFOLND)

3- **pLH** : Extrait hypophysaire porcine purifié (STIMUFOLND).

4- **PMSG** : (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) conditionné dans des boîtes contenant des flacons de lyophilisat (1000 UI) et des flacons de solvant, ce produit est commercialisé sous le nom de (FOLLIGONND)

5-Antibiotiques et désinfectant :

Nous avons utilisé de la (TerramycineND) injectable et sous forme de spray, ainsi que du permanganate de potassium.

I- 2- Méthodes :**A- Examen échographique :**

L'examen échographique avait comme but, de sélectionner des brebis vides et la confirmation de la gestation après transfert. Nous avons utilisés la technique décrite par KHAN (1994).

La sonde bifréquences 6/8 Mhz a été fixée à un tube de guidage (support en PVC), ce qui permet l'introduction de la sonde et sa manipulation externe. La brebis a été examinée en position dorsale et /ou debout par voie transrectale ou transabdominale.

Pour la position transrectale, une fois que la brebis été contentionnée, la sonde recouverte de gel été introduite délicatement dans le rectum jusqu'à l'observation de la vessie. Ensuite le faisceau ultrasonore été dirigé vers la gauche puis la droite de la vessie, lorsque les fèces sont collés sous la sonde, un léger mouvement de vas et vient avec la sonde ou la réintroduction de façon répétée dans le rectum a été réalisé.

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

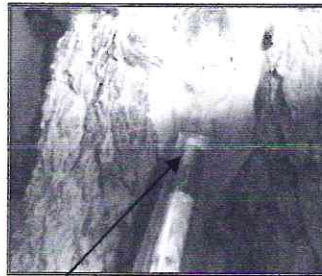
Pour l'interprétation d'une image échographique nous avons considéré que :

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

B- Protocole de synchronisation et de superovulation :**B-1-la synchronisation des chaleurs :**

La synchronisation des chaleurs consistait en la mise des éponges pendant 14 jours chez les brebis donneuses et 13,5 jours chez les brebis receveuses.

L'éponge vaginale été pulvérisée avec de la terramycine avant sa mise en place .Après contention de la brebis, l'applicateur lubrifié avec un gel et muni de l'éponge été introduit jusqu'au fond du vagin tout en évitant le traumatisme du méat urinaire. L'applicateur été ensuite retirer soigneusement laissant le fil entre les deux lèvres vulvaires permettant ainsi son retrait ultérieur (Cf photo.2).



Applicateur muni d'une eponge vaginale

Photo 2 : Mise en place de l'éponge vaginale.

Pour les receveuses, une injection de 500UI de PMSG a été réalisée au moment du retrait de l'éponge soit 12h avant les donneuses (Cf figure18).

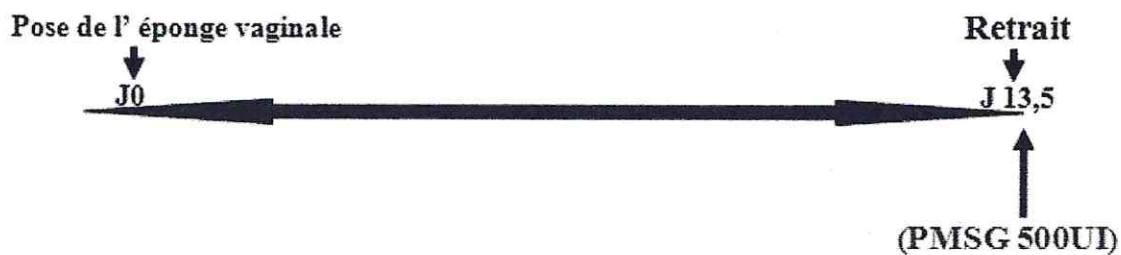


Figure18 : Protocole de synchronisation des chaleurs chez les receveuses.

B-2-Traitement de superovulation :

Le traitement consistait en l'administration pendant trois jours avant le retrait de l'éponge d'une dose décroissante de 20 mg de pFSH à un intervalle de 12h (Cf figure 19).

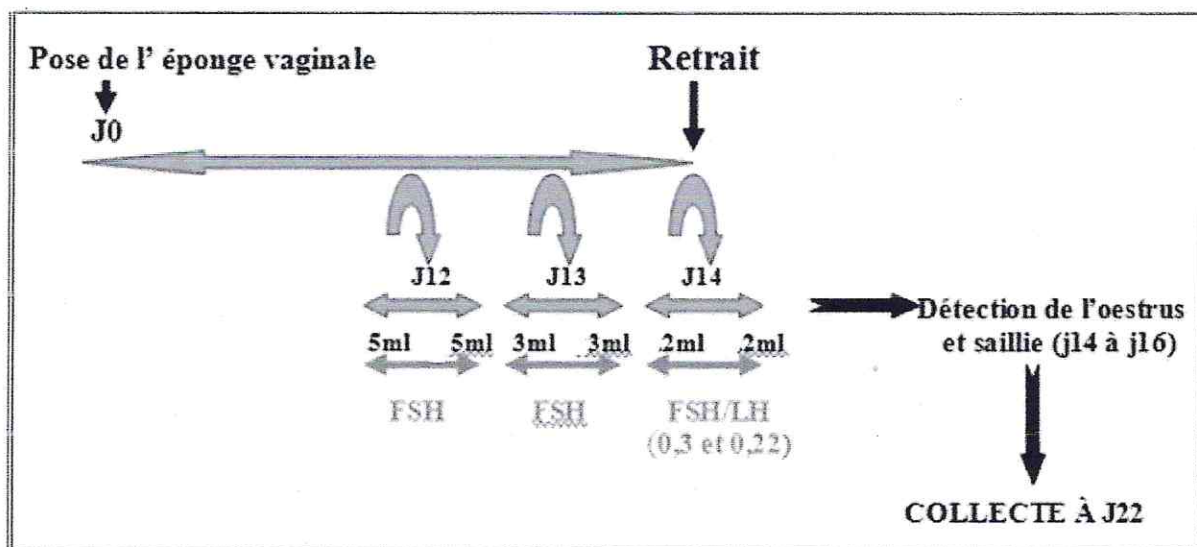


Figure 19 : Protocole de synchronisation superovulation et collecte des embryons chez les donneuses.

B-3-Détection des chaleurs :

La détection des chaleurs commençait 16h après le retrait du dispositif intra-vaginal chez les donneuses, soit 24h pour les receveuses (Cf Photo.3). Elle était réalisée toute les 4 h à l'aide d'un bélier menu d'un tablier.

Toute femelle restant immobile lors du chevauchement était considérée en chaleur. Les donneuses ont été saillies deux fois à 12 h d'intervalle (Cf Photo.4).

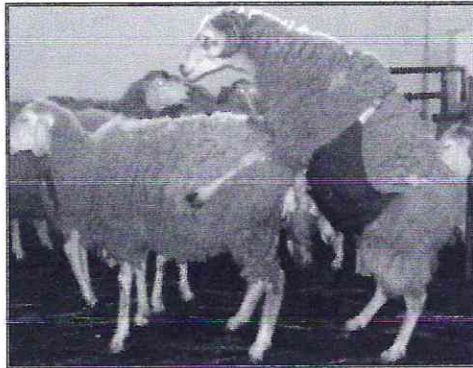


Photo3: Détection des chaleurs chez les receveuses

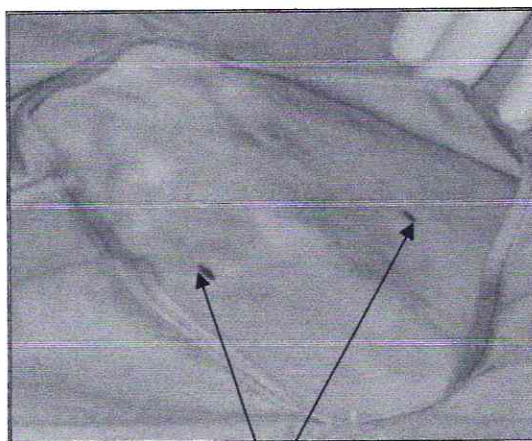


Photo 4 : saillie des donneuses

B-4-Examen endoscopique :

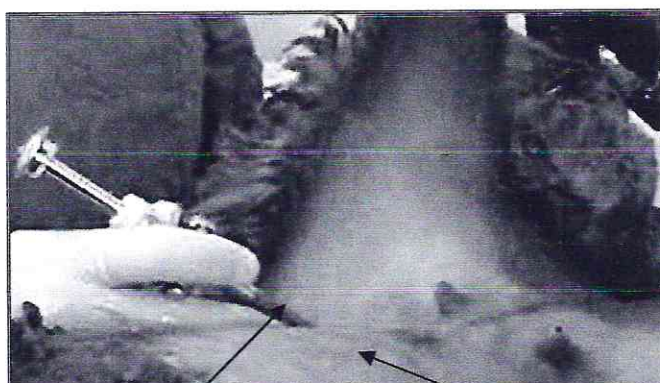
Deux incisions de la peau abdominale ventrale étaient effectuées 5à7 cm cranialement de la mamelle et 3à4 cm latéralement de la ligne blanche afin de pouvoir insérer les deux trocars. (Cf photo.5)

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 (Cf photo.6). Cela créait un pneumopéritoine et permettait de mieux observer l'appareil génital de la donneuse. Puis un deuxième trocart de 5 mm était mis en place pour y insérer une pince atraumatique permettant l'observation des ovaires (Cf photo.7). L'opérateur vérifiait tout d'abord la présence des corps jaunes sur les deux ovaires. Si une brebis possédait un total de moins de 3 corps jaunes semblant actifs, il décidait de ne pas la collecter. (Cf photo.8)



Incisions

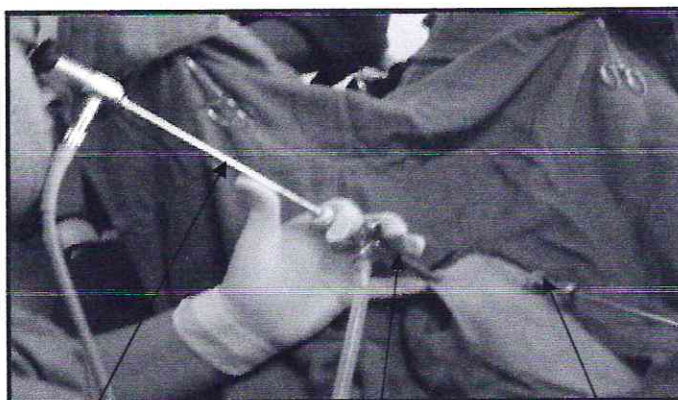
Photo 5 : Deux incisions de part et d'autre de la ligne blanche



*Trocart introduit dans l'abdomen et
insufflation d'air stérile*

pneumopéritoine

Photo 6 : insufflation de l'air stérile dans la cavité abdominale

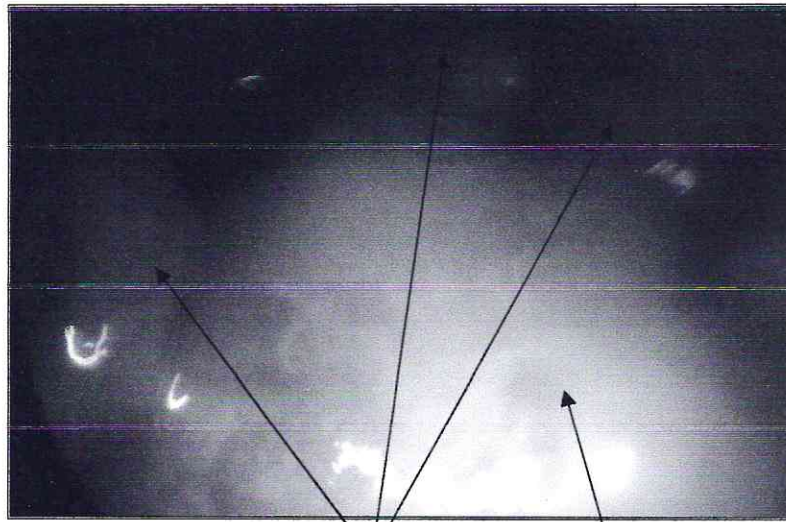


Optique dell'endoscope

Canule (7mm)

Canule (5mm)

Photo7: insertion de l'optique et du trocart



Corps jaunes *ovaire*
Photo 8: Examen endoscopique des ovaires

I-Résultats :**I-1-Expression des chaleurs chez les donneuses :**

Les résultats de la détection des chaleurs chez les donneuses sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : la durée moyenne des chaleurs chez les donneuses.

Brebis (Hamra)	Chaleurs après le retrait de l'éponge (heures)		
	Début	Fin	Durée des chaleurs
1	28	52	24
2	24	52	28
3	32	52	20
Durée moyenne	28±4	52±0	24±4

Les résultats obtenus, montrent que les chaleurs ont débutés 24h après le retrait du dispositif intra vaginal ; alors que la fin de ces dernières a été observée 52h après le retrait. La durée moyenne de l'oestrus chez les trois brebis est de 24±4h, la brebis n°3 a présenté un oestrus plus court (20h) que les brebis n°1 et n°2 (24h et 28h).

I-1-Expression des chaleurs chez les receveuses :

Les résultats de la détection des chaleurs sont reportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : la durée moyenne des chaleurs chez les receveuses

Brebis (mixte)	Chaleurs après le retrait de l'éponge (heures)		
	Début	Fin	Durée des chaleurs
R1	32	64	32
R2	26	62	35
R3	36	64	28
R4	36	64	28
Durée moyenne	32.5±4.72	63.5±1	30.75±3.4

Nos résultats montrent que la durée moyenne des chaleurs chez l'ensemble des receveuses est de (30.75h±3.4). Cette durée varie de 28h à 35 h.

II- Résultats de la réponse ovulatoire chez les donneuses :

L'évaluation de la réponse ovarienne par dénombrement des corps jaunes chez les donneuses a été réalisée juste avant la récolte des embryons à l'aide d'un examen endoscopique. Les résultats du dénombrement sont rapportés dans le tableau 5.

Tableau 5: Réponse ovulatoire par ovaire chez les brebis superovulées.

Brebis	Nombre de corps jaunes		
	Ovaire gauche	Ovaire droit	Moyenne
1	03	05	04
2	03	04	3.5
3	04	02	3
Moyenne	3.33±0.57	3.66±1.52	3.49±1.5

Les résultats du traitement de superovulation révèlent des réponses ovulatoires moyennes voisines pour chaque une des cornes gauche et droite (3.33±0.57 et 3.66±1.52). La réponse ovulatoire moyenne par brebis était de 3.49±1.5.

Tableau 6: Résultats de la réponse ovulatoire globale pour l'ensemble des brebis.

Brebis	Nombre de corps jaunes
1	08
2	07
3	06
Totale	21
Moyenne	07±1

Le dénombrement des corps jaunes par endoscopie nous a dévoilé des réponses ovulatoires voisines chez les trois brebis donneuses et qui sont respectivement 08 ; 07 et 06 ovulations, avec un totale de 21CJ et une moyenne de 07 CJ par brebis.

III- Résultats de la réponse ovulatoire chez les receveuses :

L'évaluation de la réponse ovulatoire après le traitement à base de PMSG a la dose de (500UI) été faite par endoscopie avant l'opération de transfert et les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7: résultats de la réponse ovulatoire chez les receveuses.

Brebis	Nombre de corps jaune		Total
	Ovaire gauche	Ovaire droit	
1	01	00	01
2	00	01	01
3	01	00	01
4	00	01	01
Moyenne	0.5±0.57	0.5±0.57	01±1

Nos résultats montrent que toutes les brebis ont présentés au moins un corps jaune actif sur l'un des ovaires, (01 CJ/ brebis).

CHAPITRE II

RECOLTE ET TRANSFERT DES EMBRYONS

Les opérations de collecte et de transfert ont été réalisées simultanément sans conservation d'embryons, au niveau de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb Blida.

I-Matériel et méthodes :

I-A- Matériels:

1-Animaux :

Les brebis utilisées durant cette partie du travail sont les mêmes décrites dans le chapitre I (03 donneuses de race HAMRA et 04 receveuses de race Mixte).

2-Instruments et produits :

Les instruments et produit utilisés sont les suivants :

- Savon et éponge.
- Rasoir et lame de rasoir.
- Champs de tissu.
- Pince à champs.
- Alcool iodé.
- Alcool chirurgical.
- Fil de suture non résorbable n°6, fil de suture résorbable " Vicryl décimale n°2 et 5 ", aiguille de suture. et porte aiguilles.
- Lame de bistouri et porte lame.
- Antibiotique (Terramycine, pénicilline-streptomycine) injectable et pour la pulvérisation sur le site de ponction de l'abdomen
- Anesthésie générale (xylazine) et locale (xylocaïne).
- Ciseaux et Forceps (cf photo9).
- Pinces Bulldogs (cf photo9).
- Seringues de 50ml pour injecter le PBS.
- Une sonde de Foley pédiatrique (30cm, ballonnet 5cc) (cf photo9).
- Sonde cannelée.
- Trocarts.
- Cathéter 16 gauges.
- Clamps vasculaires.
- Flacons de récolte stérile.
- Boîtes de pétrie carrées quadrillées.
- Petites boîtes de pétrie ronde.
- Une pipette en verre montée sur une seringue à insuline
- Loupe binoculaire (Nikon) et microscope inversé (Hund)
- Bain marie.
- Tubes gradués (50 ml)
- PGF2 α (Estrumate)

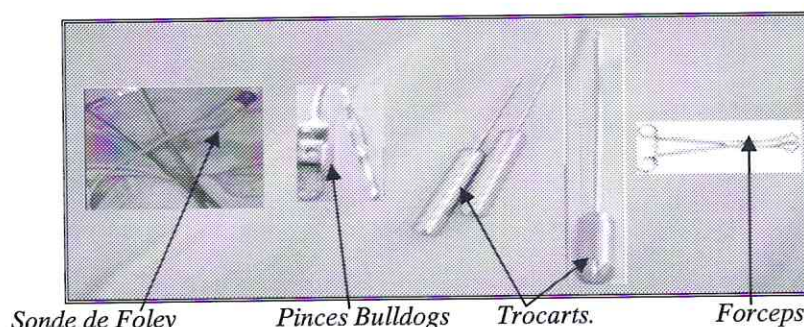
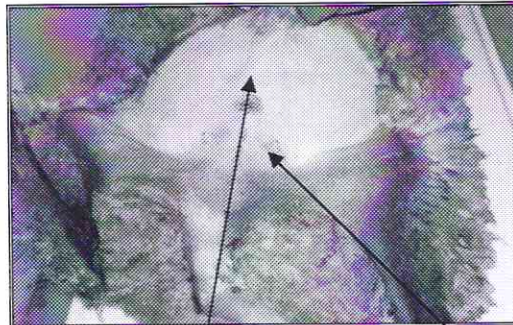


Photo 9: instruments de récolte chirurgicale

I-B- Méthodes :**1-Préparation des animaux et du champ opératoire :**

La récolte des embryons a été réalisée 6 jours après la saillie. Les brebis étaient mises à la diète complète la veille au soir du jour de collecte.

Après une tranquillisation avec de la xylazine à la dose de 0,1 mg/kg, la brebis a été mise en position dorsale sur une table. La région abdominale ventro-caudale juste cranialement de la mamelle a été nettoyée et rasée. (Cf photo.10)



Zone de rasage autour de la mamelle *mamelle*
Photo 10 : Rasage au tour de la mamelle

La brebis a été contentionnée sur une table inclinable afin de faciliter l'observation du tractus génital sous endoscopie (Cf photo.11). Une anesthésie générale à base de kétamine a été alors administrée en IV à la dose de 5,5 mg/kg.



Photo 11 : contention de la brebis sur la table

Le champ de tissu était fixé aux membres postérieurs à l'aide de deux pinces laissant ainsi apparaître la région rasée. Le site opératoire a été désinfecté deux fois avec une solution alcoolique et iodée. (Cf Photo.12)

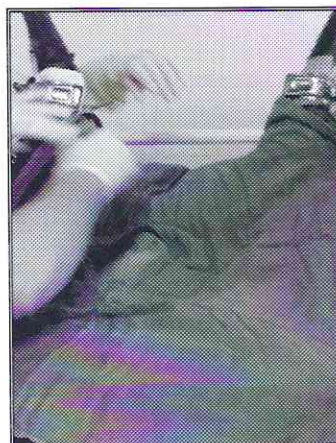
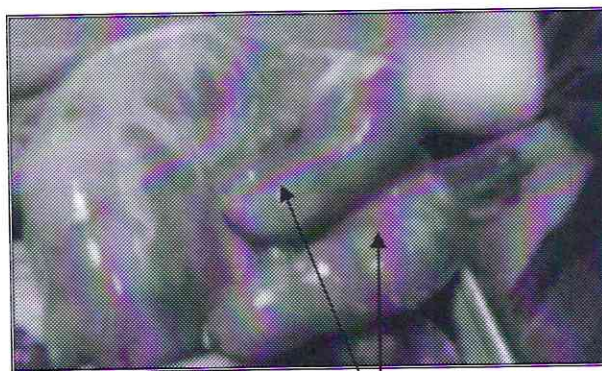


Photo 12: mise en place du champ opératoire

2- Récolte chirurgicale :

Si le résultat de l'examen laparoscopie était favorable (présence de corps jaunes plus de 03 et absence d'adhérences), l'opération de récolte chirurgicale des embryons était alors lancée. Tout d'abord une incision abdominale ventrale de 3 à 4 cm au niveau de la ligne blanche était effectuée juste crânialement à la mamelle. A l'aide de forceps de 25cm de long, une corne utérine était attrapée grâce à la vision endoscopique.

Une fois l'utérus isolé, l'ensemble du matériel laparoscopique était retiré. En tirant doucement sur les forceps, la corne utérine était extériorisée de l'abdomen jusqu'à ce que l'opérateur puisse l'attraper avec sa main. Une fois les forceps retirés, les 2 cornes utérines étaient alors entièrement extériorisées tout en laissant les ovaires et le cervix dans l'abdomen (cf photo.13).

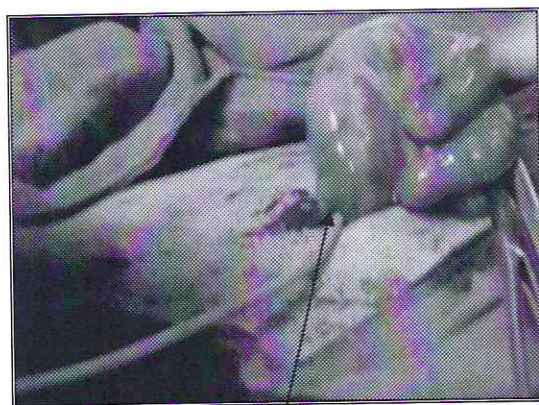


Corne gauche et droite

Photo 13: Deux cornes utérines extériorisées

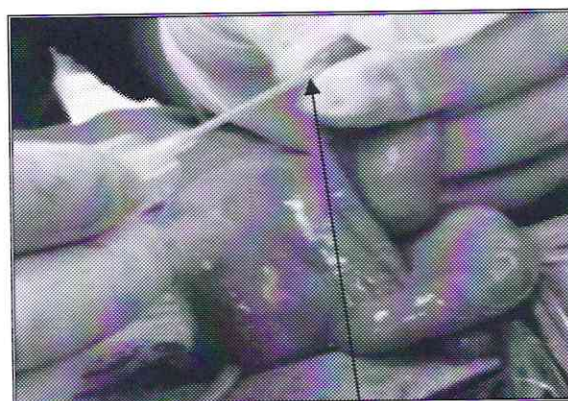
La procédure de collecte d'une corne puis l'autre pouvait commencer. A l'aide de petits ciseaux pointus, la paroi d'une corne utérine était ponctionnée juste crânialement à la bifurcation des 2 cornes. L'opérateur introduisait une sonde de Foley et gonflait le ballonnet à l'aide de milieu de récolte maintenu à 37°C afin d'obstruer la base de la corne utérine (cf photo.14). L'autre extrémité de la corne était ensuite ponctionnée à l'aide du cathéter juste après la jonction utéro-tubaire (cf photo.15).

Pour récupérer les embryons, 40 ml de milieu de collecte (PBS) étaient injectés à l'aide d'une seringue de 50ml reliée à un cathéter 16 G. Le milieu de récolte était récupéré par la sonde de Foley dans un tube en plastique. Pour faciliter l'écoulement du milieu de collecte, l'opérateur effectuait un léger massage de la corne utérine (cf photo.16). L'opération était ensuite renouvelée sur l'autre corne.



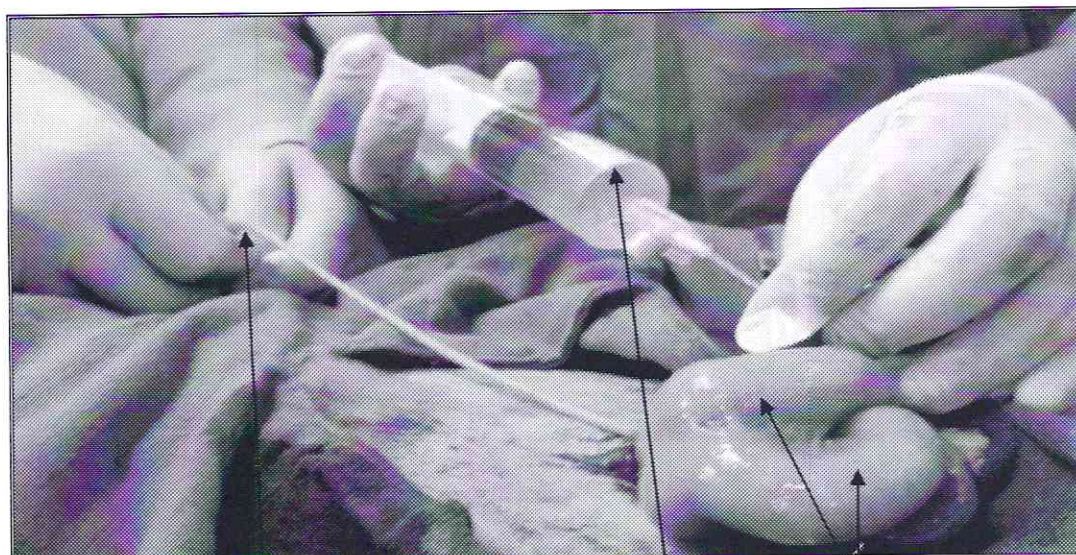
Sonde Foley

Photo 14: sonde de Foley mise à la base de la corne



Cathéter introduit dans la corne utérine

Photo 15: mise en place du cathéter



Liquide récupéré dans le flacon stérile Injection du PBS cornes utérines

Photo16 : Injection du milieu de récolte dans la corne utérine
Et sa récupération dans le flacon stérile

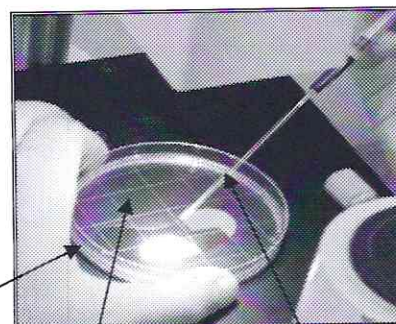
Une fois les 2 cornes collectées, une suture par un point simple de l'incision ayant permis l'insertion de la sonde de Foley était effectuée avec un fil résorbable (Vicryl® décimale 2). Puis, la brebis était replacée en position horizontale pour faciliter sa respiration. L'utérus était doucement remis en position physiologique avant que l'opérateur ne suture la paroi abdominale par des points en croix avec du Vicryl® décimale 5. La peau était suturée par des points simples avec un fil non résorbable.

3-Tri et sélection des embryons :

Le milieu de collecte, récupéré dans un récipient en plastique transparent marqué de façon indélébile avec le numéro d'identification de la donneuse était transmis à l'opérateur chargé de la recherche des embryons (cf photo.17).

A l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 40), après décantation, le fond de chaque récipient était observé. Pour manipuler les embryons, l'opérateur utilisait une paillette (cf photo18), pour aspirer les embryons trouvés et les transférer dans une boîte de Pétri (Diamètre 5 cm) contenant du milieu de collecte. Ainsi, les embryons récupérés dans les 2 cornes utérines étaient réunis dans la même boîte de Pétri avec identification précise de la donneuse. La phase d'identification du stade de développement et de la qualité des embryons pouvait alors commencer.

Les embryons été observés individuellement à un grossissement x 60 afin de déterminer leur stade de développement et leur qualité selon la nomenclature de l'INRA-UNCEIA (1990) et l'ETIS (1998).

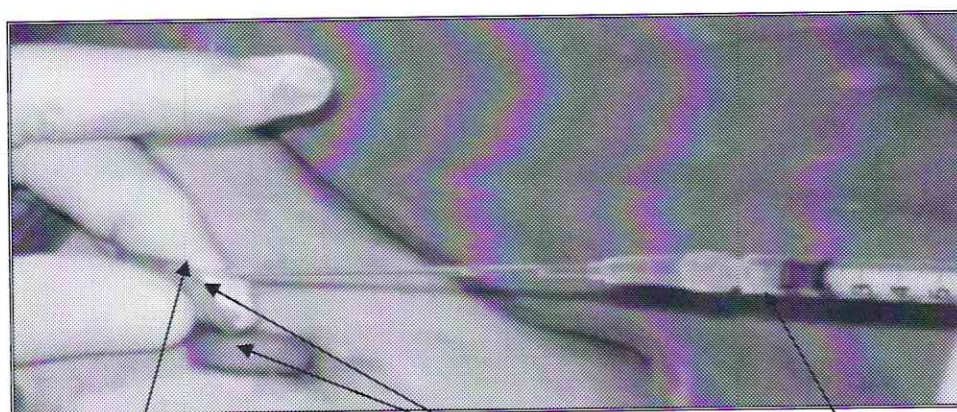
*Microscope inversé***Photo 17** : recherche des embryons sous microscope*boîte de Pétri liquide de récolte pipette*
Photo 18 : sélection des embryons**4-Transfert embryonnaire :**

Le transfert était à chaque fois précédé d'un examen laparoscopique. La préparation et la contention des animaux était exactement la même que pour la collecte : diète complète 12h auparavant, tranquillisation à base de xylazine (0,1 mg/kg), rasage, nettoyage et mise en place sur la table à plan inclinable. Le but de l'examen laparoscopique était de vérifier la présence d'au moins un corps jaune paraissant fonctionnel.

Une fois la brebis receveuse installée sur la table et inclinée la tête en bas, un premier trocart de 7 mm était mis en place afin d'introduire l'optique et de créer un pneumopéritoine. Puis un second trocart de 5 mm était mis en place pour y insérer une pince atraumatique.

Une incision de 2 cm de long était pratiquée au niveau de la ligne blanche pour pouvoir y insérer un forceps. Grâce à la vision endoscopique, l'opérateur saisissait la corne utérine. Le matériel d'endoscopie était alors retiré et l'extrémité crâniale de la corne utérine exposée à l'extérieur de l'abdomen et saisie à la main par l'opérateur. Une ponction de la paroi utérine était ensuite réalisée avec une aiguille afin de pouvoir y insérer l'extrémité de la paillette contenant les 2 embryons (Cf photo19).

Une fois les embryons injectés, la corne utérine était relâchée pour retourner dans l'abdomen, puis la paroi abdominale suturée par un point en croix (Vicryl® décimale 5) et la peau par un point simple à l'aide d'un fil non résorbable n°6.

*Paillette contenant les embryons cornes utérines seringue à insuline***Photo 19**: transfert des embryons

5-Soins post opératoires :

Une fois la collecte chirurgicale terminée, les donneuses étaient mises au calme durant 12 heures avant de retourner dans leur stabulation d'origine. C'est à ce moment qu'elles pouvaient reprendre leur alimentation. Une dose lutéolytique de PGF2 α de 0.01ml/kg (IM) leur était administrée le jour et le lendemain de l'opération afin d'éviter toute gestation. Un traitement antibiotique à base de pénicilline et de streptomycine leur était administré en (IM) à la fin de la collecte puis les 2 jours suivants à la dose de 0.05ml/kg.

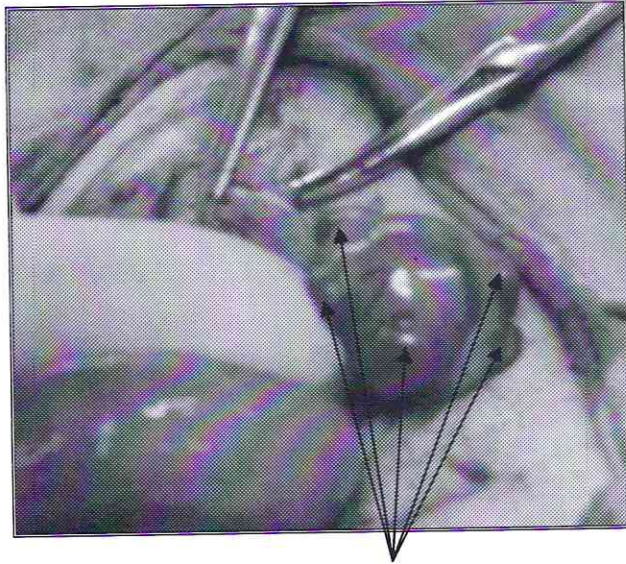
6- Diagnostic de gestation :

Quarante (40 j), après la date du transfert des embryons chez les receveuses, un examen échographique (même méthode décrite dans le chapitre I) à été réalisé pour détecter d'éventuelles gestations.

II-Résultats :

II-1) Dénombrement direct des corps jaunes :

Le dénombrement direct des corps jaune après l'extériorisation des ovaires était identique à celui obtenus par examen endoscopique pour les 03 donneuses (cf. photo20).



Corps jaunes

Photo20 : dénombrement des corps jaunes après extériorisation de l'ovaire

II-2) LES RESULTATS DE LA RECOLTE :

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

1-Taux de récupération :

L'observation sur microscope inversé des liquides de récolte des embryons, a révélé les résultats qui sont résumés dans le tableau suivant:

Tableau 8: Taux de récupération

Brebis	Nombre de CJ	Nombre de structures récoltées	Taux de récupération %
1	8	5	62.5
2	7	5	71.42
3	6	1	16.66
Taux moyen	7±1	3.66±2,30	52.38

Nous avons constaté que le taux de récupération est plus important pour la brebis n°1 et 2 (62.5 % et 71.42 % respectivement). Le taux moyen obtenu pour l'ensemble des brebis est de 52.38 %.

2-Taux moyen des structures récoltées :

Le nombre des structures récoltées par corne et par brebis sont présentés dans les tableaux ci-dessous (cf tableaux 9,10) :

Tableau9 : le nombre des structures récoltées par brebis

Brebis	Structures récoltées
1	5
2	5
3	1
Total	11
Moyenne	3.66±2,30

Nos résultats montrent que pour les trois brebis le nombre total des structures récoltées (embryons ou ovocytes non fécondés) est de (11) avec une moyenne de (3.66±2,30) par brebis.

Tableau10 : Nombre et moyenne des structures récoltées par corne.

Brebis	Structures récoltées	
	Corne droite	Corne gauche
1	04	01
2	03	02
3	01	ND
Total	08	03
Moyenne	2.66±1,52	1.5±1

ND : non déterminée (perte de liquide).

Nous avons remarqué que le nombre de structures récoltées à partir des cornes droites est plus élevé par rapport à celui récoltés des cornes gauches (08 vs 03) .Le nombre moyen des structures récoltées pour la corne droite et gauche est respectivement de (2.66±1,52) et (1.5±1) .

3-Taux de fécondité :

Les résultats de fécondation sont reportés dans le tableau ci-dessous:

Tableau11 : taux de fécondité

Brebis	Structures récoltées		Taux de fécondité
	embryons	ovocytes	
1	05	00	100%
2	04	01	80%
3	01	00	100%
Moyenne	3.33±2,08	0.33	93.33%

Les résultats du tableau montrent que le taux de fécondité moyen pour l'ensemble des brebis est de 93.33%.

II-2-2) Stade de développement et qualité des structures récoltées :

Le tableau 12 et photos n°21, 22,23, présentent les résultats de classification des embryons selon leur qualité :

Tableau 12: Classification des embryons selon leur qualité.

Brebis	Nombre de structures récoltées	Embryons			
		Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
1	05	03(M)	01 (M)	00	01 (NF)
2	05	02 (M)	01 (M)	02(M)	00
3	01	00	01	00	00
Total	11	05	03	00	01
Moyenne	3.66±2,30	1,66±1,52	01±1	0.66±1.15	0.33±0.57

(M) Morula ; (NF) Œuf non fécondé.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que le nombre moyen des embryons de classe 1 et 2 est plus élevé, il est respectivement de $1,66 \pm 1,52$ et 01 ± 1 . Le nombre moyen d'embryons transférables est de $4 \pm 1,41$.

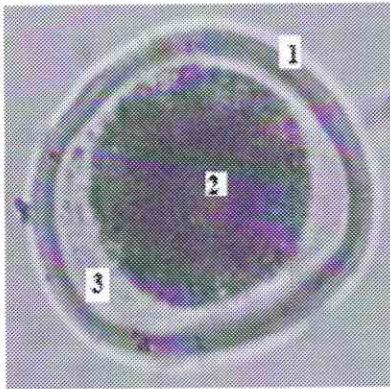


Photo 21: Œuf non fécondé

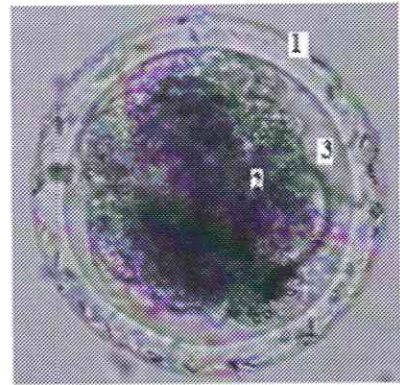


Photo 22: Morula (classe I)

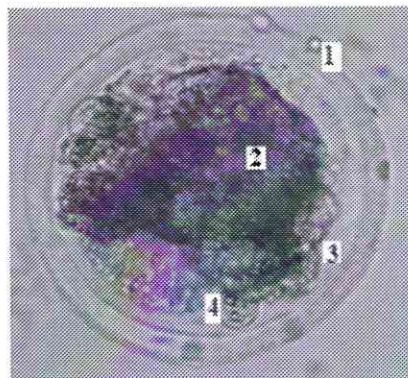


Photo 23: Morula (classe III)

(1) Zone pellucide ; (2) chromatine condensé; (3) espace prévitellin; (4) blastomères détachés.

Le tableau ci-dessous illustre le nombre et le taux d'embryons transférables

Tableau 13: nombre et taux d'embryons transférables

Embryons	Nombre	Taux (%)
Récoltés	11	52,38
Classe I	05	45,45
Classe II	03	27,27
Transférable	08	72,72

Nous avons constaté que le taux des embryons transférables est de 72,72% dont 45,45% de classe I et 27,27 % de classe II.

II-3) Résultats du transfert :

A-Détermination du taux de gestation

Les résultats du diagnostique de gestation sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14 : taux de gestation

Brebis	Nombre d'embryons Transférés	Gestation
R1	02	-
R2	02	+
R3	02	-
R4	02	+
Total	08	02
Taux de gestation		50%

Deux (02) receveuses, étaient confirmées gestantes R2, et R4 .Elles ont une gestation gémellaire.

Le taux de gestation est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Taux de gestation (\%)} = \frac{\text{No.de femelles gestantes}}{\text{No.de femelles receveuses}} \times 100$$

Les résultats du dénombrement des fœtus après l'examen échographique sont résumés dans le tableau ci dessous :

Tableau15 : taux de viabilité des embryons transférés

Brebis	Nombre d'embryons transférés	Nombre de foetus
R1	02	00
R2	02	02
R3	02	00
R4	02	02
Total	08	04

Les résultats obtenus montrent qu'il y'a (04) embryons viables sur (08) embryons transférés ce qui donne un taux de viabilité de 50%.

Les images échographiques obtenues à 40 jours de gestation sont présentées ci-dessous :

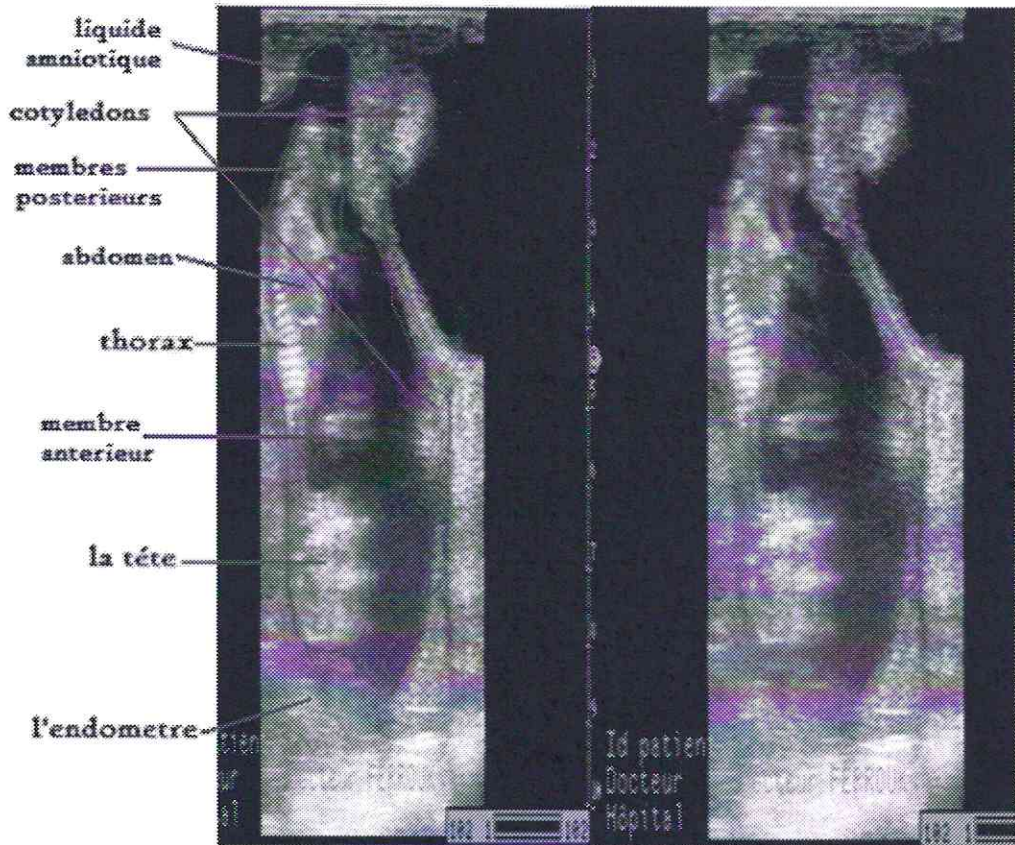


Photo24: image échographique à 40 jours de gestation chez la brebis (R2)

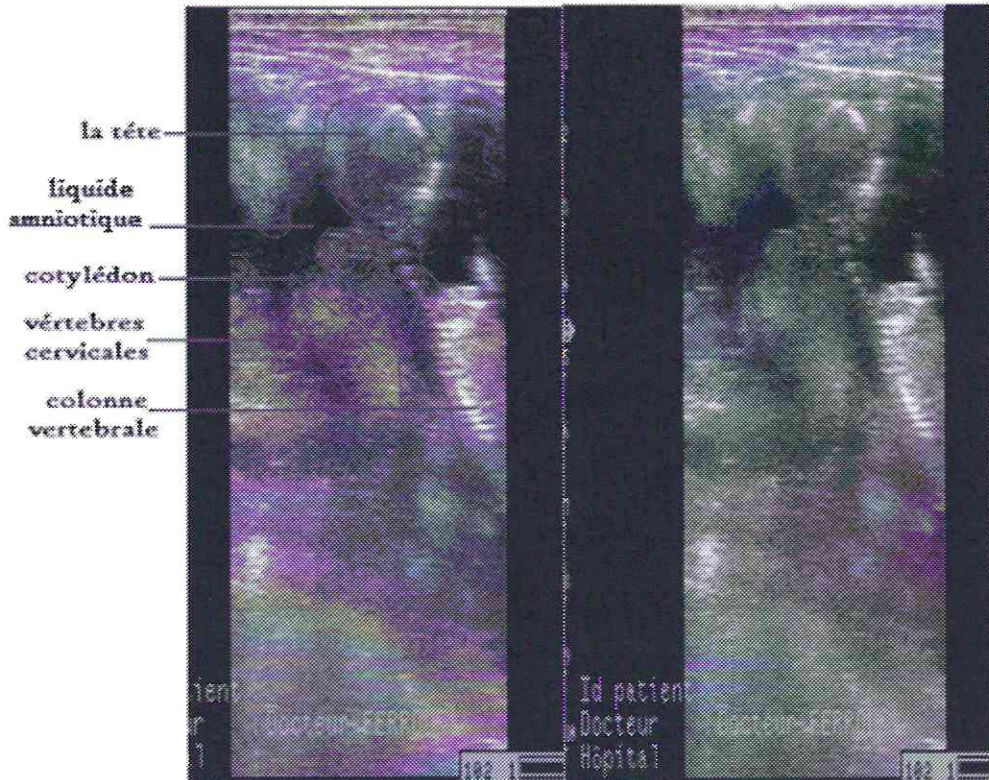


Photo 25: image échographique à 40 jours de gestation chez la brebis (R4)

DISCUSSION

D) Evaluation de la réponse ovarienne suite au traitement de synchronisation/ super ovulation :

A) Expression des chaleurs :

1-Chez les donneuses :

Les résultats relatifs à la détection des chaleurs révèlent que toutes les donneuses soit un taux de 100% ont manifestés des chaleurs 24 h après le retrait de l'éponge vaginale avec une moyenne d'appariation de 28 ± 4 h.

Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par Simonetti et al, (2007) qui affirment que chez les brebis Corriedale, l'œstrus peut apparaître dans un délai de 20h avec un traitement cocktail associant la FSHp et l'eCG,

En revanche, elles sont tardives par rapport aux résultats de Watanabe et al, (1998) qui ont observés un début d'œstrus dans un délai de 13h après une injection de 20 mg de FSH combiné à 500UI d'eCG.

Dans notre étude, les œstrus ont durés en moyenne 24 ± 4 h. En effet, cette durée est identique à celle décrite dans la littérature, qui varie de 24 à 30h (Kolb, 1975). Les mêmes observations ont été rapportés par Jose Herrera (2008), ou la durée des chaleurs est en moyenne 24h chez les brebis Pelibuey.

Aussi, selon Brebion et Baril (1993), environ 85% des brebis de race Lacaune, traitées avec 20 mg de pFSH, viennent en œstrus entre 16 et 28 heures après le retrait de l'éponge.

Cependant, chez certaines races la durée des chaleurs est plus longue. Selon, Wright et al (1976), la durée des chaleurs chez les brebis de race Columbia traitées avec de la FSH combiné à la LH pure, c'est allongé jusqu'à 34,4h.

2-Chez les receveuses :

Le taux de synchronisation obtenu après induction/synchronisation de l'œstrus en utilisant 500UI de PMSG chez les receveuses est de 100%. Le début d'œstrus est détecté en moyenne à $32\pm 4,72$ h, alors que la durée des œstrus est en moyenne 30.75 ± 75 h.

Notre résultat est comparable à celui rapporté par Akoz et al, (2005) chez les brebis de race Akkaraman Cross Bread, qui après utilisation d'une dose de 700UI de PMSG, obtiennent un taux de 93.3%.

En effet ,l'injection intramusculaire de la gonadotropine « PMSG » à la fin du traitement progestatif augmente le pourcentage des femelles en œstrus (Cognie et al. 1970). Selon Mauer et al (1972); Cognie et Pelletier, (1976), Une proportion élevée de brebis vient en œstrus durant un intervalle de temps entre 24-72 heures après l'arrêt du traitement progestatif .De plus, d'après COGNIE et al (1970) l'intervalle arrêt du traitement progestatif - apparition de l'œstrus est en moyenne de 32,7 avec des doses qui varient entre 400 et 800 UI.

Il est à signaler, qu'on a noté une parfaite synchronisation des chaleurs entre les receveuses et les donneuses (28 ± 4 h Vs $32 \pm 4,72$ h). En effet, selon Baril (1993) l'écart de synchronisation toléré est (± 24 h) pour un transfert d'embryons âgés de 6 à 8 jours.

B – Nombre d'ovulation (corps jaunes) :

1-Chez les donneuses :

Nos résultats montrent que le nombre moyen de corps jaune chez les donneuses est de 7 ± 1 CJ.

Il apparait que notre résultats est proche de ceux rapportés par Armstrong et Evans (1983) et Giovanni et al, (2001) qui après utilisation d'un traitement a base de FSHp rapportent une réponse ovulatoire de $8.2 \pm 2,0$ et $8,05 \pm 3,8$ chez les brebis de race Sarda et Romney Marsh respectivement.

Nos résultats sont légèrement supérieurs de ceux rapportés par Simonetti et al, (2007) qui après un traitement a base de FSH ovine rapportent une réponse ovulatoire de 6.2 ± 1.1 chez les brebis de race Corriedale.

Cependant, la réponse ovulatoire avec la dose de 16 mg de FSHp est nettement faible par rapport à celle rapporté par Cognie et Baril (1986) ; Brebion et al (1990) ; Rexroad et Powell (1991) qui est respectivement de 13.2 ; 11 ; $12,1 \pm 2,3$ Corps jaunes.

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

En effet, des doses élevés de FSHp peuvent données une meilleure réponse ovulatoire. Anna et al, (2007) rapportent que l'utilisation de 24 UI de pFSH chez les brebis de Targhee croisées avec Rombouillet permet une réponse optimale de 16.2 CJ. Ainsi, Selon, Sam et al, (2008), une stimulation ovarienne avec une dose de 33mgFSHp chez la brebis de race Rombouillet permet une réponse de 27 CJ.

En revanche, Torres et al, (1984) rapportent que les brebis prolifiques Romanov x Préalpes présentent une meilleure réponse avec une dose de 16 mg ($12 \pm 1,5$), et des résultats médiocre avec des doses excessives (20 mg).

Pour l'utilisation de la FSH ovine, (Simonetti et al, 2007) ainsi que (Forcada et al, 2000) ont prouvés que la différence était assez importante lorsqu'ils utilisent la même dose de traitement chez deux groupes de brebis d'âge différent, la réponse était de 1.7 CJ pour les brebis âgés de 3-6 ans et de 11.4 pour les brebis âgés de plus de 8 ans.

2-Chez les receveuses :

L'évaluation de la réponse ovulatoire suite au traitement d'induction et de synchronisation des chaleurs avec une dose de PMSG révèle que le nombre moyen de corps jaune par receveuse set de 1 ± 1 .

Notre résultat est comparable à celui reporté par Evans et Robinson (1980) qui donnent un taux de 1.2 CJ avec une dose de 200 UI. Selon ces mêmes auteurs la PMSG augmente le taux d'ovulation. De plus, il a été démontré une interaction significative, entre la PMSG et la race pour le taux d'ovulation (Laster et Glimp, 1974).

II) Collecte et transfert des embryons :

1- Taux de récupération :

Nos résultats montrent que le taux de récupération est de 62,5% pour la brebis 1, 71,42 % pour la brebis 2, 16.66 % pour la brebis 3, avec une moyenne de 52.38% pour l'ensemble des brebis.

Une similitude a été notée avec ceux rapportés par Rexroad et Powell (1991), qui rapportent un taux de récupération de 47.3%. 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 fécondité :

Nos résultats montrent que le taux de fécondité moyen chez les donneuses est de 93.33%. Ce taux est semblable à celui signalé par Cognie et al (2003) et Baril et al (2004) qui est de 90 %.

Selon, Baril et al (1991), une saillie réalisée dans de bonnes conditions produit fréquemment plus de 80% d'œufs fécondés. Toutefois, le résultat est fortement tributaire de la condition physiologique des males disponibles notamment, par rapport à la saison. En dehors de la saison de reproduction, le pourcentage d'œufs fécondés peut être diminué (contre saison 75% vs saison 88%) (Baril et Vallet, 1990). A cette période, certains males manifestent une insuffisance de la libido associée à une faible fécondance du sperme.

3- Nombre et qualité des d'embryons :

L'examen microscopique, nous a permis de dénombrer en moyenne 3.66 ± 2.30 structures avec une moyenne de 3.33 ± 2.08 embryons par donneuse. Ainsi, le nombre moyen d'embryons transférables obtenu est de 4 ± 1.41 . Ce qui donne un taux de 72,72% dont 45,45% de classe I et 27,27 % de classe II.

Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par les différents auteurs en termes de structures récoltés. Cependant, le nombre d'embryons transférables est comparable à ceux obtenus par Giovanni et al, (2001) et Gonzalez et al, (2003) qui rapportent un nombre moyen de $4,9 \pm 1,03$ et $4,3 \pm 1,4$ respectivement. Ce nombre est légèrement inférieure de celui rapporté par Forcada et al, (2000), qui obtiennent 5.3 embryons transférables après un traitement avec 176UI d'oFSH chez des brebis de Rasa Aragonesa.

Une nette différence est notée, en comparant nos résultats avec ceux de Bartlewski et al, (2007) qui rapportent que le nombre d'embryons transférables n'est que 2,5 avec un traitement associant de la p FSH et l'eCG

En termes de taux d'embryons transférables, nos résultats sont très satisfaisants par rapport à ceux cités par Cordeiro et al (2003) qui rapportent un taux de (67,4%) d'embryons transférables (classe I et II).

4- Résultats du transfert (Taux de gestation, Taux de viabilité des embryons):

Nos résultats montrent que le taux de gestation et de viabilité de 50%. En effet, ce taux est nettement supérieur à celui obtenu par Naohisa et al (1997) qui rapportent que le taux de gestation est de 38.9% avec des embryons frais. Cependant, le taux de gestation obtenu après transfert chirurgicale et laparoscopique par Vallet et al (1989), Brebion et al (1991) est respectivement de 88% et 80%, ce qui est supérieur au notre.

Des taux de viabilité équivalent (49%) ont été obtenus par Traldi (1995) et Baril et al (2002), mais ça reste insuffisant par rapport au taux espéré. Il faut signaler, que le jugement visuel des embryons donne une estimation très imparfaite de leur viabilité réelle (Brebion et al, 1992).

Des écarts importants des taux de gestation sont observés en fonction des lots de receveuses. Ces écarts sont principalement à mettre en relation avec la conduite d'élevage (Baril, 1991). Aussi, on admet que les taux de gestation après transfert sur les jeunes animaux sont plus élevés que les adultes. Toute fois, les meilleurs résultats de gestation sont obtenus lorsque donneuses et receveuses sont synchrones.

CONCLUSION

Conclusion

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

Une bonne formation théorique et pratique est un préalable indispensable à la constitution d'une équipe de transplantation embryonnaire. La réussite de la transplantation ne doit pas non plus être limitée par un manque de disponibilité en équipement indispensable, matériels et produits.

En effet, notre expérimentation à porter sur l'une des biotechnologies embryonnaires les plus récentes et les plus utilisés dans le monde scientifique, c'est la superovulation, son principe est de multiplier le nombre de descendants d'une brebis de haute valeur génétique.

Il en ressort que les brebis de race Hamra ont moyennement répondu à un traitement de superovulation à base d'une dose de 20 mg et un rapport adéquat de pFSH/pLH.

Les principaux résultats obtenus montrent que le nombre moyen de corps jaunes par brebis est de 7 ± 1 . Le taux de fécondité été très important, il à atteint 93.33%. Ainsi, le taux de récolte est satisfaisant soit 52,38%. Pour les embryons transférables nous avons obtenus un nombre moyen de $4 \pm 1,41$ embryons transférables par donneuse.

Le transfert de ces embryons produits in vivo, chez des receveuses de race mixte a permet d'avoir un taux de gestation de 50%. Ce qui est très satisfaisant pour une expérience faite pour la première fois en Algérie.

2 [La race Hamra est considérée comme la meilleure race à viande en Algérie, l'application sur le terrain de la production et du transfert d'embryons in vivo permettra une sélection accrue de cette race génétiquement intéressante. Par cette technique, il est possible de multiplier la descendance d'un bon couple, male/ femelle de race Hamra en utilisant des receveuses d'autres races.

En fin, d'autres travaux devront être envisagés sur un effectif plus importants afin de déterminée la dose optimale a utilisée chez la race Hamra.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKBAR A.M, NETT T.M, ET NISWENDER G.D; 1974.** Metabolic clearance and secretion rates of gonadotrophin at different stage of the oestrus cycle in ewes. *Endocrinology*,
- ALESSANDRO A.G, MARTEMUCCI G, TAIBI L; 2005.** How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes *Theriogenology* 63,p 1764–1774
- ANAGIMACHI, R KNOBIL E ,NEILL J D; 1994.** the physiology of reproduction-second edition. Reven Press Ltd ;new york, ,189-317.in : Hanzen CH ; Hourtie ,O ;Drin ,P.V .2000. Le developpement folliculaire chez la vache: I .Aspects morphologiques et cinetiqueq .Aun.Med .Vet .2000, 144,223-235.
- ANNA.T, GRAZUL-BILSKA, JAMES, KIRSCH, JERZY, BILSKI, KIM, KRAFT; 2007.** Superovulation in sheep: number and weight of corpora lutea and serum progesterone. Department of animal science, North Dakota state university, USA.
- ANONYME1:** les population ovines Algérienne, 2007. www.GREDAAL.com
- ARENDT J. 1988.** Role of the pineal gland in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Reviews on Reproductive Biology* 8: 266-320.
- ARMSTRONG DT, EVANS G; 1983.** Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*.19.p31-42.
- ARMSTRONG.DT, OPAWSQULAM; 1986.** Biological characterization of a pituitary FSH preparation with reduced LH activity.
- BALDASSARRE H, KARATZHAS C.N; 2004.** Advanced assisted reproduction technologie (ART) in goats .*Animal Reproduction Science*.
- BARIL G, CASAMITJANA P, PERRIN J, VALLET JC ; 1989.** Embryo production,freezing and transfer in Angora,Alpine and Saanen goats.*Zuchthgienne (Berl)* 24,101-115.
- BARIL et BREBION ; 1992 :** transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Annales de zootechnie*.
- BARIL G, CHEMINEAU P, COGNIE Y, LEBOEUF B, ORGEUR P, VALLET J.P 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, CHEMINEAU P, COGNIE Y; 2001.** Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56, 299-305.
- BARIL.G et VALLET.JC; 1990.** Time of ovulation in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out the breeding season.

BARIL G, COGNIE Y, LEBOEUF B, ORGEUR P, VALLET J.P ;1988. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. In 4^e Colloque Scientifique, AETE, LYON; 67-93

BARTELWSKI PM, Alexander BD, King WA; 2007. ovarien and endocrine determinants of superovulatory responses in anoestrus ewes, department of biomedical sciences, university of de Guelph, Canada.

BECKERS.JF, CLOSSET JF, MAGHIN-ROGISTER G, HENNEN G; 1977.bovin follitropin, isolation and characterization of the native hormone and its α and β subunits.

BERTHELOT ; 2002. Le Grand Livre des Prostaglandines.

BESENFELDER U, MÖBLAHER G, BREM G, 1999. Oocyte collection. *Reprod. Dom. Anim.*, Suppl,p 38-44.

BINDON, B.M., PIPER, L.R., 1982. Physiological basis of ovarian response to PMSG in sheep and cattle. In: Shelton, J.N.Trounson, A.O., Moore, N.W., James, J.W. (Eds.), *Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats*. Australian Society for Reproductive Biology, Canberra, pp. 1-5.

BISHOP M.D, HAWKINS G.A, KEEFER C.L, 1995. Use of DNA markers in animal selection. *Theriogenology*, 43, 61-70.

BONDURANT RH, ANDERSON GB, BOLAND MP, CUPPS PT, HUGHES MA; 1982. Preliminary studies on bovine embryo survivalf short-term storage at 4°C. *Theriogenology*, , 17, 223-230.

BONNE G ; 2005 .Reproduction des animaux d'élevage.

BONO.G, CAROLI F, TAMANINI C, ABRATEL L; 1983. Progesterone, oestrogen, LH, FSH, and PRL concentrations in plasma during the oestrus cycle in goat.

BOUKHLIQ R, 2002. Cours en ligne sur la reproduction ovine. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, département de reproduction animale.

BREBION P, COGNIE Y; 1989. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agoniste preatement.

BREBION.P, BECKERS JF, GUERIN Y, BOOMAROV; 1990. High performance of BooroolaxRomanov ewes as permanent embryo donors. In colloque INRA, major genes for reproduction in sheep.

BREBION.P, BARIL G, COGNIE Y, VALLET JC ; 1991. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. INRA physiologie de la reproduction.

BROW -TAL, ET YOSSEFI, 1997 .Stodies in vivo and in vitro on the initiation of follicle grouthin the bovine avary .*J reprod Fertil* 109,165-71.

CAHIL LP, SAUMANDE J, THIMONIER J; 1981. Survival of multiples pregnancies induced in the ewe following treatment with pituitary gonadotrophins.

CAHILL LP, MAULEON P; 1980.Influence of season,cycle and breed on follicular growth rates in sheep . *J reprod fertil*, 58,321-328.

CAMP J.C, WIDTED, HOWARD PK, STUART; 1983. Ovarian activity during normal and abnormal length oestrus cycle in the goats.

CARATY A, EVANS M, THEIRY J.C, MALPAX B, CHEMINEAU P ; 1997. Contrôle central de la sécrétion des gonadotrophines par les neurones à GnRH ; 225-239p.

CASAMITJANA; 1991. technique de production, de conservation et transfert d'embryons chez les petits ruminants. Physiologie de reproduction, INRA.

CHELLIG.R ; 1992. les races ovines Algeriennes, C.N.P.A.

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

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 le transfert embryonnaire.

CLEMENT M ; 1981. Production et transfert d'embryons in vivo chez la chèvre de la race BOER. 63p

CLEMENT ; 2006 : production et transfert d'embryon in vivo chez la chèvre de race Boer, thèse de doctorat vétérinaire, école national vétérinaire d'Alfort.

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

COGNIE.Y et PELLETIER J; 1976. Preovulatory LH release and ovulation dry and lactating ewes after progestagen and PMSG treatment during the seasonal anoestrus. Ann.Biol.Bioph.16, p529-536.

COGNIE.Y; 1984. Comparaison de deux traitements de superovulation chez la brebis.

COGNIE Y, CHUPIN D, SAUMANDE J; 1986. The effect of modifying the FSH/LH ration during the superovulatory treatment in ewes. Theriogenology.

COGNIÉ Y, BENOIT F, POULIN N, KHATIR H, DRIANCOURT M.-A, 1998. Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. J. Reprod. Fert., 112, 379-386.

COGNIE Y; 1999 .State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology.

COGNIÉ Y, POULIN N, BARIL G, GUIGNOT F, BECKERS J.F, MERMILLOD P, 2001. Embryo survival after transfer of in vitro and in vivo produced goat embryos. 17th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, 110.

COGNIE ET BARIL ; 2002. physiologie de la reproduction et des comportements. INRA Prod.Anim, 15(3) ,199-207.

- COGNIE Y, BARIL G ; 2003** : Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre. INRA Productions Animales, 15, 199-207.
- COLLEAU J-J, HEYMAN Y, RENARD J-P ; 1998**. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. INRA Productions Animales, 11, 41-56.
- CORDEIRO MF, LIMA-VERDE JB, LOPES-JUNIOR ES, TEIXEIRA IA. 2003**. Embryo recovery rate in Santa ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. Laboratory of physiology and control of reproduction, Faculty of veterinary, State university of Ceara, Avenu Paranjana 1700, Fortaleza CE 60740-000.
- CORTEEL J.M; 1968**. Reproduction dans l'espèce caprine ; Revue d'élevage caprin. QA1
- CROCKER K, DUNSTAN E, REEVE J, WILLIAMS A, MCPHEE S. AYTON B, WAGG M, POLLARD T, PARKER J, FOOTE M, RITAR A ET STAPLES L. 1987**. Field studies of the use of melatonin implants.
- CROZET N, 1997**. In vitro generation of one cell embryos in sheep and goat. In : L-M. Houdebine (ed), Transgenic Animals: Generation and Use, 45-50. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- DEL CAMPO C.H, SALAS .F, GATICA .R, DEL CAMPO M.R ;1985**. Different methods of superovulation using Horse Anterior Pituitary Extract (HAP) in goats during breeding season ;
- DOMINIKO T, MITALIPOVA M, HALEYB; 1999**. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. Biol.Reprod.
- DRIANCOURT.MA, PHILIPON P, LOCATELLI A, JAQUES E; 1988**. Are differences in FSH concentrations involved in the control of ovulation rate in Romanov and Ile de France ewes? du Quebec, , 14, 55-59.
- DRIANCOURT MA; 2001**. Turnover of large ovarian follicles: when, how, why. Theriogenology.
- EVANS, G, ROBINSON, T.J, 1980**. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. J. Agric. Sci. 94, 69-88.
- EVANS, G., ARMSTRONG, D.T., 1983**. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. J. Reprod. Fertil. 70, 47-53.
- FIENI,(F) ,BUGGIN ,TAINTURIER, BACH-LIJOUR ,BRUYAS,ET DAUBIE;1991**. Study of the best hour for intra uterine insemination in young dairy goats after hormonal induction of oestrus .Theriogenology, ,35(1),200.
- FOLCH J, RAMÒN J.P, COCERO M.J, ALABART J.L, BECKERS J.F, 2001**. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. Theriogenology, 55, 1777-1785.
- FOLCH.J, COCERO MJ, FERNADEZ-ARIAS A, ALABART JL; 1991**. Embryo recovery in the oviduct improves efficiency of superovulation in the ewe.

- 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 produccion animal y ciencia de los alimentos Universidad de Zaragoza Spain.
- GAYRARD.C ; 2002.** Unité Associée INRA de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- 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 vitrification than those derived from FSH treatment .Department of Animal Biology, University of Sassari ,07100 Sassari, Italy.
- GONZALEZ .C ; 1984.** Repro des ruminants en zone tropicale. Colloque de l'INRA.
- GONZÁLEZ-BULNES A, SANTIAGO-MORENO J, COCERO MJ, SOUZA CJH, GROOME;P; GARCÍA-GARCÍA ;RM, LÓPEZ-SEBASTIÁN A, BAIRD DT; 1999.** Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. J Reprod Fertil.
- GONZÁLEZ-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 response to superovulatory FSH treatments in ewes. Dept de reproduction animal, INRA, AVDA.PUERTA de HIERRO s/n, 28040-Madrid.
- GUIGNOT F ; 2005.** Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Productions Animales, 18, 27-35.
- HAMAIDI.MS ; 2007.** Étude de la folliculogénèse chez les brebis de race Rumbi. Thèse de doctorat en science biologique.
- HANZEN.2005.** La production d'embryons in vivo. 2^{ème} doctorat.
- HFEZESE; 1962.** Reproduction in Fram Animals, Philadelphia: Lea and Febiger, 456p
- HOUEBINE L.M, 1998.** La transgenèse animale et ses applications. INRA Prod. Anim.
- HUNTER, G.L; 1955.** Inter-bred ovum transfer in sheep. J.Agr.Sci. 46:143.
- HYTELL, P. GREVE, T, AND CALLENCE, H; 1989.** Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilisation in cattle –J .Reprod .Fertil .Suppl.38 ,35-47.
- IETS; 1998.** International Embryo Transfer Society.
- JABBOUR, H.N, EVANS, G, 1991.** Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. Anim. Reprod. Sci. 26, 93–106.
- JOSÉ HERRERA-CAMACHOA, RICARDO A, KU-VERAB J, GARY L. WILLIAMSC, JORGE A, QUINTAL-FRANCOD ; 2008.** Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. Téc Pecu Méx 2008;46(2):107-117
- KENNAWAY D J, GILMORE T A ET SEAMARK R F; 1982.** Effect of melatonin feeding on serum prolactin levels and the onset of seasonal oestrus cyclicity in sheep. Endocrinology 110: 1766-1772.

- KHIATI B; 1999.** Etude des possibilités d'évaluation des performances reproductives chez les brebis de race Rumbi. These magistère, centre universitaire de Tiaret.
- KOCHHAR H.S, BUCKRELL B.C, POLLARD J.W, KING W.A, 2000.** Production of sexed lambs after biopsy of ovine blastocyst produced in vitro. *Can. Vet. J.*, 41,398-400.
- KOLB L ; 1975.** Physiologie de la reproduction chez les mammifères domestiques.
- KRAEMER DC; 1989.** Embryo collection and transfer in small ruminants.
- LASTER DB et GLIMP HA, 1974.** Influence of breed on response to exogenous hormones in oestrus and anoestrus ewes. *J.Anim.Sci*, 39, 1129-1135.
- LEUFEUVRE.A; 1992.** Synchronisation des chaleurs et superovulation chez la chèvre. Comparaison de 2 prostaglandines, l'etiproston et le cloprosténol.
- 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 pre-treatment with a single short-acting dose of GnRH antagonist. Departamento de reproducción animal INRA; Madrid.
- LYNGSET.O; 1964.** Physiology of reproduction in goats.
- MAP, 2004 :** ministère de l'agriculture et de la pêche (direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information).
- MAUER RE, REVENAL P, JOHNSON ES, MOYER RH, HIRIATA A, WHITE W ; 1972.** levels of luteinizing hormone in sera of ewes near the time of oestrus as determined by radioimmunoassay. *J.Anim.Sci*, 34, p88-92.
- MAXWELL WMC, BULTER LG, WILSON HR; 1984.** intra uterin insemination of ewes with frozen semen. *J AGRIC SCI (CAMB)* 102, 233-235.
- MEHMET AKÖZ, BÜLENT BÜLBÜL1, MEHMET BOZKURT ATAMANE et SÜLEYMAN DERE ; 2005.** Induction of multiples births in Akkaraman Cross-Bred sheep synchronized with short duration and different doses of progesterone treatment combined with PMSG outside the breeding season. Department of Gynaecology and Obstetrics. Faculty of Veterinary Medicine, University of Selcuk, 42075, Konya, Turkey.
- MERMILLOD P, TRALDI A.L, BARIL G, BECKERS J.F, MASSIP A, COGNIÉ Y, 1999.** A vitrification Method for direct transfer of sheep embryos. 15^e Colloque Scientifique de l'AETE, Lyon.
- MURPHUY.B.D et al; 1984.** viability in gonadotrophins as a factor in the superovulatory response.
- 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.
- NUTI L.C, MINHAS B, S, BAKER W.C, CAPEHART J.S; 1987.** Marrack.P: superovulation and recovery zygotes from Nubian and Alpine dairy goats.

OTT ; 1980. Theriogenology, 13, 341-345p.

ORTAVANT R., BOCQUIER F., PELLETIER J., RAVAUT J.P., THIMONIER J., VOLLAND-NAIL P., 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. Aust. J. Biol., 41, 69-85.

ISSIF O ; 2001. Gestion de la reproduction dans un élevage ovin. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II. Département de Reproduction et d'Obstétrique Vétérinaire.

PEREIRA RJ, SOHNREY B, HOLZ W; 1998: Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandine F₂α and oxytocin : Journal of animal science,76,360-363.

PICARD L ; 1984. Principes de cryobiologie et congélation d'embryons. Médecine Vétérinaire du Quebec, , 14, 55-59.

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

RAYMOND GILLES ; 2006. Physiologie Animale.

REMY B, BARIL G, VALLET JC, DUFOUR R, CHOUVET C, SAUMANDE J, CHUPIN D, BECKERS JF; 1992. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? Theriogenology 36,389-399

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

RIENTORT ; 1995.Abrége .Physiologie Animal 2: les grandes fonctions.

ROBERTSON; I. NELSON RE, 1998. International Embryo Transfer Society guide.Chapter 9. Certification and identification of the embryo., 3^{ème} édition. Savoy, IL.: IETS,170p.

SAM.E, CUR, LYNN NIX et FRANK.A, HUDSON; 2008. Lambing rate as influenced by hormone-induced superovulation in ewes prior to mating. Texas Technological College, Lubbock.American society of animal science.

SAUMANDE J., 1995. La production d'embryons chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? INRA Prod. Anim., 8, 275-284.

SHELTON I.M, MOORE MW; 1971.The response of the ewe to pregnant mares serum and to horsen pituitary extract. J. Reprocl Fertil. 14:175.

SIMONETTI.LF. FORCARDA O.E; RIVERA N,CAROU R.H; ALBERIO J, A.ABECIA; I.PALACIN; 2007: Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes;Animal production.school of agrarian sciences ,National University of Lomas de Zamora .Buenos Aires,Argentine;

SMITH; 1984.Dose effect of follicle stimulating hormone for superovulation of crossed Targhee ewes.

- SOLTNER D, 2004.** La reproduction chez les mammifères d'élevages. *Zootecnie générale*.
- TERVIT.HR, GOOLD.PG; 1984.** Deep-freezing sheep embryos. *Theriogenology*, 21: 268 (abstr).
- TERVIT; 1984.** embryo transfert in Angora and Saanen goats.
- THIBAUT C, ANDRE B, LEVASSEUR M.C ; 1998.** La reproduction des vertèbres.
- THIBAUT.C ET MARIE -CLAIR LEVASSEUR ; 2001.** La reproduction chez les mammifères domestiques et l'homme.
- 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.
- TRALDI AS ; 1995.**superovulação com a gonadotrofina da menaposa human (HCG) e prevenção da regressao prematuras dos corpos luteos em caprinos.Tese apresentada par obtenção do titulo de doutor.universidade de São PauloBrasil, p155.
- VALLET JC, BARIL G; 1989.** Efficiency of laparoscopique embryo Transfer in goats 5^e Colloque Scientifique, Lyon, p186.
- 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.
- WARWICK, B.L. 1934.** Results of mating rams to Angora female goats. *Proc. 27th Annu. Meet.Am. Soc. Anim. Prod.* 225-227.
- WHITELY NC, JACKSON DJ; 2004.**An update on oestrus synchronisation in goats : a minor species .*Journal of animal science*, p270-276.
- WILLADSEN, S.M., C. POLGE, R.E.A. ROWSON, AND R.M. MOOR. 1976.** Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 46:151-154.
- WINTENBERGER-TORRES.S ET SEVELLEC. C ; 1987.**INRA Station de Physiologie Animal.
- WOODRUFF T.K, LYON R.J, HENSEN S.E, RICE G.C, ET MATHER J.P; 1990.**Inibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis.*Endocrinologie*, 1273p.
- YOUNGQUIST R.S; 1997.** Current Therapy in Large Animal Theriogenology ,