



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Le transfert d'embryon chez la brebis: expérimentation de diverses techniques

Lovato, Anne-Laure

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Le transfert d'embryon chez la brebis :
Expérimentation de diverses techniques

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licenciée en Sciences biologiques

Lovato Anne-Laure

Année académique 2002-2003

Facultés Universités Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 –5000 NAMUR
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20
E-mail : joëlle, jonet fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Le transfert d'embryon chez la brebis : Expérimentation de diverses techniques

LOVATO Anne-Laure

Résumé

La transplantation embryonnaire est une méthode qui consiste à transférer des embryons générés par une brebis donneuse, choisie pour son potentiel génétique élevé, chez des femelles receveuses.

Cette technique est déjà bien maîtrisée chez les bovins, mais pose encore de nombreux problèmes chez les ovins.

L'objectif de ce travail est de comparer deux techniques de superovulation en vue de déterminer leur efficacité et de tester différentes techniques d'inséminations artificielles, de collectes d'embryons ainsi que leur vitrification.

Les deux traitements (Buséréline, agoniste de la GnRH; Tévérélix, antagoniste de la GnRH.) utilisés pour la superovulation sont basés sur l'inhibition de l'hypophyse afin d'empêcher les moyens et gros follicules de se développer et de recruter un maximum de petits follicules. Ensuite, ceux-ci subiront une stimulation hormonale exogène en vue d'obtenir un maximum d'ovocytes susceptibles d'engendrer des embryons transférables.

Les paramètres utilisés sont la réponse folliculaire, le taux d'ovulation, le taux de récupération des embryons et l'évolution des hormones dans le sang.

Les résultats obtenus sont encourageant. Les deux techniques inhibent efficacement les gros follicules, la population des petits follicules semble être augmentée mais d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Le taux d'ovulation est très faible. En effet, il semble que ces traitements hormonaux engendrent un blocage au niveau des ovaires. Le traitement de superovulation ne s'est pas montré efficace.

Au niveau des taux de FSH et de LH, cette étude montre que l'agoniste Buséréline et l'antagoniste Tévérélix ont uniquement un effet significatif sur les taux de FSH.

Mémoire de licence en Sciences biologie humaine

Année académique 2002-2003

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J-L Bister

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur R. Paquay de m'avoir accepté dans son département afin de réaliser mon travail de fin d'études.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Docteur J.L Bister pour sa patience et ses conseils éclairés tout au long de ce travail sans qui ce mémoire n'aurait pu être réalisé.

Merci à toute l'équipe qui a réalisé les différentes manipulations et, en particulier Marie-Antoinette et Fabienne.

Sans oublier l'équipe de Faulx-les-Tombes qui entretient continuellement les brebis et qui a grandement participé à l'application des différents traitements durant 6 semaines.

Je tiens également à remercier Bouchahib pour son aide précieuse pour les analyses statistiques et l'ensemble des manipulations.

Enfin, je remercie ma collègue et meilleure amie Orane, qui, par sa motivation au travail, m'a grandement stimulée à aller jusqu'au bout de ce mémoire.

Il va sans dire que je remercie toutes les personnes de mon entourage qui m'ont soutenu tout au long de ces semaines.

Table des matières

Première partie

Chapitre I : L'appareil génital de la brebis

I.1 L'ovaire

I.2 L'ovogenèse et la folliculogénèse

I.2.1 L'évolution temporelle

I.2.2 L'évolution morphologique

I.2.2.1 Folliculogénèse primordiale et croissance folliculaire basale

I.2.2.2 Folliculogénèse terminale

I.2.3 Le cycle sexuel de la brebis

Chapitre II : Endocrinologie de la reproduction

II.1 Les organes de la régulation hormonale

II.2 Les hormones hypophyso hypophysaires

2.1 Le GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone)

2.2 La FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone)

II.3 Les hormones stéroïdiennes

3.1 Les oestrogènes

3.2 La progestérone

3.3 Les autres hormones

Chapitre III : La superovulation et le transfert d'embryons

III.1 Principe

III.2 Avantages

III.3 Choix et induction d'une superovulation chez la brebis donneuse

1.1 Le choix des brebis donneuses

1.2 Traitements hormonaux des brebis donneuses

3.2.1 Le contrôle de l'oestrus

3.2.2 La stimulation ovarienne

III.4 L'insémination des brebis donneuses

4.1 La collecte du sperme

4.2 L'insémination

4.2.1 La saillie naturelle

4.2.2 L'insémination artificielle

4.3 La collecte d'embryons

4.3.1 La collecte chirurgicale

4.3.2 La collecte par laparoscopie

- 4.4 Le choix des embryons
- 4.5 La conservation des embryons
 - 4.5.1 La conservation à court terme
 - 4.5.2 La conservation à long terme

III.5 La préparation des receveuses

III.6 Le transfert d'embryons

Deuxième partie : matériel et méthodes

Première expérience

I. Les animaux

- 1. les donneuses
- 2. Les receveuses

II. Plan expérimental

- 1. Distribution en 3 groupes
- 2. Traitements hormonaux des donneuses
 - A. Le groupe contrôle
 - B. Le groupe Buséreline
 - C. Le groupe Tévérélix
- 3. Traitement hormonal des receveuses

III. Techniques appliquées aux animaux

- 1. Observation des ovaires
- 2. L'insémination
 - 2.1 La récolte de sperme
 - 2.2 L'insémination intra-utérine
- 3. La collecte des embryons
 - 3.1 La collecte chirurgicale
 - 3.2 la collecte par laparoscopie
- 4. Vitriification des embryons
- 5. transfert d'embryons
- 6. Diagnostic de gestation
- 7. Dosage hormonaux
 - 7.1 La prise de sang
 - 7.2 Ledosage
 - 7.3 Protocole du dosage pour la FSH
 - 7.4 Protocole du dosage pour la LH

Deuxième expérience

- 1. Objectif
- 2. Méthode
- 3. Le matériel
- 4. Traitements

Troisième partie : Analyses et discussions
--

Première expérience : Essai de superovulation

1.Introduction

2 Résultats du blocage de l'hypophyse

3.Effet de la stimulation ovarienne

3.1 Résultats pour les différents traitements

3.1.1 Le groupe contrôle

3.1.2 Le groupe Buséreline

3.1.3 Le groupe Tévérélix

4.Résultats du taux d'ovulation

4.1 Le groupe contrôle

4.2 Le groupe Buséreline

4.3 Le groupe Tévérélix

5.Résultats du nombre d'embryons récoltés

5.1 Le groupe contrôle

5.2 Le groupe Buséreline

5.3 Le groupe Tévérélix

6.Résultat du transfert d'embryons

7.Analyse des hormones dans le sang

7.1 Dosage de la LH pour le groupe Buséreline

7.1.1 Analyse des variations des taux de LH du jour 1 au jour 14

7.1.2 Analyse du jour 15 au jour 18

7.2 Analyse des variations de la FSH du jour 1 au jour 18

7.3 Analyse des taux de LH pour le groupe tévérelix

7.3.1 Variations des taux de LH du jour 0 au jour 18

7.3.2 Variations des taux de LH du jour 18 au jour 25

7.4 Dosage de la FSH pour le groupe Tévérélix

Deuxième expérience : culture du follicules in vitro

1.Introduction

2.Résultats des taux d'E₂

3.Résultats des taux de P₄

Quatrième partie : Discussions, conclusions et perspectives

I. Discussions

1 Traitement à base de Buséreline

1.1 Fluctuations des hormones dans le sang

2 Traitement à base de Tévérélix

3. Effets des traitements sur les follicules

- 3.1 Efficacité de la Buséreline
- 3.2 Efficacité du Tévérélix
- 4. Effet de la stimulation FSH-LH exogène
- 5. Le taux d'ovulation
- 6. Le taux de récupération
- 7. Comparaison entre le groupe Buséreline et le groupe Tévérélix

II. Conclusions

- 1. Test de la technique
 - 1.1 Inhibition par un agoniste en excès (Buséreline)
 - 1.2 Inhibition par un antagoniste (Tévérélix)
 - 1.3 Comparaison des 2 techniques
- 2. Test des résultats des dosages hormonaux
 - 2.1 Le taux de LH
 - 2.2 Le taux de FSH

Liste des abréviations

CFB : Croissance folliculaire basale
CFT : Folliculogenèse Terminale
CISO : centre d'Insémination et de sélection Ovine
CPA : CryoProtectine Agents
DMSO :
E₂ : Oestradiol 17-β
ECG : Equine Chorionic Gonadotrophin/Gonadotrophine chorionique équine
ECM :Embryo Culture Medium
FSH : Follicle Stimulating Hormone
GF : Gros Follicule
GH : Growth Hormone
GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone
hCG : Hormone gonadotrope Chorionique Humaine
hMG : Hormone gonadotrope Ménopausale Humaine
INH : Inhibine
LH :Luteinizing Hormone
MF : Moyen Follicule
P₄ :Progestérone
PBS :
PF : petit Follicule
PGF 2α : Prostaglandinr
PMSG :Gonadotrophine sérique de jument gestante
TCM :
T.O : Taux d'Ovulation
U.I : Unité

Introduction

En 1933, le premier transfert d'embryon fut réalisé par Warwick et Berry (Brebion et al, 1992).

Le principe de cette technique consiste à transférer, avant l'implantation, les embryons produits par une femelle donneuse choisie pour son haut potentiel génétique chez des femelles receveuses, sans grande valeur génétique, mais possédant des qualités maternelles.

Ces manipulations permettent un progrès génétique supplémentaire non négligeable et peuvent servir à des objectifs sanitaires et commerciaux.

Le transport de gènes par la voie du transfert d'embryons est plus économique que le déplacement d'animaux vivants et surtout est plus sécurisant sur le plan sanitaire.

En sélectionnant les caractères favorables maternels mais aussi paternels, la technique permet la sélection de races à haute valeur génétique.

Les races en voie d'extinction peuvent être sauvegardés par cette technique qui permet le transfert d'embryons de la race en péril sur des animaux d'une autre race mais de la même espèce.

Le transfert d'embryons est déjà bien maîtrisé et a déjà fait ses preuves dans le secteur bovin.

Chez les ovins, de nombreuses étapes du transfert posent encore des problèmes.

En raison de sa complexité et de son coût, le transfert d'embryon ne saurait prétendre pour le moment remplacer l'insémination artificielle comme technique de reproduction de routine.

La production d'un nombre important d'embryons suppose que les étapes successives de la stimulation ovarienne, de la fécondation, de la récolte des embryons et de la possibilité de répéter plusieurs fois ces opérations, chez la même donneuse soient maîtrisés.

Quant au taux d'ovulation, il peut être augmenté dans les limites physiologiques ou de façon extrême (ce qui est le cas lorsqu'on veut collecter un grand nombre d'embryons). Différentes techniques ont été mises au point, un apport d'énergie sous forme d'aliments chez des femelles faibles physiquement (c'est le flushing), un apport d'hormones gonadostimulantes, d'hormones hypothalamiques ou de mélatonine. Dans le cadre d'une hyperstimulation, on administre fréquemment de la eCG (equine Chorionic Gonadotropin, aussi appelée PMSG c'est-à-dire Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) ou une combinaison de FSH et de LH hautement purifiée.

Depuis un peu plus de 10 ans, quelques laboratoires se sont investis dans de nouvelles techniques de stimulation folliculaire chez les brebis grâce à des hormones gonadotropes exogènes. Cette nouvelle approche de la superovulation introduit l'utilisation de GnRH agoniste ou antagoniste combinés à de la progestérone afin de supprimer les sécrétions d'hormones gonadotropes endogènes et le développement des follicules de 1-2 mm par des hormones gonadotropes exogènes.

Cette technique, par contrôle exogène, devrait permettre une plus grande maîtrise de la réponse ovulatoire et du nombre d'embryons engendrés.

L'objectif de ce mémoire est de mettre au point une technique de superovulation par contrôle exogène. Le but est de comparer l'effet de l'utilisation d'agoniste ou d'antagoniste GnRH au traitement traditionnel (pose d'une éponge de P4) sur le taux d'ovulation.

I.1 L'ovaire

Les ovaires sont des organes pairs situés dans la partie inférieure de la cavité abdominale et doués d'une double fonction : la fonction exocrine gamétogène (ovogenèse) et la fonction endocrine régissant les cycles hormonaux¹. La dimension d'un ovaire varie entre 1 et 3 cm de long pour un poids de 3 à 15 g.

L'ovaire est revêtu d'un épithélium formé de cellules plates ou cubiques sous lesquelles se distinguent deux zones :

-La zone corticale constituée d'un tissu conjonctif, le stroma ovarien qui se densifie sous l'épithélium pour former l'albuginée. C'est dans cette couche que se trouve la majorité des follicules et les corps jaunes.

-La zone médullaire, située au centre de l'ovaire, assure la pénétration et la ramification des nerfs, vaisseaux sanguins et lymphatiques.(figure 1 et 2)

I.2.Ovogenèse et folliculogénèse

La gamétogenèse se déroule en deux phases:

- L'ovogenèse est la période durant laquelle se constitue le stock de cellules germinales et de follicules. Chez la brebis, cette étape se déroule uniquement au cours de la vie fœtale et s'achève environ 1 mois avant la naissance. A ce moment le nombre de follicules primordiaux s'estime au maximum à 400 000.
- La folliculogénèse se définit comme la succession des étapes du développement des follicules. Dès la vie fœtale, elle est initiée et se poursuit sans interruption jusqu'à la mort de la brebis.²

2.1.Evolution morphologique

L'ovaire renferme des follicules à différents stades de développement. On distinguera classiquement, suivant l'évolution de la folliculogénèse, des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires et antraux.

Les follicules primordiaux sont composés d'un ovocyte entouré de quelques cellules folliculaires.

Les follicules primaires correspondent au premier stade du réveil et du développement des follicules; l'ovocyte augmente de volume et les cellules folliculeuses présentent un aspect cubique.

Dans les follicules secondaires, l'ovocyte atteint sa taille maximale et s'entoure de la membrane pellucide qui le sépare d'une granulosa de plusieurs couches de cellules.

Autour de la granulosa, les follicules tertiaires se caractérisent par deux couches de cellules : la thèque interne et la thèque externe qui se différencient à partir des cellules somatiques.

¹ J.Derivaux, F.Ectors.

² Driancourt *et al*.,1991; Leclercq.,1994

Dans le stade suivant, il y a formation au sein de la granulosa d'une cavité, l'antrum, contenant le liquide folliculaire excrété par les cellules granuleuses et la thèque interne. Ceci constitue le stade ultime de la croissance du follicule et est appelé follicule antral ou de De Graaf. Ce sont les follicules les plus volumineux, ils atteignent une taille de 1 à 10 mm.

Le follicule antral peut évoluer en follicule ovulatoire. Celui-ci est caractérisé par une reprise de la méiose de l'ovocyte qui se détache de la granulosa avec son cumulus et flotte dans le liquide folliculaire. Au moment de l'ovulation, le liquide folliculaire se répand dans la cavité péritonéale et l'ovule est capté par le pavillon de l'oviducte. Libéré de l'ovule, le follicule se collabe, est envahi par un petit caillot de sang et évolue en un corps jaune.

Les cellules de la granulosa et de la thèque interne se transforment en cellules lutéiniques, se multiplient et forment le corps jaune.

S'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune entre en régression au bout de 12 à 13 jours. La trace de la présence du corps jaune reste souvent plusieurs mois et porte le nom de corpus albicans.

S'il y a fécondation, le corps jaune est dit gestatif ; il perdure en gardant la même structure et continue à sécréter de la P4³.

2.2. Evolution temporelle

2.2.1. Folliculogénèse primordiale et croissance folliculaire basale

Le stock de follicules primordiaux se constitue durant la vie embryonnaire (300.000 à 400.000 follicules). Le stock diminue progressivement par atresie ou évolution. Le développement folliculaire se déroule en 3 phases :

- la croissance basale
- le développement terminal
- la maturation et l'ovulation

Régulièrement, plusieurs follicules entrent en phase de développement. Certains pourront entamer la phase terminal et d'autres entreront en atresie.

Le développement basal (croissance folliculaire basale ou CFB) dure 5 à 6 mois et permet le passage de stade primordial au stade antral jusqu'à un diamètre de 1 à 2 mm.⁴

Les facteurs initiateurs de la folliculogénèse basale sont à l'heure actuelle encore mal connus. Les gonadotropines ne seraient pas impliquées dans le contrôle du développement basal des follicules.⁵ Cependant, selon des études⁶, l'indépendance stricte de la folliculogénèse basale envers l'axe hypothalamo-hypophysaire ne serait pas encore totalement démontrée. Scaramuzzi⁷ a montré que les follicules préantraux possèdent des récepteurs à la LH sur les cellules de la thèque et des récepteurs à la FSH sur les cellules de la granulosa. Comme les gonadotrophines ne sont que peu ou pas impliquées dans la croissance des follicules préantraux, on suppose que la régulation du développement folliculaire basal est principalement paracrine.

³ Bister.,2002; Derivaux et Ectors.,1994

⁴ Driancourt *et al.*,1991; Leclercq.,1994

⁵ Driancourt *et al.*,1987; Fry *et al.*,1987; Cognié.,1988

⁶ Driancourt *et al.*,1991

⁷ Scaramuzzi *et al.*,1993

La phase initiale serait essentiellement sous la dépendance de facteurs de croissance paracrines, internes à l'ovaire, mais certaines hormones comme la GH (ou l'IGF₁) semblent impliquées.⁸

A la fin de cette croissance, les follicules qui sont au stade antral acquièrent des récepteurs LH et FSH et deviennent sensibles aux gonadotrophines.

2.2.2.Folliculogenèse terminale

La folliculogenèse terminale est constituée de 2 phases: - le recrutement
- la sélection

Le recrutement est le début du développement rapide de plusieurs follicules antraux simultanément qui vont entamer le processus de croissance terminale lors d'une élévation du taux plasmatique de FSH. Cette évolution est assez rapide (5-6 jours)⁹. Au cours du cycle, 3 vagues de croissance bien distinctes peuvent être observées à la surface de l'ovaire¹⁰. Des vagues d'environ 6 jours conduisent un certain nombre de follicules jusqu'au stade du follicule dominant.

Les recrutements ont lieu les jours 0-1, 6-7 et 12-13 du cycle (le jour 0 étant le jour de l'ovulation), périodes qui correspondent à des augmentations de FSH.

Certains de ces follicules vont poursuivre le processus de développement, ils sont appelés follicules dominants. Ils ont un diamètre d'au moins 4 mm et leur chance d'évoluer vers l'atréisie diminue fortement¹¹. Les autres vont, l'un après l'autre évoluer vers l'atréisie. C'est la phase de sélection.

Les follicules dominants sécrètent une grande quantité d'E₂ (hormone qui présente un effet paracrine important et qui stimule la croissance du follicule qui la produit) et induisent l'atréisie des autres follicules par libération d'autres molécules paracrines.

Deux des 3 phases de croissances folliculaires se déroulent pendant la phase d'activité du corps jaune. Les sécrétions d'E₂ ne sont alors pas capables d'induire la décharge de FSH et de LH par rétroaction positive car l'hypothalamus est bloqué par les sécrétions de P₄ du corps jaune. Les 2 premières phases ne permettent donc pas aux follicules dominants d'entrer en phase d'ovulation.

A l'opposé, la troisième vague se déroule après la lutéolyse, période durant laquelle le taux de P₄ est faible. La sécrétion d'E₂ induit la vague de décharge pré-ovulatoire de GnRH et de LH qui déclenche la maturation finale et l'ovulation du ou des follicules dominants.

2.3.Le cycle sexuel de la brebis

Au terme de la phase lutéale, la PGF_{2α} sécrétée par l'utérus, induit chez la femelle non gestante la régression de corps jaune (lutéolyse).

La chute de la concentration de P₄ qui reflète la lutéolyse provoque une diminution de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Plusieurs petits follicules antraux dont le diamètre est de 2 à 3 mm entrent alors en phase de croissance terminale. Seuls 2 à 3 d'entre eux atteignent le stade préovulatoire, les autres subissent l'atréisie folliculaire. Au cours de cette période, la FSH sécrétée par l'hypophyse stimule la croissance folliculaire et engendre une production croissante d'E₂. Cette augmentation d'E₂ induit le comportement de l'oestrus et exerce un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, favorisant la production de GnRH.

⁸ Bister *et al.*, 1994; Perrard *et al.*, 1996

⁹ Noël *et al.*, 1996; Mandiki *et al.*, 1997

¹⁰ Bister *et al.*, 1983

¹¹ Fortune., 1994

L'augmentation de la GnRH engendre une sécrétion accrue de FSH et de LH par l'hypophyse qui forme finalement le pic ovulatoire. L'intervalle entre le début de l'oestrus et le pic de LH varie selon l'espèce et la race. L'ovulation se produit 20 à 26 heures après le pic de LH.

Ayant libéré l'ovocyte, le follicule se transforme en corps jaune et commence à sécréter de la P4. Le taux de P4 reste élevé durant 14 jours (phase lutéale), exerce un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire, bloquant ainsi toute sécrétion de GnRH.

La décharge pré- et post-ovulatoire déclenche le recrutement de la première vague de follicules, accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de E2 et INH. L'effet inhibiteur de la P4 empêche l'effet positif de l'E2 sur l'hypothalamus et les follicules ne peuvent pas évoluer. De plus, l'E2 et l'INH inhibent la sécrétion de FSH et les follicules entrent en atresie.

A ce moment, la chute du taux d'E2 et d'INH permet le recrutement d'une nouvelle vague de follicules grâce à l'élévation du taux de FSH. Ce nouveau recrutement se passe toujours durant la production de P4 et l'E2 sécrétés par les follicules ne permet pas de lever l'inhibition exercée sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Au niveau de l'utérus, l'E2 va déclencher au niveau de l'utérus la sécrétion de PGF 2 α qui sera responsable de la lutéolyse.

Le cycle est alors bouclé. Quelques follicules de la troisième vague pourront être recrutés et atteindre l'ovulation. Le corps jaune ayant été détruit, la P4 n'exerce plus de contrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.¹²(figure 3)

¹² G.Baril., P.Chesné., P.Brebio.1993

Chapitre II : Endocrinologie de la reproduction

Le cycle ovarien dépend du fonctionnement interactif de l'axe endocrine formé par l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et les ovaires. Ce sont des relations complexes entre les hormones de ces différents organes que dépend le bon fonctionnement du cycle ovarien.¹³

II.1. Les organes de la régulation hormonale

- A) L'hypothalamus se situe dans le diencephale et reçoit des informations issues des nerfs périphériques et d'autres régions de l'encéphale. Par l'intermédiaire d'influx nerveux, le cerveau transmet à l'hypothalamus des informations concernant des changements saisonniers ou la disponibilité d'un partenaire sexuel et l'hypothalamus libère alors des hormones sexuelles nécessaires à la reproduction.
- B) L'hypophyse se situe à la base de l'hypothalamus et obéit aux stimuli hormonaux provenant de cet organe. Elle est composée de deux lobes : le lobe postérieur ou neurohypophyse (lieu de stockage et de sécrétion de deux hormones peptidiques, l'ocytocine et l'hormone antidiurétique) et le lobe antérieur, ou adénohypophyse, responsable de la synthèse et de la libération de nombreuses hormones (hormone de croissance, prolactine, hormone folliculostimulante, hormone lutéinisante, thyrotrophine, corticotrophine).¹⁴

II.2. Les hormones hypophyso hypophysaires

2.1. La GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone)

Les cellules nerveuses de l'hypothalamus sécrètent la GnRH, une hormone peptidique de 10 acides aminés. Celle-ci est stockée et déversée de manière pulsatile dans le système veineux hypothalamo-hypophysaire. Cette hormone a pour cible les cellules gonadotropes de l'hypophyse et induit la sécrétion de gonadotrophines hypophysaires.¹⁵

2.2. La FSH (follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone)

Ces deux hormones sont sécrétées par l'hypophyse antérieure et sont de nature protidique. Elles ont une action sur les gonades mâles et femelles mais nous ne traiterons ici que de l'effet sur les gonades femelles.

- La FSH :- contrôle le développement de l'ovaire et la croissance des follicules durant la phase folliculaire.
 - stimule le follicule ovarien à sécréter des oestrogènes.
 - prépare l'action de la LH.
- La LH : -contrôle la maturation finale des follicules.
 - le pic de LH provoque l'ovulation.
 - engendre la lutéinisation.

¹³ L. Sherwood.,2000

¹⁴ Biologie. Campbell., 1995

¹⁵ Yen., 1991

-stimule la sécrétion durable d'hormones stéroïdes, progestérone en abondance et oestrogènes en faible quantité, par le corps jaune ¹⁶.

II.3 Les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes sont les oestrogènes, la testostérone et la progestérone.

3.1. Les oestrogènes

Les oestrogènes sont surtout sécrétés durant la phase folliculaire de l'ovaire sous l'influence de FSH, LH et des oestrogènes eux-mêmes, chaque pulse de LH produisant l'apparition d'un pulse d'oestradiol 17β .

La concentration croissante d' E_2 engendre :

- une induction du pic préovulatoire de LH et de FSH au début de l'oestrus, par mise en jeu d'une rétroaction positive sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.
- un déclenchement direct du comportement sexuel femelle avant l'ovulation.
- une modification de l'activité des cellules utérines pour faciliter le transport des spermatozoïdes.
- un contrôle de la synthèse et libération de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ par l'utérus, avant la lutéolyse.
- une rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, en dehors de la période préovulatoire. Inhibition de la FSH en fin de phase folliculaire.

3.2.1a progestérone

La progestérone est sécrétée par le corps jaune de l'ovaire et domine la phase lutéale.

La sécrétion de P_4 est sous le contrôle de la LH.

Ses effets connus sont :

- le blocage des ovulations cycliques par rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ceci bloque la décharge préovulatoire de FSH et de LH, ainsi que tout nouveau cycle.
- sensibilisation du système nerveux à l'action des oestrogènes pour l'induction du comportement d'oestrus.
- préparation de l'utérus à l'implantation de l'embryon s'il y a eu fécondation ¹⁷.

3.3. Les autres hormones

De nombreuses autres hormones entrent en jeu lors du cycle ovarien tel que les prostaglandines, l'ocytocine, la relaxine et l'inhibine qui est la plus importante; elle renforce le feed-back de l' E_2 sur la sécrétion de FSH et de LH en agissant directement au niveau de l'hypophyse.

La prostaglandine $F_{2\alpha}$ de faible poids moléculaire n'est pas un stéroïde mais un dérivé de l'acide arachidonique. La $PGF_{2\alpha}$ est sécrétée par l'utérus en réponse aux pulses d'oestradiol provenant de l'ovaire lors de la lutéolyse. Elle est responsable de la disparition du corps jaune à la fin du cycle si la femelle n'est pas gestante.

¹⁶ J-L. Bister., 2002

¹⁷

III.1. Principe

Le transfert d'embryons est une méthode de reproduction dont le principe est de transférer, avant l'implantation, des embryons générés d'une femelle donneuse (animal d'élite) chez des femelles receveuses dont les cycles ont préalablement été synchronisés. Le développement des embryons est assuré par la femelle receveuse jusqu'au terme.¹⁸

Cette technique comporte plusieurs étapes clés:

- l'induction d'une superovulation chez la brebis d'élite.
- l'insémination de cette brebis avec un bélier d'élite.
- la collecte d'embryons.
- la conservation des embryons.
- la synchronisation des receveuses.
- le transfert d'embryons.¹⁹

III.2. Avantages

Le transfert d'embryon permet un progrès génétique supplémentaire non négligeable²⁰ et peut servir à des objectifs commerciaux et sanitaires.

- Pour tous les échanges de gènes, la voie du transfert d'embryons est plus économique que le déplacement d'animaux vivants, et surtout est très sécurisante sur le plan sanitaire. L'embryon transféré au stade blastula ou morula bénéficie d'une protection naturelle constituée par la zone pellucide²¹ contre les agents infectieux. Les lavages successifs effectués selon les recommandations de l'I.E.T.S²² permettent de réduire le risque de transmission d'agents infectieux.
- Il permet la sélection des races à haute valeur génétique en profitant non seulement des caractères favorables paternels mais aussi maternels.
- Les races en voie d'extinction peuvent être sauvegardées par cette technique qui permet le transfert d'embryons de la race en péril sur des animaux d'une autre race mais de la même espèce; on peut également conserver ces embryons par cryoconservation.²³

Les avantages que pourrait apporter cette technique sont évidents. Malheureusement, deux facteurs limitent aujourd'hui l'efficacité de la transplantation:

1. le nombre relativement faible d'embryons que obtenus après un traitement hormonal de superovulation .
2. la variabilité de production entre femelles traitées.²⁴

¹⁸ G.Baril, P.Brebion, P.Chesné.,1993

¹⁹ J-L.Bister.,2003

²⁰ Colleau *et al*, 1998

²¹ Y.Cognié, G.Baril.,2003

²² Stringfellow et Seidel.,1998

²³ G.Baril, P.Brebion, P.Chesné.,1993

²⁴ J-J.Colleau, Y.Heyman, J-P.Renard.,1998

III.3.Choix et induction d'une superovulation chez la brebis donneuse

3.1. Le choix des brebis donneuses

Les donneuses sont généralement des brebis qui portent les critères génétiques et zootechniques recherchés.

Elles doivent satisfaire à des critères physiologiques et pathologiques qui conditionnent la réussite des opérations :

- toutes les femelles doivent avoir mis bas au cours de la saison précédente et depuis au minimum 2 mois.
- Les animaux présentant des symptômes d'infections sont éliminés.
- Si des femelles sont nullipares, il faut s'assurer qu'elles ont atteint l'âge de 8 à 10 mois et un poids équivalant à 60 % du poids adulte.
- Les besoins énergétiques des animaux doivent être couverts car toute malnutrition engendre des troubles au niveau de la reproduction alors que la pratique du flushing (supplément nutritionnel durant 3 semaines avant et 3 semaines après la période de fécondation) favorise une élévation du taux d'ovulation.
- Il faut aussi éviter de recruter des brebis qui ont subi un stress important car cela peut nuire au bon déroulement des opérations.²⁶

3.2. Traitements hormonaux des brebis donneuses.

Ces traitements ont pour but d'induire l'oestrus et la superovulation à un moment déterminé.

3.2.1. Le contrôle de l'oestrus

La période de reproduction chez les petits ruminants dépend de la photopériode. En général, les accouplements ont lieu durant la période des jours décroissants, plus particulièrement durant l'automne. Il est donc primordial de contrôler le moment de l'oestrus afin d'optimiser la superovulation en dehors des périodes naturelles d'oestrus et de provoquer une activité sexuelle à contre saison afin de permettre une reproduction tout au long de l'année.

a) Moyens zootechniques:

- L'effet mâle : après une période d'isolement sensoriel complet de minimum 3 semaines, l'introduction d'un mâle dans un troupeau de femelles va provoquer une brusque augmentation de pics de LH. Les premières ovulations ont lieu 48 h après l'introduction du mâle (elles sont généralement silencieuses). Les oestrus se manifestent en moyenne 18 à 25 jours après. Chez les races très saisonnées, l'effet mâle est inefficace et doit être associé à un traitement hormonal.
- Le flushing : chez la brebis, le poids vif, reflet de l'état nutritionnel du troupeau, a une influence sur le taux d'ovulation, la fertilité et la prolificité. Une augmentation du niveau énergétique de la ration a donc pour effet d'augmenter le taux d'ovulation. De toute évidence, cette méthode ne permet pas de contrôler l'oestrus mais participe au bon déroulement du processus.^{26 b}
- La photopériode et la mélatonine : chez les petits ruminants, les jours courts stimulent l'activité sexuelle tandis que les jours longs l'inhibent. Une alternance de jours longs

²⁶ G.Baril, P.Chesné, P Brebion.,1993

^{26 b} J-L Bister,2002

puis de jours courts peut induire une activité sexuelle, avancer la période de reproduction et même l'induire en contre saison.

La mélatonine est une substance naturelle sécrétée par la glande pinéal qui transmet l'information photopériodique chez les mammifères. L'administration continue par un implant sous-cutané permet de mimer les jours courts alors que les yeux des animaux perçoivent la lumière de l'été.²⁷ Il a été démontré que la succession de jours longs et ensuit l'administration de mélatonine était plus efficace pour induire et maintenir une activité sexuelle que le traitement de jours longs seuls, lui-même étant plus efficace que le traitement mélatonine seul. (figure 4)

b) Moyens hormonaux :

- Utilisation de progestérone : L'administration de progestérone doit précéder la stimulation ovarienne afin de synchroniser les brebis. On peut également maintenir un corps jaune artificiel afin d'allonger le temps d'ovulation. Cela inhibe les décharges préovulatoires de GnRH, FSH et LH. Lors de l'arrêt du traitement, la chute du taux de P₄ est rapide et provoque un feedback positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La maturation finale est amorcée et l'ovulation se déroule 50 à 70 h plus tard. L'administration peut se faire de différentes manières : par implants vaginaux, par injections ou par implants sous-cutanés. La durée du traitement peut être égale à la durée de la phase lutéale (14 jours) mais est plus efficace si elle est de 10 jours. La technique la plus utilisée est la pose d'éponges vaginales; ces éponges sont imbibées d'un dérivé de la progestérone (60 mg de médroxyacétate de progestérone). La pose de l'éponge est réalisée à l'aide d'un applicateur et l'éponge est retirée 10 à 14 jours après la pose.
- Utilisation de prostaglandine : les prostaglandines peuvent inhiber l'ovulation; on raccourcit le délai d'ovulation en provoquant la lutéolyse par injection de PGF_{2α}. La PGF_{2α} a un effet négatif sur le corps jaune (modifications du métabolisme des cellules lutéales, diminution de l'irrigation des vaisseaux sanguins). Il est indispensable de procéder à 2 injections espacées de 10 à 12 jours car les femelles en phase folliculaire ne seraient pas synchronisées par une simple injection; de plus, les corps jaunes ne deviennent sensibles à la prostaglandine qu'à partir du 5^{ème} jour de la phase lutéale. Cette méthode est très peu utilisée car elle est totalement inefficace sur les femelles non cycliques.

3.2.2. La stimulation ovarienne

Il existe une diversité d'hormones gonadotropes permettant un traitement superovulatoire, l'eCG, FSH, LH, hMG, etc. Les hormones gonadotropes les plus utilisées actuellement pour la superovulation, chez la brebis, sont l'eCG, la FSH et la LH²⁸.

A) PMSG

La première gonadotrophine utilisée pour obtenir une superovulation est la PMSG, maintenant nommée eCG pour equine Chorionic Gonadotrophin.

La PMSG est une hormone proche de la LH synthétisée par le placenta de jument; elle est riche en acide sialique; il en résulte que sa demi-vie est importante; en effet, celle-ci est de plus ou moins 26 heures.²⁹

²⁷ P.Chemineau *et al.*,1991

²⁸ Brebion *et al.*,1992

²⁹ Cole, 1975

Cette hormone est administrée par voie intramusculaire en une seule injection. Les doses à administrer varient entre 300 et 1200 UI. Pour une brebis en oestrus, une dose de 600 à 800 UI augmente légèrement le TO (taux d'ovulation) par rapport au TO naturel. En anoestrus, il faut augmenter la dose entre 800 et 1000 UI.³⁰ L'injection est réalisée un ou deux jours avant le retrait de l'éponge afin d'essayer d'augmenter le taux d'ovulation. Elle empêcherait les effets délétères, à la fois d'un long traitement aux progestagènes, mais aussi des follicules ovulatoires âgés sur la fertilité en recrutant de nouveaux follicules pour l'ovulation. Elle permet aux follicules de répondre à la LH en ovulant. Pour induire une superovulation, des injections de 1200 à 2000 UI sont nécessaires. Cependant, cette gonadotrophine présente trois inconvénients :

- la forte activité de la LH de l'eCG peut induire une reprise prématurée de la méiose ovocytaire.
- l'action prolongée de l'eCG due à sa longue demi-vie provoque des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales.³¹
- le traitement peut provoquer une hyperstimulation et l'apparition de follicules kistiques.³²

Ces effets conjugués peuvent expliquer les faibles performances obtenues avec l'eCG qui sont de 2 à 3 embryons par donneuses.³³

B) La hCG

La hCG ou hormone gonadotrope chorionique humaine est une glycoprotéine produite par les tissus trophoblastiques du placenta. Sa sous-unité α est identique à celle de la LH et de la FSH.³⁴ Sa sous-unité β est très proche de celle de la LH. La demi-vie de la hCG est d'environ 40 heures;³⁵ elle peut stimuler et prolonger l'existence du corps jaune et assure la sécrétion de progestérone ovarienne jusqu'à ce que le placenta puisse la sécréter³⁶.

La hCG présente surtout une activité LH.³⁷ Si elle est injectée au moment du pic de LH, elle double la stimulation de LH endogène et peut augmenter la qualité de l'ovulation.³⁸ Malgré cet effet positif, il faut savoir qu'une injection de hCG peut entraîner une diminution des réponses de superovulation; cette méthode n'est donc plus utilisée.

C) La hMG

La hMG est une hormone gonadotrope ménopausale humaine. Elle est produite par l'hypophyse lors de la ménopause et est très semblable à la FSH.³⁹ Elle est surtout utilisée chez la femme. L'injection de cette hormone renforce la capacité de développement des follicules en stimulant leur activité mitotique et, en conséquence, leur vitesse de croissance⁴⁰.

D) La FSH et la LH

La FSH est obtenue à partir d'extraits hypophysaires. Des études comparatives ont montré la supériorité de ces extraits hypophysaires porcins ou ovins en terme de production d'embryons

³⁰ J-L.Bister, 2001

³¹ Y.Cognié, G.Baril.,2003

³² Brebion *et al.*,1992

³³ Y.Cognié, G.Baril.,2002

³⁴ Norman et Litwack.,1987

³⁵ Derivaux et Ectors.,1986

³⁶ Goldstein.,1973

³⁷ Schwartz.,1973

³⁸ J-L.Bister.,2001

³⁹ J-L.Bister.,2001

⁴⁰ Gougeon.,1984

aptes au transfert par rapport aux autres techniques mais aussi la nécessité de les administrer de façon séquentielle étant donné leur courte durée de demi-vie.⁴¹ Celle-ci varie de 20 à 60 minutes en fonction de la méthode d'interaction et de préparation.

Lors d'un traitement de superovulation, le rapport FSH-LH diminue au fil de l'administration. En effet, si le traitement FSH-LH est étalé sur 5 jours, les injections de FSH vont en diminuant au cours du traitement (6 UI - 5 UI - 3 UI - 2 UI et 0) et la LH est injectée le 5^{ème} jour. Les ovulations surviennent de 48 à 52 heures après le retrait de l'éponge réalisée 36 heures avant l'injection de LH.

Un apport croissant de LH en fin de traitement améliore la réponse ovulatoire. Cet apport décalé de FSH et de LH correspond sans doute mieux à l'environnement hormonal du follicule en croissance terminale, et contribue à accroître l'efficacité de la superovulation.

Avec cette méthode, les nombres moyens d'ovulations et d'embryons transférables par brebis sont plus élevés qu'avec un apport constant de FSH et de LH.⁴²

On peut également associer ce traitement avec la eCG. Si on administre 800 UI d'eCG et 12 ou 18 mg de FSH, on observe une augmentation du taux d'ovulation par rapport à la FSH seule.⁴³ Cela permet d'éviter les désavantages liés à la durée d'activité biologique de chacune des gonadotrophines.

E) L'immunisation

L'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation ovarienne étant le facteur principal de variation de la réponse à la FSH,⁴³ plusieurs approches visant à contrôler la population folliculaire peuvent être appliquées.

Immunisation contre l'inhibine:

L'inhibine est une hormone produite par les cellules de la granulosa des follicules ovariens. Elle contrôle la sécrétion de FSH en exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse.⁴⁴ L'immunisation contre cette hormone engendre donc une augmentation de la teneur plasmatique en FSH. La teneur en LH est également plus importante. Le résultat obtenu est une augmentation du taux d'ovulation.⁴⁵

Immunisation contre des stéroïdes endogènes :

Certains stéroïdes endogènes peuvent également être la cible d'une immunisation. L'injection de Δ^4 -androstènedione liée à l'albumine sérique humaine provoque une réaction immunitaire contre l'androstènedione. Celle-ci facilite l'atréisie des follicules et son inactivation permet la survie folliculaire supplémentaire jusqu'à l'ovulation. Parallèlement, la teneur plasmatique en oestradiol diminue, ce qui réduit le rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et augmente les niveaux de FSH et de LH dans le sang.⁴⁶

F) Blocage de l'hypophyse

L'hypophyse peut être bloquée de deux manières principales : par une dose d'agoniste en excès ou par des antagonistes.

F.1. Agoniste de GnRH

Les agonistes de la GnRH sont généralement des décapeptides dont la demi-vie est très courte (4-5 minutes) et l'action localisée au niveau de l'hypophyse.⁴⁷ L'agoniste le plus connu est la

⁴¹ Y.Cognié, G.Baril.,2003

⁴² Cognié *et al.*,1986 ;

⁴³ Ryan *et al.*,1991

⁴³ Saumande.,1995

⁴⁴ Norman et Litwack.,1987

⁴⁵ J-L.Bister.,2001

⁴⁶ Bister *et al.*,1988 ; Derycke *et al.*,1988

⁴⁷ Baril *et al.*,1993

Buséréline qui accélère l'ovulation en l'induisant 24 à 48 heures après le début du traitement. Un traitement composé de Buséréline en excès peut inhiber l'ovulation chez la brebis⁴⁸ en bloquant la sécrétion des gonadotrophines. Ce blocage a deux intérêts principaux: il permet le contrôle de la croissance folliculaire terminale par des traitements exogènes sans crainte d'une décharge ovulatoire spontanée; et il est supposé assurer la multiplication des petits follicules qui émergent de la CFB et restent en attente d'un signal FSH pour entamer la folliculogénèse terminale (CFT).

Grâce à cette inhibition le nombre moyen d'ovulation est augmenté. Les oestrus apparaissent plus groupés et le nombre d'embryons pouvant être utilisés, est augmenté.⁴⁹

Une perfusion de 29 jours avec un GnRH agoniste (50 µg/jour) grâce à des minipompes osmotiques engendre différents effets.

Il y a un effet sur l'oestrus et l'ovulation : l'oestrus n'est pas observé durant la période de traitement et n'arrive que 8 à 11 jours après le retrait des pompes.

La concentration de LH est significativement ($P < 0,005$) plus grande durant les 2 premiers jours du traitement par rapport au contrôle et ensuite chute. Le taux de LH revient à son taux physiologique 10 jours après le retrait des pompes. Une légère augmentation a lieu 24 H après la fin du traitement et l'augmentation s'étale ensuite sur 8 jours.⁵⁰

Le taux de FSH chute considérablement.

La chute de la concentration plasmatique de FSH et l'absence de la sécrétion pulsatile de LH empêchent donc le développement des follicules ayant un diamètre entre 2 et 5 mm puisque ceux-ci sont dépendants de l'association d'une concentration adéquate de FSH et de LH.

L'effet sur les follicules est aussi important; des brebis traitées durant 30 jours avec de la Buséréline (75µg/jour) montrent un certain nombre de variantes par rapport à un groupe témoin. Le nombre de follicules de 1 mm de diamètre ne varie pas significativement mais, chez les brebis traitées, on ne dénombre pas de follicules d'un diamètre supérieur à 2,2 mm. Ceci montre bien l'efficacité de ce procédé afin d'empêcher les follicules d'entamer la folliculogénèse terminale.

F.2. Antagoniste de GnRH

Contrairement aux GnRH-agonistes qui suppriment la libération des hormones gonadotropes par épuisement de l'hypophyse, les antagonistes entrent en compétition avec la GnRH endogène pour se fixer sur les récepteurs au GnRH de l'hypophyse et empêcher la réponse hypophysaire.

Le mécanisme d'action est dépendant de l'équilibre entre le GnRH endogène et la quantité d'antagoniste. Par ce fait, l'effet des antagonistes est fortement dépendant de la concentration.⁵¹

Ce mécanisme a pour conséquence de ramener le taux de LH à un niveau de base 4h après l'injection et il est possible de le maintenir à ce niveau si des injections sont effectuées à intervalles réguliers.

Le taux de FSH est lui aussi amené à un niveau basal.

Les premiers traitements à base d'Antarélix ou de Tévérélix préconisaient des injections journalières de 0,5 mg mais une étude a démontré que le nombre d'injections pouvait être réduit et malgré cela continuer à maintenir une inhibition efficace sur l'hypophyse.^{51 b}

⁴⁸ Dobson.,1985

⁴⁹ Brebion *et al.*,1992

⁵⁰ Mc eilly,H.M Fraser., 1987

⁵¹ Felbebran

^{51 b} Cognié, 2003 Communication personnelle

Deux techniques ont été comparées: une injection quotidienne d'Antarélix (0,5 mg/jour) durant 11 jours et un régime de 3 injections respectivement de 1,5; 0,5 et 0,5 mg avec un intervalle de 5 jours entre chaque injection.

Le traitement de 3 injections donne une réponse ovulatoire plus élevée mais un taux plus faible d'embryons transférables.⁵²

III.4 L'insémination des brebis donneuses

Il est primordial de sélectionner des mâles dont la fertilité est élevée afin d' optimiser le taux de réussite.⁵³

4.1.La collecte du sperme

- La collecte de sperme se fait à l'aide d'un vagin artificiel ou par électroéjaculation mais cette technique donne de moins bons résultats.⁵⁴ Pour récolter le sperme avec le vagin artificiel, le mâle est mis en présence d'une femelle en chaleur et lorsque le mâle veut saillir, le pénis est détourné dans le vagin artificiel.⁵⁵
- La qualité du sperme doit être évaluée en fonction de différents paramètres:
 - La motilité est décrite par des grades allant de 0 à 5.
 - Le volume est mesuré et doit être compris entre 1 et 1.5 ml.
 - La coloration doit être blanchâtre, une coloration différente est souvent le signe de pathologie.
 - Le pH est également mesuré. Un pH trop alcalin (par rapport à la moyenne qui est de 6,8) est signe d'infertilité car généralement associé à une azoospermie.
- La conservation dépend de l'utilisation du sperme:
 - s'il doit être utilisé tout de suite, une conservation à court terme suffit. Elle nécessite le mélange du sperme avec un dilueur. Celui-ci doit être isotonique, présenter un pouvoir tampon, ne pas être toxique et apporter les éléments essentiels au métabolisme basal des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes sont conservés à 16°C afin d'éviter toute altération. Si la conservation doit être un peu plus longue, un refroidissement progressif jusqu' à 4°C en +/- 2 heures dans un dilueur permet la survie du sperme jusqu'à 48 h.⁵⁶
- La conservation à long terme se fait par congélation : les cellules sont refroidies jusqu'à -196°C, température de l'azote liquide. Ce refroidissement se fait en plusieurs étapes qui peuvent varier d'un laboratoire à un autre. La décongélation est aussi importante que la phase de refroidissement. Le taux maximal de survie est observé lorsque les paillettes de spermatozoïdes sont plongées 8 secondes à 60°C.⁵⁷

4.2.L'insémination

La fécondation des femelles peut se faire selon différentes méthodes : elle peut être obtenue par saillie naturelle, en monte libre ou contrôlée, ou par insémination artificielle.

⁵² Y.Cognié, G.Baril, P.Mermillad.,2003

⁵³ Chemineau *et al.*,1991

⁵⁴ Derycke *et al.*,1991

⁵⁵ Gordon.,1997

⁵⁶ Bister.,2001

⁵⁷ Gordon.,1997; Bister.,2001

4.2.1. La saillie naturelle

Mâle et femelle sont mis en présence l'un de l'autre et le mâle monte la femelle. Cette méthode est la moins traumatisante pour la brebis, ce qui est un facteur non négligeable. Cette technique est tout de même la moins utilisée car elle nécessite un rapport mâle/femelle élevé.⁵⁸

4.2.2. L'insémination artificielle

Le dépôt de la semence doit être tel que les spermatozoïdes se retrouvent au bon endroit au bon moment afin de pénétrer l'ovule car la durée de vie des gamètes est très courte; ce paramètre est donc à prendre en compte lors du choix de l'instant pour l'insémination artificielle.

A) L'insémination exocervicale

Le sperme est déposé le plus loin possible dans le vagin, si possible à l'entrée du cervix. Pour une fertilité maximale, elle nécessite l'administration de $400 \cdot 10^6$ spermatozoïdes. Cette méthode est souvent employée chez la brebis car le passage du cervix est très complexe.

Le passage des spermatozoïdes à travers le cervix est perturbé chez la brebis superovulée.⁵⁹ Cependant, l'efficacité de cette méthode sur des animaux superovulés est diminuée par rapport à des animaux témoins non superovulés. Le taux de fécondation est corrélé négativement au taux d'ovulation.⁶⁰ L'environnement utérin défavorable à la remontée des spermatozoïdes avec cette méthode fait qu'il est peu propice de l'utiliser pour des brebis superovulées.

Le taux d'embryons obtenu par cette méthode est souvent insuffisant et inférieur à celui obtenu après saillie.⁶¹

B) L'insémination transcervicale

Cette technique permet de déposer le sperme directement dans l'utérus et est utilisée pour des espèces dont le passage du cervix est facile, ce qui n'est pas le cas chez la brebis.⁶²

C) L'insémination utérine par endoscopie

Le sperme est injecté directement dans l'utérus sous contrôle laparoscopique grâce à une fibre optique et à un pistolet d'insémination terminé par une fine aiguille qui permet d'injecter le sperme dans les cornes utérines; cette opération est réalisée sous anesthésie locale. Grâce à cette injection directe dans les cornes, il est possible d'utiliser une quantité plus faible de sperme ($2 \cdot 20 \cdot 10^6$ chez la brebis).⁶³ Le dépôt de la semence directement dans les cornes utérines, 48 à 50 h après le retrait de l'éponge, permet d'obtenir des taux de fécondation élevés chez la brebis ayant moins de 30 ovulations; si ce nombre est dépassé, le taux de fécondation devient inversement proportionnel au nombre d'ovulations.⁶⁴ Le taux de fertilisation est identique pour le sperme frais et le sperme congelé;⁶⁵ malgré cela, il est préférable d'utiliser du sperme frais.

⁵⁸ G.Baril, P.Chesné, P.Brebion.,1993

⁵⁹ Evans et Armonstrong.,1984

⁶⁰ J.J.Colleau, Y.Heyman, J-P.Renard.,1998

⁶¹ Baril *et al* 1998; Moore et Eppleston.,1979; Armstrong et Evans .,1984

⁶² Bister *et al.*,2001

⁶³ Bister *et al.*,1989

⁶⁴ J-J.Colleau, Y.Heyman, J-P.Renard.,1998

⁶⁵ Gordon.,1997

Chez la brebis, la qualité embryonnaire est plus élevée si l'IA est pratiquée à la carte, 26 h après le pic de LH qui peut être détecté à l'aide d'un kit ELISA (Brevet INRA-CNRS n° PCT/FR 91/00427)⁶⁶, soit 2 à 6 H après l'ovulation ou 32 H après le début des chaleurs. Cette méthode donne 87% d'embryons viables alors que la pratique simultanée pour l'ensemble des brebis donne 77% d'embryons viables.⁶⁷

D) Fécondation in vitro

La fécondation a lieu en dehors de l'appareil reproducteur de la femelle. Elle se réalise dans un puits dans lequel sont placés les ovocytes matures et les spermatozoïdes capacités. Le temps nécessaire à la fécondation est variable selon les espèces. Chez la brebis, il est de 24 heures.⁶⁹

4.3 La collecte des embryons

En raison de l'impossibilité de franchir le col utérin, la récolte des embryons par voie naturelle est peu développée chez les petits ruminants. Le taux de récupération est très faible (36,5% chez les ovins)⁷⁰ et inférieur à celui obtenu par laparoscopie ou chirurgie.⁷¹ Par ailleurs, la mise en place de la sonde par voie cervicale n'est pas toujours réalisable. Chez les brebis, Myle *et al* (1992) et Coonrod *et al* (1984) ne réussissent à pratiquer cette méthode que respectivement chez 40 et 59 % des femelles.

Les embryons sont le plus souvent récoltés par des techniques invasives telles que la récolte par laparotomie (collecte chirurgicale) ou par laparoscopie.

Le jour de la récolte est primordial. Elle a le plus souvent lieu le 6ème ou le 7ème jour après l'oestrus.

Le choix de ce jour résulte de plusieurs critères:

- le passage des embryons de l'oviducte dans l'utérus à lieu à partir de 4ème jour. La législation impose, pour des raisons sanitaires, que l'embryon soit transféré avant sa sortie de la zone pellucide qui peut survenir à partir de 8ème jour.
- la congélation des embryons n'est bien maîtrisée que sur des embryons des stades morula et blastula, soit les 6ème et 7ème jours après le début de l'oestrus.⁷²

4.3.1 La collecte chirurgicale

L'animal est placé sur une table de contention et est anesthésié. Une incision est pratiquée sur la ligne blanche juste au-dessus des mamelles et les cornes utérines sont extériorisées. La collecte consiste à rincer les cornes utérines l'une après l'autre avec un tampon phosphate. Une aiguille est introduite dans la lumière utérine et un cathéter est introduit à l'autre extrémité de la corne qui récolte le liquide de perfusion contenant les embryons. Le milieu de collecte est maintenu à 39°C. Après la récolte, la peau est suturée.

C'est avec cette méthode que l'on obtient le meilleur taux d'œufs récoltés.

Le taux de récupération (nombre d'œufs collectés/nombre de corps jaunes x100) est de 70 à 80%, mais il chute lorsque la technique est répétée plusieurs fois sur la même brebis.⁷³

⁶⁶ Maurel.,1991

⁶⁷ Brebion *et al.*,1992

⁶⁹ Cognié *et al.*,1992

⁷⁰ Soonen *et al.*,1991

⁷¹ Soonen *et al.*,1992; Flores-Foxworth *et al.*1992

⁷² G.Baril, P.Brebion, P.Chesné.,1993

⁷³ Torrès et Sevellec.,19987; Senlis.,1990

Effet de la répétition de la collecte par voie chirurgicale sur le taux d'œufs récoltés

Nb. d'endoscopie	Taux de récupération
1ère	88%
2ème	52%
3ème	24%

4.3.2 La collecte par laparoscopie

Cette méthode permet des collectes successives chez les donneuses car elle est beaucoup moins invasive.

L'animal est maintenu sur une table d'endoscopie et est anesthésié. Comme pour une simple endoscopie, deux trous sont faits à l'aide d'un trocart. Le premier reçoit l'endoscope et le second, les pinces pour la manipulation du tractus génital. Un troisième trou est fait afin de permettre le passage d'une sonde à 3 voies. La corne utérine est perforée et la sonde insérée dans la lumière. Le ballonnet fixé sur la sonde est gonflé d'air et obstrue ainsi la lumière utérine. Le milieu de collecte est injecté par le corps de la sonde à raison de 40 à 50 ml par corne. Cette méthode donne un taux de récupération d'œufs de 10 à 15% plus faible que la méthode chirurgicale mais elle permet la répétition des collectes sans diminution du taux d'œufs d'une collecte à l'autre.⁷⁴

4.4 Le choix des embryons

Les embryons sont sélectionnés selon 3 critères :

- L'uniformité de la taille et de l'apparence.
- L'état de développement de l'embryon par rapport au développement théorique.
- La compaction et la symétrie de masse.⁷⁵

4.5 La conservation des embryons

Depuis vingt cinq ans (naissance des premiers agneaux issus d'embryons congelés⁷⁶), la technique s'est progressivement améliorée et simplifiée. La conservation des embryons à court ou à long terme est une étape primordiale dans leur transfert; elle permet de dissocier chronologiquement leur production et leur transfert en mère porteuse.

Il existe deux types de conservation : à court terme (24 à 48 H) par simple refroidissement et à long terme par cryoconservation.

4.5.1 La conservation à court terme

Par un simple abaissement de la température sans changement de phase, il est possible de ralentir le métabolisme de l'embryon de façon temporaire. Après avoir été collectés, les embryons sont placés à 4°C dans une solution de PBS enrichie en protéines et sont refroidis à

⁷⁴ McKelvey *et al.*,1986;Vallet *et al.*,1978

⁷⁵ Murray.,1978

⁷⁶ Willadsen *et al.*,1976

raison de 1°C par minute. Ils sont ensuite stockés au frigo durant une durée maximale de 48 heures.

Pour permettre le transfert, les embryons sont réchauffés par passage direct dans une solution PBS à 37°C. Le transfert doit ensuite s'effectuer dans les plus brefs délais. Cette technique n'engendre pas un taux de survie très élevé mais peut être appliqué en cas de nécessité (comme un retard de préparation des receveuses).⁷⁷

4.5.2 La conservation à long terme

Idéalement, le fait de figer brutalement par le froid une cellule dans l'état où elle se trouve, puis de la réchauffer rapidement, devrait permettre de conserver indéfiniment une cellule et de la retrouver fonctionnelle après la décongélation.

Pratiquement, la congélation comporte certains inconvénients.

L'hétérogénéité de la composition cellulaire et la réponse des différents constituants au refroidissement rendent la pratique de la congélation délicate. On sait que, lors de la congélation, l'apparition de cristaux d'eau peut altérer le cytosquelette et donc le mécanisme des mouvements intracellulaires.

La vitesse de refroidissement est primordiale lors de la congélation. Si le refroidissement est trop rapide, l'eau intracellulaire ne peut pas sortir en quantité suffisante. Ceci entraîne une formation importante de cristaux de glace à l'intérieur de la cellule. Ces cristaux vont grossir et abîmer les structures internes de la cellule.

Par contre, si la congélation est trop lente, la déshydratation progressive des cellules va entraîner une augmentation importante de la concentration en électrolytes dans le milieu cellulaire modifiant les propriétés physico-chimiques et entraînant ainsi une perte de viabilité des cellules.

Ces inconvénients peuvent être réduits grâce aux cryoprotecteurs. Les CPA (CryoProtectine agents) non pénétrants ont pour rôle d'induire une déshydratation relativement importante de la cellule en raison de l'osmolalité élevée qu'ils confèrent au dilueur (ex : DMSO, Glycérol, etc)

Les CPA pénétrants ont pour rôle de diminuer la proportion relative d'eau dans la cellule et d'abaisser le point de fusion.

Ces cryoprotecteurs doivent être enlevés de la cellule avant le transfert d'embryon afin de permettre le bon développement embryonnaire.

Il existe 4 techniques de congélation :

- A) La technique classique repose dans l'utilisation d'agents pénétrants et d'un refroidissement lent (0,5°/minute); l'embryon se déshydrate au fur et à mesure de son refroidissement. Il se met constamment en équilibre avec son milieu en fonction de l'abaissement de la température. Ce type de congélation est réalisé par des machines préprogrammées.
- B) La technique « en deux temps » consiste à déshydrater les embryons vers 15-20°C par l'utilisation d'agents externes (sucrose) et internes (glycérol). L'embryon est alors refroidi à -20° ou -30°C et maintenu à cette température pour lui permettre de se déshydrater davantage sous l'action combinée des deux cryoprotecteurs. Il est ensuite plongé à -196°C. Le principal avantage de cette technique est de n'exiger qu'une cuve à azote liquide et un congélateur.
- C) La technique de vitrification « classique » fait également appel à des combinaisons d'agents externes et internes mais à de fortes concentrations. Le milieu de congélation est visqueux, les embryons sont immergés directement dans l'azote liquide après avoir

⁷⁷ G.Baril, P.Brebion, P.Chesné.,1993

été déposés dans des bains successifs d'ECM (Embryo Culture Medium) et de glycérol à différents concentrations. Ils sont ensuite placés en paillettes de polypropylène, après une goutte de galactose 0,85M, bulle d'air, ECM 25+25, bulle d'air, galactose 0,85.

La paillette est bouchée au PVA et ensuite plongée dans l'azote liquide.

- D) Vitrification par paillette capillaire : la seule différence avec la méthode classique est la forme de la paillette. Les paillettes sont étirées et donc encore plus fines. De ce, le temps de congélation lors de l'immersion de la paillette dans l'azote liquide, est encore plus court.

III.5 La préparation des receveuses

La synchronisation peut se faire de façon naturelle mais elle nécessite un grand nombre de femelles pour que, finalement, seul un petit nombre d'entre elles se révèlent réellement synchronisées. Elle est donc induite de façon artificielle.⁷⁸

Généralement la synchronisation est réalisée grâce à un traitement basé sur les éponges de P4 et grâce à l'injection d'hormones gonadotropes.⁷⁹ Une injection d' eCG venant compléter le traitement progestatif, est réalisée au retrait de l'éponge vaginale.

Le traitement débute le même jour que celui des donneuses afin qu'elles se trouvent au même stade physiologique au moment de la transplantation embryonnaire.⁸⁰

Les femelles entrent alors en chaleur en moyenne 36 heures plus tard. La dose à injecter est difficile à fixer car elle dépend de la race, de la saison, de la prolificité naturelle et de l'état physiologique.⁸¹

La synchronisation doit présenter une marge maximale de 24 heures entre l'état de développement de l'embryon et le moment du cycle de la brebis receveuse, afin de réaliser un transfert efficace.⁸²

De nombreuses variables peuvent influencer le taux de fécondité chez les receveuses; les variables principales sont le degré de synchronisation, le taux d'ovulation des donneuses et des receveuses, l'état de développement des embryons transférés, le temps écoulé depuis le dernier agnelage, l'âge des donneuses, le taux de P4 chez les receveuses.⁸³

III.6 Le transfert d'embryons

Le transfert d'embryons au stade morula ou blastocyste est effectué dans l'utérus d'une femelle receveuse dont l'oestrus a été préalablement synchronisé afin que l'état physiologique de la brebis corresponde à l'âge des embryons à transférer.

Cette opération est réalisée très rapidement (3 minutes par receveuse) par laparoscopie sous anesthésie locale et avec la même efficacité (70 à 75% de taux de gestation) que par laparotomie.⁸⁴ Le transfert est souvent réalisé avec 2 ou 3 embryons car c'est le nombre optimal pour avoir la chance d'observer une gestation ou des jumeaux.⁸⁵

⁷⁸ Murray.,1978

⁷⁹ Armstrong et Evans.,1983

⁸⁰ Brebion *et al.*,1992

⁸¹ Brebion *et al.*,1992

⁸² Murray.,1978

⁸³ Alabarrt *et al.*,1995

⁸⁴ Baril *et al.*,1993

⁸⁵ J-L.Bister.,2001

On peut transférer des embryons en frais ou congelés. En effet le taux de gestation observé n'est pas significativement différent entre les embryons transférés en frais, après congélation ou après vitrification.⁸⁶

Le taux de survie des embryons se définit comme la proportion d'embryons transférés résultant en agneaux à terme.⁸⁷ Ce taux peut être influencé par différents facteurs:

- La méthode de transfert: Lorsque cela se révèle possible, il vaut mieux utiliser les techniques non-chirurgicales. En effet, les risques de rejet d'embryons encourus pour la brebis receveuse sont moins élevés. Les risques d'infections moindres. De plus les adhérences qui peuvent se former lors de la cicatrisation pourraient diminuer la fécondité de la brebis pour le transfert suivant.
- Le stade de développement de l'embryon : de nombreux travaux ont montré que le taux de survie augmente avec le stade de développement de l'embryon lors de la congélation. Les taux de survie les plus élevés sont obtenus pour les blastocystes sortis de la zone pellucide, mais à ce stade, ils ne sont plus protégés par la zone pellucide et ne peuvent donc être utilisés pour des raisons sanitaires.⁸⁸

Le taux de survie sera plus élevé pour les embryons avancés en âge par rapport à l'utérus de la receveuse. Par exemple, le taux de survie est plus élevé pour un embryon de jour 4 transféré dans un utérus au jour 4 qu'un embryon de jour 3.

Le transfert se fait sous endoscopie. Deux ou trois embryons sont généralement transférés dans la même corne utérine et du côté qui présente le plus grand nombre de corps jaunes. On évite de transférer des embryons si l'ovaire ne présente pas de corps jaunes car cela montre que la brebis n'a pas ovulé et donc que l'utérus ne se prépare pas à recevoir un embryon. La chance qu'un embryon s'accroche à l'utérus est faible et même nulle. Les embryons sont contenus dans une paillette et sont introduits dans les cornes utérines grâce à une aiguille stérile.

⁸⁶ Cognié.,1993

⁸⁷ Mc Melon et Hall.,1994

⁸⁸ Chemineau *et al.*, 1986; Li *et al.*, 1990

Première expérience

I. Les animaux réservés à l'expérience

1. Les donneuses

Nous avons utilisé un groupe de 30 brebis de race Texel.

Elles sont sélectionnées en fonction de leur âge (il faut qu'elles aient atteint la maturité sexuelle, 10-12 mois minimum).

Il est aussi plus aisé de choisir des brebis qui ont déjà agnelé afin d'être assuré de leur fécondité.

Liste des brebis superovulées:

Numéro	N° Sanitel	Date de naissance	Dernier agnelage	Type de traitement
1	4043	23.03.99	04.03.02	Eponge
2	4036	16.04.99	28.02.02	Eponge
3	4020	16.12.98	01.03.02	Buséréline
4	4035	30.03.99	01.03.02	Buséréline
5	4023	12.04.99	18.03.02	Tévérélix
6	4048	24.03.99	03.05.02	Tévérélix
7	4011	11.03.98	28.02.02	Eponge
8	5347	04.03.98	28.02.02	Eponge
9	4042	17.03.99	19.03.02	Buséréline
10	4021	12.03.99	24.02.02	Buséréline
11	5300	13.03.97	01.03.02	Tévérélix
12	4024	28.04.99	06.05.02	Tévérélix
13	4008	13.03.98	22.02.02	Eponge
14	4032	19.03.99	01.03.02	Eponge
15	5271	05.03.96	04.03.02	Buséréline
16	7278	08.10.97	24.02.02	Buséréline
17	7111	27.03.00	06.05.02	Tévérélix
18	7211	23.01.01	17.03.02	Tévérélix
19	7282	19.03.97	07.04.02	Eponge
20	7230	19.02.01	-----	Eponge
21	7224	10.02.01	-----	Buséréline
22	7226	28.02.01	-----	Buséréline
23	7110	16.04.01	28.02.02	Tévérélix
24	7168	01.01.98	11.03.02	Tévérélix
25	7222	07.02.01	-----	Eponge
26	7231	23.01.01	-----	Eponge
27	7225	10.02.01	-----	Buséréline
28	7232	28.01.01	-----	Buséréline
29	7271	01.01.98	28.02.02	Tévérélix
30	7277	10.03.98	19.12.02	Tévérélix

2. Les receveuses

Pour le transfert des embryons, 20 brebis Suffolk-laitier issues de troupeau du C.R.O ont été choisies pour leur fertilité, pour leur taux de prolificité élevé et pour leur différence phénotypique avec la race Texel. Cette dernière caractéristique permet d'éliminer toute confusion entre un agneau obtenu par transfert d'embryons et un agneau propre à la brebis receveuse.

II. Plan expérimental

1. Distribution en 3 groupes:

- Le groupe contrôle : (C) a subi une stimulation hormonale exogène mais sans blocage de l'hypophyse (éponge de P4, injections de FSH et de LH).
- Le groupe B est traité avec de la Buséreline, agoniste de la GnRH, qui inhibe l'hypophyse si elle est administrée en excès. (Réceptal® N877-373)
- Le groupe C est traité avec du Tévérélix, antagoniste de la GnRH. (Tévérélix®Sygena EP24332#379)

Les 30 brebis sont réparties en 5 groupes de 6 brebis afin de faciliter les différentes manipulations effectuées tout au long de l'expérience (endoscopie, I.A, collecte des embryons, etc.)

2. Traitements hormonaux des donneuses

A) Le groupe contrôle

J 1→J 7 : pose d'éponge Veramix®contenant 60mg de médroxyacétate de progestérone. Comme la brebis ne présente pas de cycle sexuel toute l'année, l'administration de P4 doit précéder l'ovulation.

Buts : - maintenir un taux élevé de P4 dans le sang qui engendre un rétrocontrôle négatif sur la production de GnRH, FSH et LF, bloquant ainsi tout nouveau cycle. Cela retarde le moment des chaleurs jusqu'à 48 heures après la fin du traitement et permet une synchronisation des donneuses.

- des doses élevées de P4 augmentent le nombre d'embryons transférables. C'est pourquoi malgré l'efficacité de 12 à 14 jours d'une éponge, celle-ci est remplacée le jour 7 par une nouvelle éponge jusqu'au jour 14.

⇒cette augmentation éventuelle du nombre d'embryons est la raison principale de l'utilisation d'éponges.

J 12→J 15 : La stimulation ovarienne dure 4 jours et est produite par l'injection de FSH et de LH en proportion décroissante.

Injection de FSH à raison de: 6 UA matin et soir au jour 12

5 UA au jour 13

3 UA au jour 14

2 UA au jour 15

La FSH employée est de la FSH purifiée, extraite d'hypophyse de porc. La FSH a pour rôle de développer l'ovaire et de favoriser la croissance des follicules ainsi que de préparer l'action de la LH. Les doses de FSH sont administrées de façon décroissante afin de mieux correspondre à l'environnement hormonal du follicule en croissance.

Un flacon de FSH contient 35 unités Armour et 17,5 ml de solvant y sont ajoutés. Une injection de 0,5 ml correspond à 1 unité.

J.15: Retrait de l'éponge

Injection de LH à raison de 60 μ g à 8 heures et de 90 μ g à 20 heures (en même temps que les 2 UA de FSH).

J.16: Injection de LH à raison de 3mg en intramusculaire, 16 heures après le retrait de l'éponge.

La LH utilisée est de la LH extraite de l'hypophyse de porc. La LH va contrôler la maturation finale en mimant la décharge ovulatoire de LH et engendrer l'ovulation.

La fiole de LH contient 3 mg de l'hormone purifiée. Puisque 6 ml de solvant y sont ajoutés, une injection de 1 ml de LH nécessite un prélèvement de 2 ml de la solution préparée.

J.17: Insémination artificielle in utéro.

J.23: Collecte des embryons et endoscopie des corps jaunes.

Congélation des embryons ou transfert en frais.

B) Le groupe traité à la Buséreline

Ces brebis subissent le même traitement de base, c'est-à-dire la pose d'une éponge Véramix® au jour 1 du traitement et changement de l'éponge au jour 7.

Jour 1: Pose d'une minipompe osmotique Alzet sous cutanée, sa capacité est de 2 ml et sa vidange de 0,2 ml/jour.

La dose indiquée pour une inhibition est de 50 μ g par jour

Les pompes sont remplies de 500 μ g de Buséreline dans 2 ml d'H₂O stérile et sont placées sous la peau au niveau de la nuque et insérées par une petite incision pratiquée sous anesthésie locale (linocaine).

Jour 12→jour 16: Traitement FSH et LH identique au groupe témoin.

Jour 17: retrait des pompes au moment de l'insémination artificielle.

C) Le groupe traité au Tévérélix

Ces brebis reçoivent du Tévérélix (antagoniste de la GnRH).

Jour 1: Mise en place des éponges Véramix®

Injection de la première dose de Tévérélix (il est mis en solution dans du Mannitol 5% en choisissant la concentration finale).

La première dose est de 1 mg.

Jour 7: Changement de l'éponge de P4.

2^{ème} injection de Tévérélix : 1 mg.

Jour 12 →16: Traitement hormonal FSH et LH comme pour le groupe A et le groupe B.

Dernière injection de Tévérélix le douzième jour : 0,5ml.

Des prises de sang sont effectuées du jour 1 jusqu'au jour de la collecte des embryons afin de réaliser ultérieurement une analyse de la variation du taux de FSH et de LH durant les différents traitements.

3. Traitement hormonal des receveuses

Les brebis receveuses doivent donc être synchronisées avec les brebis donneuses afin de recevoir les embryons frais, ou avec le développement embryonnaire lors d'un transfert d'embryons congelés.

La synchronisation se fait en deux étapes :

- Pose d'une éponge vaginale imprégnée de progestérogène : les éponges employées sont les mêmes que pour le traitement des brebis donneuses (éponge Véramix® contenant 60µg de médroxyacétate).
- La deuxième étape est une injection de 50 UI d'eCG, hormone extraite du sérum de jument en gestation qui va stimuler l'ovaire et favoriser l'ovulation. Au moment de l'injection, on enlève les éponges.

Insérer planning d'administration des traitements.

III. Techniques appliquées aux animaux

1. Observation des ovaires

Les ovaires sont observés une première fois par endoscopie avant le début des différents traitements.

- Principe de l'endoscopie : L'endoscopie permet d'explorer les cavités corporelles ou conduits naturels grâce à un système optique utilisant les propriétés de propagation de la lumière dans une fibre de verre. Le matériel constitue l'endoscope tandis que la laparoscopie désigne l'exploration de la cavité abdominale distendue par un pneumopéritoine, c'est-à-dire une insufflation d'air dans la cavité abdominale. Les brebis soumises à cette méthode sont à jeun depuis 24 h afin de réduire le volume de la vessie et des intestins. La brebis est positionnée en décubitus postal sur la table d'endoscopie, le ventre est désinfecté, une anesthésie locale est réalisée et un antibiotique est administré. L'arrière train de la brebis est élevé à 40° par rapport à l'horizontale. L'endoscope et la pince sont insérés dans l'abdomen, de part et d'autre de la ligne blanche via deux trous préalablement faits à l'aide d'un trocart. Les ovaires sont observés. Lorsque l'examen est terminé, les plaies sont refermées à l'aide d'agrafes et un spray cicatrisant d'aluminium est pulvérisé.

Le nombre de GF, MF et PF est compté et ils sont classés selon leur taille et leur aspect.

2. L'insémination

2.1 La récolte de sperme

Le sperme a été récolté par la technique du vagin artificiel sur les béliers du centre d'insémination et de sélection ovines (CISO, agrégation CIAO BEL 01) qui se situe à Faul-Les-Tombes. Différents béliers ont été prélevés.

Série 1 et 2 : Décontracté Du Brouck d'Omal – Texel. Né le 05/ 04 / 01.

Série 3 : Boris Van't Rozenaken – Texel. Né le 12/ 03/ 99.

Série 4 et 5 : Dartagnan – Texel. Né le 22/ 03/01.

Chacun de ces béliers possède une grande qualité de sperme. La motilité est comprise entre 4,8 et 4,9 et la concentration de spermatozoïdes entre 2,8 milliards et 3,5 milliards par ml. Le sperme est dilué dans un milieu spécifique (DBB⁺) et est maintenu à une température proche des 30°C jusqu'au moment de l'insémination.

2.2 L'insémination intra-utérine.

L'insémination est réalisée le jour 17 du traitement.

La brebis est positionnée en décubitus dorsal sur une table d'endoscopie. La parie inférieure de la paroi abdominale est tondu et désinfectée à l'aide d'iso-bétadine. Deux injections sous-cutanées et intra-musculaires sont effectuées avec 1 ml de lignocaïne (référence IC KELA 97K24/4658) afin de réaliser une anesthésie locale. L'arrière train de la brebis est alors surélevé par rapport à l'avant en vue d'éviter que les viscères de la brebis ne cachent le tractus génital. Deux trocarts sont utilisés afin de percer la paroi abdominale et de parvenir aux ovaires. De l'air sec est insufflé dans la cavité abdominale afin d'optimiser la visibilité. Un endoscope est introduit dans le premier trou et le deuxième orifice permet d'insérer le pistolet d'insémination qui contient une paillette de sperme. Chaque corne utérine reçoit la moitié du contenu de la paillette (100 millions de spermatozoïdes par brebis) grâce à une aiguille d'injection qui perce la paroi des cornes utérines. L'endoscope a aussi permis de visualiser les ovaires afin d'estimer la réponse folliculaire au traitement hormonal.

Lorsque l'insémination est terminée, les instruments sont extraits de la cavité abdominale et les orifices sont refermés à l'aide d'agrafes. Un spray cicatrisant est appliqué sur la plaie afin d'aider à la cicatrisation.

Une injection intra-musculaire d'antibiotique est effectuée (Duphaphen, Pénicilline) afin de prévenir de toute infection.

3. Collecte des embryons

3.1. Collecte chirurgicale

La collecte a eu lieu le jour 23 ce qui correspond au 6^{ème} jour de développement de l'embryon. Il doit alors se trouver au stade blastocyste.

La brebis est mise sur la table d'endoscopie. Le bas ventre de la brebis est tondu, désinfecté, anesthésié et recouvert d'un champ.

Les ovaires sont d'abord observés par endoscopie pour compter le nombre de corps jaunes car si on n'en dénombre pas, la collecte n'a pas lieu.

Si la collecte se fait, une incision est pratiquée le long de la ligne blanche permettant l'externalisation du tractus génital. Une aiguille à multiples trous est introduite dans l'extrémité de la corne près de l'oviducte et l'autre extrémité de la corne est pincée manuellement afin d'empêcher toute fuite du liquide de récolte. L'aiguille est reliée à un tube de récolte et 20 à 30 ml de PBS (à 39°C) sont injectés à la base de la corne et récupérés par le tuyau de récolte dans un petit pot maintenu à 39°C.

Une fois la récolte terminée, le tractus génital est replacé dans la cavité abdominale et 5 ml de pénicilline sont introduits dans la cavité. L'incision est suturée et du spray d'aluminium est vaporisé sur la plaie.

Cette technique est fort invasive et après quelques récoltes par cette technique, nous en avons tenté une autre moins traumatisante, la récolte par laparoscopie.

3.2 La collecte par laparoscopie

Cette méthode est beaucoup moins invasive. L'animal est placé en décubitus dorsal sur la table d'endoscopie. La partie basse de son abdomen est anesthésiée grâce à une injection de 2 ml de Lignocaïne en sous-cutané et intramusculaire. Une injection de 5 ml de Duphaphen® est effectuée à titre préventif. Une première incision, réalisée à 4-5 cm de la mamelle et à +/- 10 cm de la ligne blanche, est pratiquée à l'aide d'un trocart afin de placer une canule (diamètre 7 mm) recevant l'endoscope. Une seconde canule (5 mm) est placée de l'autre côté de la ligne blanche afin d'y introduire une pince atraumatique pour la manipulation du tractus génital.

Après avoir insufflé de l'air dans la cavité abdominale, une troisième canule (5 mm) est placée contre la ligne blanche permettant le passage de la sonde à 3 voies dont l'extrémité est introduite au lieu de ponction. L'utérus est percé à l'aide d'un petit trocart (2 mm) en vue de permettre le passage de l'aiguille de la sonde.

Le ballonnet fixé sur la sonde est gonflé d'air ou de liquide afin d'obstruer la lumière utérine à la base de la corne. L'extrémité du cathéter inséré dans le corps de la sonde est amené le plus près possible de la jonction utéro-tubaire. La pince est refermée sur l'isthme afin d'éviter la remontée du milieu de collecte dans l'oviducte. Le milieu de collecte est injecté à raison de 40 à 50 ml par corne. La pression créée à l'intérieur permet le retour de milieu de collecte par le milieu du cathéter. Le milieu de récolte est composé d'OCM (Oocyte Culture Medium) qui est un milieu nutritif permettant de maintenir les embryons en vie entre la collecte et la vitrification.

Une fois la collecte effectuée sur les deux ovaires, les petites incisions sont refermées à l'aide d'agrafes, un spray d'aluminium est vaporisé sur la plaie.

4. Vitrification des embryons

Le PBS récolté est versé dans une boîte de Pétri dont le fond est quadrillé pour se repérer plus facilement lors de la recherche au binoculaire. Toute la boîte de Pétri est observée au binoculaire plusieurs fois afin de récolter les éventuels embryons qui s'y trouvent. Si un embryon est repéré, il est aspiré à l'aide d'une unopette (petit capillaire inséré au bout d'une seringue à tube). Il est placé dans un bain d'OCM qui est un milieu nutritif permettant de conserver l'embryon en attendant d'en trouver un deuxième. En effet généralement, on congèle les embryons par 2.

Ils vont ensuite subir une succession de bains différents afin de les conditionner pour les immerger dans l'azote liquide.

- Le premier bain est un bain d'OCM et de glycérol 10% dans lequel les embryons sont placés durant 5 minutes.
- Le deuxième bain est un bain d'OCM contenant du glycérol 10% et de l'éthylène glycol 20%.
- Le troisième bain est une solution d'OCM contenant du glycérol 25% et de l'éthylène glycol 25%. L'embryon ne peut pas baigner plus de 30 secondes dans ce bain. Cette solution va le protéger de la formation de cristaux d'eau mais elle présente une certaine toxicité.
- Les embryons sont ensuite placés dans une paillette de conservation numérotée.
La paillette contient dans l'ordre: - bouchon d'usine
 - galactose
 - bulle d'air
 - embryons
 - bulle d'air

- OCM+glycérol 25%+éthylène glycol 25%
- bulle d'air
- galactose
- poudre d'alcool polyvinylique
- La paillette est rapidement plongée dans l'azote liquide pour la conservation. Les paillettes sont conservées dans une cuve contenant de l'azote liquide à -196°C .

Seuls les embryons provenant des deux premières séries vont subir la vitrification puisque les autres seront transférés en frais.

5. Le transfert des embryons

Il été décidé de transférer uniquement les embryons en frais (2 par receveuse). En effet, le dernier transfert d'embryons congelés n'a entraîné aucune gestation chez les brebis receveuses. Nous espérons optimiser le taux de gestation en agissant de cette manière.

La brebis receveuse synchronisée est placée sur la table d'endoscopie. La paroi abdominale est rasée, désinfectée et anesthésiée. La peau est perforée en 2 endroits de part et d'autre de la ligne blanche. Deux instruments y sont introduits : l'endoscope qui permet la visualisation des ovaires afin de vérifier si ceux-ci possèdent des corps jaunes ainsi qu' une pince atraumatique qui permet de maintenir la corne utérine. Cette dernière est perforée avec une aiguille. Les embryons contenus dans le capillaire de l'unopette sont alors injectés dans la corne utérine. Le matériel d'endoscopie est enlevé, les incisions refermées à l'aide d'agrafes et un spray d'aluminium aidant à la cicatrisation est vaporisé sur les plaies. Afin d'éviter toute infection, une dose d'antibiotique (2 ml) est injectée en intramusculaire à la brebis.

6. Diagnostic de gestation

Les techniques de diagnostic de gestation permettent la vérification de l'état de gestation des brebis receveuses.

Aucun dosage n'a été effectué, seule une échographie a eu lieu 40 jours après le transfert des embryons.

7. Dosages hormonaux

Durant toute l'expérience, des prises de sang journalières ont été effectuées afin d'évaluer les variations de FSH et de LH. Grâce à ces dosages nous pourrons vérifier et quantifier en quelles proportions les traitements inhibiteurs ont été efficaces.

7.1 La prise de sang

Les prises de sang sont réalisées tous les jours, si possible à intervalles réguliers (tous les matins). Un garrot est placé à la base du cou permettant de mettre en évidence la veine jugulaire. Une aiguille est introduite dans cette veine, le sang est recueilli dans des tubes qui contiennent une goutte d'héparine (5000 UI/ml) afin d'éviter la coagulation.

Les tubes sont centrifugés durant 15 minutes à 3000 tours afin de récupérer le plasma. Celui-ci est conservé à -20°C .

7.2 Le dosage

Le principe du dosage repose sur la compétition entre l'hormone à analyser et une quantité connue d'hormone marquée pour la fixation avec un antisérum spécifique. La quantité d'antisérum est connue et est mélangée avec l'hormone à analyser :



H° : hormone froide

A : Antisérum

On ajoute alors l'hormone marquée par la fixation d'un ou de plusieurs atomes radioactifs et l'on obtient:



H^* : hormone marquée.

On se retrouve donc avec une hormone sous 2 formes :

-une fraction libre (H° et H^*)

-une fraction liée à l'anticorps ($H^{\circ}.As$ et $H^*.As$)

La méthode utilisée pour séparer les phases libres des phases liées est la technique de double anticorps. Il s'agit de précipiter le complexe hormone-anticorps par fixation sur des antigamma-globulines le lapin (ARGG).

En connaissant la quantité d'antisérum et d'hormones marquées utilisées, il est possible d'établir des courbes d'étalonnages qui donnent la quantité d'hormones présentes initialement dans l'échantillon en fonction de la quantité d'hormones non marquées liées à l'antisérum à la fin de la réaction.

La courbe d'étalonnage est obtenue en appliquant la méthode à une série de solutions d'hormone de concentrations connues. La comparaison des résultats obtenus pour l'hormone à tester et la courbe standard permettent de déterminer la concentration en hormone du plasma. Pour le calcul des valeurs, les points de la courbe standard sont introduits dans un logiciel de fitting de calcul (MATLAB R12) qui calcule les paramètres de la formule correspondant à un équilibre entre deux hormones (H° et H^*) pour leur fixation sur un antisérum spécifique:

$$A = A_o (C_m / (C_m + C_f)) + BG$$

A : radioactivité mesurée de la phase liée

A_o : radioactivité lorsque la concentration en hormone froide est nulle (-BG)

C_m : concentration en hormone marquée

C_f : concentration en hormone froide

BG : radioactivité non spécifique

7.3 Protocole du dosage de la FSH

Les produits utilisés sont présentés dans les tableaux ci-joints :

- 1) Un échantillon de plasma de 50 μ l est mélangé avec 50 μ l d'anticorps spécifiques (AFPC 288113 avec un taux de dilution finale de 1: 80.000). On laisse incuber 4 heures.

- 2) On ajoute 50 μl d'hormones marquées (20 000 cpm). On vortexe pour assurer un bon mélange et on laisse la réaction agir durant une nuit entière. L'hormone est marquée à l' I^{125} par la technique d'oxydation à la chloramine T.
- 3) Le second anticorps (ARGG) est ajouté en solution tampon avec PEG (6%) et cellulose (0,5%) à raison de 250 μl . On laisse de nouveau reposer durant 4 heures.
- 4) Les tubes sont centrifugés durant 15 minutes à 3000 tours/minute. Le surnageant est éliminé à la trompe à vide, le culot resuspendu dans du tampon phosphate et recentrifugé.
- 5) Le surnageant est éliminé et le culot est analysé dans un compteur LKB Wallar 1277 GammaMaster à passeur d'échantillon.

7.4 Protocole du dosage de la LH

Les produits utilisés pour le dosage se trouvent dans les tableaux ci-joints.

Le protocole est identique à celui du dosage de FSH.

- 1) On prélève 50 μl de plasma auquel on ajoute 50 μl d'anticorps de LH (NIA DDK-anti oLH, dilution de 1/100) On laisse poser 4 heures.
- 2) On ajoute 50 μl de LH marquée à l' I^{125} , on vortex et on laisse une nuit à température ambiante.
- 3) Le second anticorps (ARGG) est incorporé (250 μl) et on attend 4 heures.
- 4) L'ensemble est centrifugé durant 15 minutes à 3000 g.
- 5) On laisse décanter et on passe l'échantillon 1 minute au compteur gamma.

Deuxième expérience
Culture de follicules in vitro

1. Objectifs

Suite aux résultats obtenus lors de la stimulation ovarienne après inhibition hypophysaire par la Busérelina ou le Tévérélix, un essai sur les follicules in vitro a été programmé. Il a pour but de voir si ces inhibitions hypophysaires ont également un effet direct sur les follicules, ce qui pourrait expliquer la faible reprise ovarienne enregistrée.

2. Méthode

Des ovaires de brebis sont prélevés à l'abattoir d'Anderlecht, conservés dans un milieu de culture M199 à 0°C (immergés dans de la glace). Les ovaires sont ramenés au laboratoire et disséqués à l'aide de petits ciseaux de microchirurgie. Les follicules d'un diamètre apparent de 4-5 mm sont récoltés pour l'expérience.

Le temps écoulé entre le prélèvement des ovaires et la mise en culture ne peut pas excéder les 3-4 heures afin de maintenir les follicules dans un état optimal.

Les follicules sont périfusés et le milieu de perfusion est récolté toutes les 30 minutes.

La perfusion se déroule comme suit:

- 0.00 : Mise en culture des follicules, périfusion avec du TMC 199
- 1.00-1.30 : Stimulation des follicules par : -groupe témoin: TCM 199
-groupe Tévérélix: du Tévérélix (0,2µl/ml et du TCM 199
-le groupe Busérelina: de la Busérelina (0,2 µl/ml) et du TCM 199
- 1.30-1.50 : Stimulation par oLH (10 ng/ml)
- 2.00-2.30 : Stimulation par oFSH (15 ng/ml)
- 3.00-6.00 : Récolte du milieu de culture perfusé par du TCM 199.

Les différents échantillons de périfusion seront analysés pour l'E2 et la P4 sécrétés par les follicules.

3. Le matériel

La technique utilisée est la périfusion. Les follicules sont maintenus à température idéale (39°C) dans des petites chambres placées dans un bassin thermostatique. (voir schéma du système)

Le fond du bassin est percé de plusieurs trous où s'adaptent des bouchons de caoutchouc. Des seringues de 5 ml y sont plantées grâce à des aiguilles qui les traversent. Ces seringues servent de chambres de cultures. Le fond des seringues est tapissé par un filtre afin d'éviter l'obstruction de la seringue par les follicules.

Ces seringues sont refermées hermétiquement par des bouchons en caoutchouc percés d'un petit trou dans lequel débouche un tuyau contenant le liquide de perfusion.

L'hermétisme du système permet une périfusion dans un niveau constant de milieu de culture (environ 1 ml).

La thermostatation et l'homogénéisation du bassin sont assurées par une pompe THERMOMIX 1441.

La périfusion du milieu de culture est réalisée grâce à une pompe péristaltique WATSON-MARLOW 501 qui produit un débit approximatif de 0,075 ml/minute dans chaque seringue. Le milieu périfusé est recueilli par fraction dans des tubes toutes les 30 minutes.

4. Traitement

Trois groupes de 5 follicules sont formés pour chacun des 3 traitements, leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau A.

Tableau A: Caractéristiques des follicules périfusés in vitro

Traitement	Follicules	Poids(gr)	Diamètre (mm)
Témoin	1	0,1569	6
	2	0,1180	5
	3	0,0385	4
	4	0,0144	2
	5	0,0165	2
Tévérélix	6	0,1570	6
	7	0,1044	5
	8	0,0399	4
	9	0,0226	3
	10	0,0202	2
Buséréline	11	0,1032	6
	12	0,0877	5
	13	0,0202	3
	14	0,0158	3
	15	0,0150	2

Remarques : - les concentrations en Tévérelix et Buséréline auxquelles ont été soumis les follicules ont été calculées par rapport à celles qui étaient produites dans le sang des brebis lors de traitement in vivo.
 - Les ovaires collectés à cette période de l'année ne portaient que peu de follicules de taille optimale (4 à 6 mm). Dès lors, de plus petits follicules ont également été disséqués, et la répartition a été effectuée de manière homogène en fonction des traitements.

I.Première expérience Essai de superovulation
--

1. Introduction

Rappelons que dans le cadre de cette expérience nous avons testé différentes étapes du traitement de superovulation :

- essai de blocage de l'hypophyse par 2 techniques : -agoniste du GnRH en excès
-antagoniste du GnRH
- stimulation réalisée par le complexe FSH-LH.
- nous avons aussi testé différentes techniques de collecte d'embryon.

2. Résultat du blocage de l'hypophyse

Les traitements à la Buséreline et au Tévérélix avaient pour but de bloquer les sécrétions hypophysaires ce qui devait entraîner la disparition des gros follicules (GF), la multiplication des petits follicules recrutables (PF) et favoriser la disparition des MF.

Les résultats (tableau A) montrent effectivement une diminution significative du nombre de GF à la surface des ovaires. (figure 1)

Tableau A: moyenne du nombre de GF et MF après le traitement inhibiteur

Moyennes du nombre de GF et de MF			
	témoin	Buséreline	Tévérélix
Avant traitement	GF :2,9 MF :14,7	GF :1,9 MF :12,7	GF :2,2 MF :15,2
Après blocage	GF :6 MF :16,3	GF :0,3 MF :11,6	GF:1,2 MF:14,6

- Pour le groupe contrôle, la moyenne du nombre de GF est supérieure à celle obtenue lors de la première endoscopie de contrôle. Sauf pour une brebis qui n'en avait qu'un et n'en présentait plus après cette période.
On observe que toutes les brebis témoins ont un nombre égal ou plus élevé de GF, qu'avant la pose de l'éponge vaginale de P4.
- Pour le groupe Buséreline, le nombre de gros follicules est pratiquement nul (0,33)
Toutes les brebis se retrouvent avec 0 GF sauf une qui en a encore 2. La comparaison, avec le groupe contrôle, montre que la diminution des GF est hautement significative ($P < 0,01$) par rapport au nombre de GF du groupe témoin. Il semble que l'inhibition de la Buséreline sur les GF est efficace.
La moyenne de MF avant (12,7) et après (11,60) n'est pas significativement différente ($P > 0,05$). On devrait avoir une baisse du nombre de MF, puisque les hormones gonodotropes sont inhibées et que les MF se développent sous influence de ces hormones. Comparativement au groupe témoin, il n'y a aucune différence significative entre les 2 groupes. Il semble donc que ces petits MF (3 mm) se développent également sans l'influence des hormones.
Pour savoir si l'inhibition de la Buséreline a permis d'accumuler des PF, il a fallu effectuer une étude de la population folliculaire car il était impossible de dénombrer le nombre exact de PF sur chaque ovaire. Nous avons donc établi une nomenclature comme suit: + = environ 5 PF

: + + = environ 10 PF

: + + + = environ 15 PF (voir figure 1)

On trouve une moyenne de 16, celle-ci est plus élevée que pour le groupe contrôle (+/- 12 PF), on peut donc supposer que l'inhibition engendrée par la Busérelina permet le recrutement des petits follicules.

- Pour le groupe Tévérélix, le nombre moyen de GF avant le traitement est de 2,2 et il descend après l'inhibition à 1,33, ce qui fait une diminution de 40% du nombre de GF. Par rapport au groupe C, le nombre de GF du groupe T est fortement diminué et cela de manière hautement significative ($P < 0,01$).

Pour les MF, la moyenne avant et après traitement passe de 15,2 à 14,6. De nouveau, la diminution moyenne du nombre de MF est faible et non significative à $P < 0,05$. Comme pour la Busérelina, la différence entre le nombre de MF du groupe C et du groupe T n'est pas significativement différente. Il semble que le Tévérélix n'ait pas d'effet sur les MF.

Avec le Tévérélix, on obtient une moyenne de 16 PF, ce nombre est plus élevé que pour le groupe C mais reste inférieur au groupe B.

Il semble que le Tévérélix permette aussi un recrutement des PF.

⇒ Le nombre de GF semble effectivement diminué grâce à la technique de l'inhibition

3. Effet de la stimulation ovarienne

Après la stimulation ovarienne pratiquée avec de la FSH et de la LH, on dénombre la quantité de GF. Ce nombre est primordial puisque seuls les GF sont propices à l'ovulation et donc susceptibles d'être fécondés par les spermatozoïdes lors de l'insémination artificielle. Les valeurs obtenues après visualisation par endoscopie sont reprises dans le tableau B ci-dessous. (figure 2)

Tableau B : Population folliculaire après stimulation FSH-LH exogène

Moyenne des GF et des MF après stimulation			
	Témoin	Busérelina	Tévérélix
GF	11,1 +/-4,4	5,5 +/- 4	8,0 +/-4,8
MF	4,1 +/-4,4	3,9 +/- 4,9	5,3 +/-5,7

3.1 Résultats pour les différents traitements

3.1.1 Le groupe contrôle

Les follicules observés sont pour la grande majorité des follicules pré-ovulatoires. Seule la brebis 7 possède 1 GF en ovulation et une jeune ovulation de 2 à 3 heures. Cette brebis montre un premier pic de LH au jour 15 (3 jours avant l'injection de LH exogène) cela peut expliquer pourquoi cette brebis avait déjà ovulé lors de l'IA.

De plus l'insémination a lieu 52 heures après l'arrêt du traitement progestatif. Or l'ovulation peut se produire en moyenne 54 à 58 heures après la fin du traitement mais cette moyenne peut avoir une certaine variabilité.

L'analyse de la population folliculaire (figure 1 a) montre que la taille des follicules est majoritairement comprise entre 7 et 8 mm (les follicules de cette taille sont susceptibles d'ovuler) mais certains follicules ont une taille inférieure à 6 mm et n'ovuleront jamais.

3.1.2 Le groupe Buséréline

Après la stimulation FSH-LH, les petits follicules qui se sont développés doivent être recrutés et se développer sous l'influence des hormones FSH et LH.

Le nombre de GF doit donc être plus élevé que celui du groupe contrôle.

Sur 56 GF obtenus, seuls 30 sont au stade pré-ovulatoire et donc propices à ovuler.

La variabilité entre chaque brebis est fort importante, il semble néanmoins que les séries n°1 et 2 (brebis 3, 4, 9 et 10) n'aient pas réagi au traitement de superovulation.

La différence par rapport au groupe C est hautement significative ($P < 0,01$), cette différence est à l'inverse de ce qui était attendu. Le nombre de GF est significativement plus faible que le nombre de GF du groupe C.

On avait 48 PF et 116 MF après l'inhibition et on obtient 53 GF qui sont susceptibles d'ovuler. On peut donc penser qu'un grand nombre de PF et de MF ont été stimulés par le complexe d'hormones exogènes (FSH-LH).

3.1.3 Le groupe Tévérelix

Pour ce groupe la superovulation a donné de meilleurs résultats:

Sur 80 GF obtenus, il y a 65 GF pré-ovulatoires. Ce qui fait 81% de GF aptes à l'ovulation sur la totalité de GF obtenus. Ceci donne une moyenne de 6,3 GF pré-ovulatoire/brebis.

Par rapport au groupe C, la différence n'est pas statistiquement significative en ce qui concerne le nombre de GF.

Aucune brebis n'a ovulé lors de l'insémination, ce qui prouve que l'hypophyse a bien été bloquée lors du traitement et qu'aucun follicule n'a pu évoluer jusqu'au stade pré-ovulatoire avant l'injection de LH exogène qui a provoqué la maturation finale.

4. Résultats du taux d'ovulation

Le taux d'ovulation équivaut au nombre de corps jaunes observés lors de la récolte des embryons.

Le tableau ci-dessous reprend les taux d'ovulation de chaque brebis et la moyenne pour chaque groupe.(Figure 3)

Tableau C : Taux d'ovulation des différentes brebis

Bre bis	Traitement	T.O	Moyenne
1	Contrôle	5	
2		17	
7		1	
8		4	
13		10	
14		14	
19		12	
20		19	
25		0	
26		13	9,5 +/- 6,6
3	Buséréline	1	
4		0	
9		6	
10		2	
15		4	
16		3	
21		1	
22		6	
27		2	
28		9	3,4 +/- 2,8
	Tévérélix	10	
22		10	
23		3	
24		2	
25		4	
26		4	
27		11	
28		1	
29		8	
30		5	5,8 +/- 3,6

TO: taux d'ovulation

4.1 Le groupe témoin

Le taux d'ovulation moyen est de 10,6 (sans tenir compte de la brebis 25 qui ne présente pas de corps jaunes). Toutes les brebis ont une quantité de corps jaunes égale ou supérieure au nombre de GF pré-ovulatoires, cela prouve que la stimulation de la LH a eu l'effet attendu en engendrant l'ovulation et a même influencé des follicules plus petits car le nombre de GF entre 7 et 8 mm n'était que de 87 et le nombre de CJ atteint 95.

Seules les brebis 7 et 8 se retrouvent avec un taux d'ovulation nettement inférieur au nombre de GF pré-ovulatoires (11).

Ces brebis semble avoir eu un problème car déjà lors de l'insémination elles présentaient des traces d'ovulation fraîches, comme une partie des follicules ont ovulés à l'avance, il est logique qu'au moment de la récolte le nombre de corps jaunes soit moindre.

Il semble donc que des pics de LH endogènes aient été émis avant la stimulation par la LH exogène.

4.2 le groupe Buséréline

Le taux d'ovulation moyen est de 3,7 par brebis (sans tenir compte de la brebis qui n'a pas ovulé). On obtient donc un taux d'ovulation nettement inférieur à la moyenne attendue selon Baril et al (2001) mais on ne pouvait pas s'attendre à un résultat beaucoup plus important puisque le nombre de GF préovulatoires était déjà le plus faible des 3 méthodes.

Sur 53 GF préovulatoires, seul 36 CJ sont dénombrés (voir tableau). Il faut attendre l'analyse du taux de LH pour savoir si celle-ci a bien engendré un pic après son administration.

La différence avec le groupe C est hautement significativement ($P < 0,001$) inférieure.

4.3 Le groupe Tévérélix

Le taux d'ovulation moyen est de 5,8 corps jaunes par brebis. La moyenne pour les GF préovulatoires est de 6,3 par brebis. Une fois de plus, on est sous le seuil attendu compris entre 8 et 14.

Sur 80 GF, 58 ont ovulé.

La différence avec le groupe témoin n'est pas significative ($P < 0,05$). Le traitement avec du Tévérélix semble aussi efficace que la pose d'une éponge de P4 mais sa supériorité n'est pas mise en évidence.

⇒ Si l'on compare le groupe B au groupe T, on pourrait émettre l'hypothèse que le traitement à base de Tévérélix fonctionne mieux que celui à base de Buséréline, mais l'étude statistique démontre qu'aucune différence significative ne peut être mise en évidence.

5. Résultats du nombre d'embryons récoltés

Toutes les brebis n'ont pas subi une récolte, seules les brebis ayant un nombre de corps jaunes significatif ont été reprises pour la récolte.

5.1 Résultat du groupe témoin

Brebis	1	2	7	8	13	14	19	20	25	26
N.E	--	0	--	--	0	0	--	2	--	--
T.réçu	--	0	--	--	0	0	--	10,5	--	--

N.E: nombre d'embryons

T.réçu: taux de récupération (en %)

Le nombre moyen d'embryons est de 0,5

Le taux de récupération moyen est de 1,1%.

Ce taux est fort faible par rapport à d'autres expériences déjà réalisées. Malgré la grande variabilité de la réponse ovulatoire chez chaque brebis; une étude (Brebion et al.,1992)menée sur des brebis, avec le même traitement, permet d'obtenir entre 5 et 20 embryons par brebis.

5.2 Le groupe Buséréline

Brebis	3	4	9	10	15	16	21	22	27	28
E.R	--	--	2	--	0	--	--	0	--	0
T.réçu	--	--	33,3	--	0	--	--	0	--	0

Le nombre moyen est de 0,5 embryon par brebis.

Le taux de récupération moyen, en ne considérant que les 4 brebis qui ont subi une récolte d'embryons, est de 8,3%.

On ne récupère aucun embryon chez les brebis 15, 22 et 28 alors qu'elles avaient respectivement 4, 6 et 9 corps jaunes.

5.3 Le groupe Tévérélix

Brebis	5	6	11	12	17	18	23	24	29	30
E.R	0	2	--	--	--	0	2	--	0	--
T.réçu	0	20	--	--	--	0	18,2	--	0	--

Le nombre moyen d'embryon par brebis est de 0,8.

Le taux de récupération moyen (en tenant compte des brebis 5, 6, 18, 23 et 29) est de 7,6%.

Il est évident que vu le nombre de corps jaunes (187), nous aurions du récupérer plus d'embryons que les 8 obtenus.

6. Résultat du transfert d'embryons

Les embryons récoltés chez les 2 premières séries ont subi une vitrification. Ils n'ont pas été réimplantés chez des brebis receveuses, le but était uniquement de s'exercer à la technique de vitrification.

Les 4 embryons récoltés dans les trois dernières séries pouvaient être réimplantés, mais seuls deux embryons ont pu l'être car les deux autres n'étaient pas de très bonne qualité. Le premier n'avait pas un développement assez avancé par rapport au stade de développement de l'utérus de la brebis receveuse et le second présentait des malformations.

Le premier embryon transféré provient de la brebis 20 (groupe témoin) chez qui on a récolté 2 embryons.

L'embryon a été transféré chez la brebis Suffolk-laitier n° 2201.

Le deuxième embryon provient de la brebis 23 (groupe Tévérélix).

Logiquement il est préférable de transférer les embryons par paires car le taux global de survie des embryons transférés par paires est supérieur aux taux de survie des embryons transférés seuls. Vu le petit nombre d'embryons récoltés, il était impossible de respecter cette condition de transfert. Un seul embryon par brebis a donc été transféré.

7. Evolution des hormones dans le sang

Les graphiques ci-joints représentent les variations de la FSH et de la LH, tout au long des différents traitements. Les prises de sang ont débuté deux jours avant la pose de l'éponge vaginale de P4 du début du traitement inhibiteur jusqu'au jour de la récolte embryonnaire.

Le premier jour des prises de sang est considéré comme le jour 1 de l'expérience.

Le Tévérélix a été administré les jours 3 (1 ml), 9 (1 ml) et 14 (0,5 ml).

La pompe de Buséreléline a été posée le jour 2 des prises de sang et elle va relâcher progressivement 40 µg par jour.

La FSH a été administrée en doses décroissantes du jour 14 au jour au jour 17 des prises de sang.

La LH est additionnée, à faible dose (0,06 et 0,09 mg), à la FSH le jour 17 afin de stimuler la stéroïdogénèse et préparer la maturation des follicules.

Le jour 18, la dernière dose de LH est injectée à 16H afin de mimer la décharge ovulatoire.

7.1 Dosage de la LH(voir graphiques ci-contre) pour le groupe Buséreléline

7.1.1 Analyse des variations de LH du jour 0 au jour 14 (figure 5 et 6)

Jour 2-jour 3 : La pompe de Buséreléline est placée, on observe le pic caractéristique du à une dose en excès de Buséreléline. Cette dose entraîne une superactivité de l'hypophyse et donc une forte et brusque libération de LH dont le taux est supérieur aux normes physiologiques comprises entre 1 et 5 ng/ml

Toutefois, 3 brebis présentent un pic qui restent dans les normes.

- La brebis n°4 dont le pic est à 3 ng/ml,

- La brebis n°10 qui ne présente pas de pic mais son taux de LH reste stable. de LH, il est possible que la pompe n'ait pas été correctement préparée et elle n'ait pas pu diffuser la Buséreléline.

La brebis n°9 présente une chute de LH et ensuite un léger pic à 1,5 ng/ml mais avec un jour de retard par rapport aux autre brebis.

Jour 4 - jour 14 : La chute du taux de LH devrait être immédiate et entraîner un taux inférieur à 1 ng/ml pour finir à une teneur en LH proche de 0. Lorsque l'on regarde le graphique, on remarque, dans un premier temps, que le taux de LH diminue pour chaque brebis mais qu'ensuite le taux de LH fluctue entre 0 et 2 ng/ml. L'inhibition de LH n'est pas total mais les taux diminuent du jour 4 au jour 14, jour du retrait des pompes. ne se fait pas totalement. .

Si on compare les traitement témoin/Buséreléline, on voit que le taux de LH (Buséreléline) ne descend jamais sous le seuil du taux physiologique de sécrétion de LH. Le but de ce traitement est normalement de permettre un contrôle exogène sur les sécrétions de LH en inhibant complètement les sécrétions endogènes.

Le niveau de sécrétion de cette hormone suit à la Buséreléline n'est pas significativement différent.

7.1.2 Variation de la LH du jour 15 au jour 25

la LH est injectée au jour 18 et engendre un pic de LH chez les brebis.

La seule à ne pas montrer de pic est la brebis 9. Il est certain que l'injection de LH n'a pas été effectuée correctement chez cet animal.

Si l'on compare le pic du groupe contrôle (Figure 4) et du groupe Buséreléline, on remarque que la moyenne des pics n'atteint pas le taux de LH du groupe contrôle. On obtient une moyenne de 6,5 ng/ml pour le groupe Buséreléline et une moyenne de 11 pour le groupe contrôle.

Ce phénomène est assez surprenant car la dose de LH administrée est identique pour les deux groupes, de plus la quantité endogène de LH au moment de l'injection est également identique, il est donc difficile de donner une explication plausible à cette grande différence.

Toutefois il se pourrait que le traitement inhibiteur désensibilise les récepteurs à la LH , que l'hyperactivité des premiers jours du traitement combinée à la grande sécrétion de LH bloquent les récepteurs à la LH.

7.2 Dosage de la FSH pour le groupe Buséréline.

7.2.1 Variations de la FSH du jour 0 à 18 (Figure 7)

Jour 1-jour 4 : Les pompes sont placées le jour 2 et dès ce moment on observe un « flair up ». Celui-ci est dû à l'hyperstimulation de l'hypophyse avant que l'excès d'agoniste n'entraîne une inhibition.

Seule la brebis 9 ne présente pas le pic de FSH correspondant à la pose de la pompe.

Jour 4-jour 10 : Le taux de FSH chute brusquement pour passer sous la barre des 10 ng/ml. Deux brebis continuent cependant à montrer une fluctuation du taux de FSH (brebis 4 et 10)

Le comparaison, au groupe contrôle (Figure 8), par analyse statistique ($P < 0,01$) montre une différence significative et que l'inhibition, obtenue après traitement à la Buséréline, semble efficace sur la libération de FSH.

Jour 14 - jour 18 : Toutes les brebis réagissent positivement à l'injection de FSH exogène. L'inhibition de la libération de FSH endogène est donc observée chez 80% des brebis testées. Cela devrait empêcher l'évolution des gros follicules et le recrutement des petits follicules.

7.3 Variations la LH pour le groupe Tévérélix (Figure 9)

7.3.1 Variations de la LH du jour 0 au jour 18

Jour 3 : Injection de la première dose de Tévérélix. On observe une légère chute du taux de LH pour la plupart des brebis, excepté pour les brebis 29 et 30 de la dernière série.

Le taux de LH atteint un niveau basal compris entre 0 et 0,5 ng/ml.

Les seules brebis à avoir une chute du taux de LH sans descendre sous la barre de 0,5 ng/ml sont les brebis 29 et 30.

Jour 4- jour 8 : L'effet inhibiteur ne semble pas se prolonger au delà du jour 5. Après ce jour, les taux recommencent à fluctuer. Sauf pour la brebis 6 dont l'inhibition de la LH est totale, ce qui concorde avec le nombre nul de GF que l'on observe par endoscopie, cette brebis répond parfaitement au traitement.

Jour 9 : Deuxième injection de Tévérélix. Cette injection ne diminue pas le taux de LH, au contraire les taux de LH fluctuent jusqu'au jour 14, jour de la dernière injection de Tévérélix.

Jour 14 : Dernière injection de Tévérélix, de nouveau l'inhibition est loin d'être efficace ,seules les brebis 11 ,18,24,29,et 30 restent sous la valeur de 1 ng/ml.

Peut-être pourrions nous justifier ses fluctuations par le fréquence d'administration du Tévérélix. En effet, une expérience réalisée l'année dernière au département de physiologie animale a démontré que la fréquence d'administration pour une réponse optimale était de 4 doses de 0,5 mg réparties sur 11 jours. Pour travailler en parallèle avec les collègues français, ce mode opératoire n'a pas été reconduit. Comme indiqué précédemment, 3 injections de 1, 1

et 0,5 ml ont été effectuées sur 11 jours. Les injections sont donc espacées de 5 et 4 jours. Il est possible que le Tévérélix n'ait pas une durée de vie suffisante pour inhiber complètement l'hypophyse jusqu'à l'injection suivante ou que le Tévérélix soit trop rapidement éliminé par l'organisme.

Même si la courbe moyenne du taux de LH se situe sous la courbe du groupe témoin; la comparaison, par étude statistique ($P < 0,05$), démontre une nouvelle fois que la différence entre les deux groupes n'est pas significative. L'efficacité du traitement à base de Busérelina n'est donc pas prouvée.

7.3.2 Variations de la LH du jour 18 au jour 25

Jour 18-jour 25 : Le jour 18 est celui de l'injection de LH exogène. Un pic de LH apparaît chez toutes les brebis, néanmoins 3 brebis montrent un pic qui reste dans la fourchette des taux physiologiques. Ce sont les brebis 6, 12 et 23.

Ces trois brebis ne présentent pas le pic représentatif de la montée de LH, responsable de l'ovulation, pourtant tous les follicules préovulatoires de ces brebis ont donné des corps jaunes.

- Brebis 6 : 11 GF (P.O) → 10 corps jaunes
- Brebis 12: 2GF (P.O) → 2 corps jaunes
- Brebis 23: 11 GF (P.O) → 11 corps jaunes

Aucune explication plausible n'a pu être mise en évidence.

La moyenne des pics de LH est de nouveau plus basse que le pic observé pour le groupe témoin. Il se situe au même niveau que le pic du groupe Busérelina. Cette inhibition par un antagoniste semble donc altérer l'efficacité de la LH exogène. (Figure 10)

7.4 Dosage de la FSH pour le traitement Tévérélix (Figure 11)

Jour 3-jour 5 : Dès la première injection de Tévérélix au jour 2, le taux de FSH diminue de 18 ng/ml à 12 ng/ml. Il continue à diminuer et atteint 10 ng/ml mais le taux ne diminuera pas plus bas.

La brebis 30 montre une diminution du taux de FSH mais celui-ci reste dans les normes physiologiques observées habituellement.

Jour 9 – jour 12 : L'inhibition se maintient après la deuxième injection de Tévérélix. La brebis 30 qui se situait au-dessus de 20 ng/ml subit à son tour une chute du taux de FSH et obtient un taux se situant sous la barre des 10 ng/ml.

Jour 13 – jour 18 : Toutes les brebis présentent un pic de FSH durant le traitement de FSH exogène. On peut espérer que tous les petits follicules recrutés vont pouvoir se développer jusqu'au stade de GF pré-ovulatoires.

La comparaison, avec le groupe témoin, montre une différence significative. Le taux reste faible et stable pour le groupe T alors qu'il fluctue continuellement pour le groupe contrôle.

La comparaison entre le groupe Tévérélix et le groupe Busérelina ($P < 0,05$) montre un taux de FSH plus faible pour le groupe Busérelina que pour le groupe Tévérélix. (Figure 12)

Deuxième expérience
Culture de follicules in vitro

1. Introduction

Rappelons que l'objectif de cette expérience est de voir si les inhibitions hypophysaires ont un effet direct sur les follicules, ce qui expliquerait la faible reprise ovarienne enregistrée. Sachant que la FSH doit stimuler la sécrétion d'E₂ par les follicules et que la LH doit stimuler la sécrétion de P₄, nous avons analysé le taux de ces différentes hormones dans le liquide récolté après perfusion de follicules.

2. Résultats du taux d'E₂

Du temps 120 à 150, les follicules sont stimulés par de la oFSH.

- Aucun follicule du groupe contrôle ne présente de pic d'E₂ après stimulation. Seuls les 3 plus gros follicules présentent une certaine augmentation entre le temps 180 et 210.
- Pour le groupe Busérelina, on observe une augmentation du taux d'E₂ pour le follicule 1 mais pour les autres le taux reste stable.
Le pic d'E₂ ne se manifeste qu'au temps 210, tous les follicules présentent un pic à ce moment qui est proportionnel à leur diamètre.
- Pour le groupe Tévérélix, aucun pic n'est observé durant la perfusion, de nouveau un pic se dessine au temps 210 pour tous les follicules sauf le 2. Celui-ci ne montre aucune augmentation tout au long de l'expérience.

3. Résultats du taux de P₄

Du temps 90 à 120, les follicules sont perfusés par de la oLH

- Dans le groupe contrôle, on observe des pics de P₄ pour tous les follicules excepté le follicule 3. Après cette période, les taux restent fort variables.
- Pour le groupe Busérelina, on observe une augmentation du taux entre le temps 120 et 150. Les follicules 4 et 5 (qui sont les plus petits) ne présentent aucune fluctuation du taux de P₄ qui reste nul.
Après le temps 150, les taux fluctuent continuellement entre 0,2 et 0,3 ng/ml.
- Pour le groupe Tévérélix, une augmentation du taux est observée entre le temps 90 et 120. Pour le follicule 4 le taux de P₄ reste nul.
Entre le temps 150 et 180, les taux diminuent et ensuite ceux-ci fluctuent légèrement.

I. Discussions

1. Traitement à base de Buséreline

1.1 Fluctuations des hormones dans le sang

- Ce traitement a engendré de grandes variabilités de réponses chez les brebis, différentes causes peuvent être recherchées.
Les pompes ont toutes été préparées de la même façon, avec le même produit et par la même personne. Il est fort improbable que les pompes soient en cause. L'explication doit être recherchée chez les brebis, de part leur grande variabilité de réponse au traitement suivant leur âge, poids, etc.
Le manque de réponse provient surtout du taux de LH qui semble peu affecté par l'inhibition alors que le taux de FSH, de ces mêmes brebis, répond positivement au traitement. Ceci prouve encore une fois que les pompes ont bien été placées et ont diffusé la Buséreline qu'elles contenaient.
- Le taux de LH devait normalement se situer à une valeur proche de 0 mais tout au long du traitement la fluctuation de la LH endogène s'est poursuivie.
La sécrétion de LH étant pulsatile, une étude plus fine de la fréquence et de l'amplitude des pulses aurait été nécessaire pour analyser l'effet de la Buséreline. Ces prises de sang répétées n'ont pas été envisagées dans ce travail pour éviter un stress supplémentaire aux brebis.
- Après l'administration de la LH exogène, un pic est observé mais la moyenne du pic pour le groupe Buséreline est beaucoup plus faible que pour le groupe témoin.
La dose de LH exogène administrée est identique pour les deux groupes. La LH est administrée au même moment dans chaque groupe et selon la même concentration. La LH exogène injectée n'est pas en cause.
Dans le groupe témoin, deux brebis (14 et 26) présentent un pic à plus de 25 ng/ml. Toutes les autres brebis ont un pic qui se situe entre 5 et 10 ng/ml, y compris les brebis de groupe Buséreline.
Cette différence engendrée par ces deux brebis explique ($P < 0,05$) la différence entre ces 2 moyennes de LH.

2. Traitement à base de Tévérélix

- L'inhibition du taux de LH est resté instable tout au long des différentes injections et non significative par rapport au groupe témoin.
Une expérience réalisée l'année dernière au département de physiologie animale a démontré que la fréquence d'administration pour une réponse optimale était de 4 doses de 0,5 mg réparties sur 11 jours. Pour des raisons pratiques, ce mode opératoire n'a pas été reconduit. Comme indiqué précédemment, 3 injections de 1, 1 et 0,5 ml ont été effectuées sur 11 jours. Les injections sont donc espacées de 5 et 4 jours. Il est possible que le Tévérélix n'ait pas une durée de vie suffisante pour inhiber complètement l'hypophyse jusqu'à l'injection suivante ou que le Tévérélix soit trop rapidement éliminé par l'organisme.
Différentes personnes ont effectué les injections. Il est donc possible que certaines injections aient été mal effectuées ou même oubliées.

- Sachant que l'inhibition de la FSH s'est effectuée correctement pour les brebis dont le taux de LH a continué à fluctuer, il est plus opportun de remettre en cause l'interaction qui se passe entre le Tévérélix et les récepteurs à la GnRH que le produit lui-même.

3. Effet des traitements sur les follicules

3.1 Efficacité de la Buséreline

- L'efficacité de la Buséreline sur l'inhibition des GF est hautement significative ($P < 0,05$) par rapport au groupe contrôle : toutes les brebis, à l'exception d'une seule, ne présentent plus aucun GF après le traitement inhibiteur.
Le nombre de MF diminue également. Cependant les petits MF (+/- 3 mm) semblent continuer à se développer sans l'influence des hormones gonadotropes
Vu le petit nombre de PF répertorié lors des endoscopies, il n'est pas possible de tirer des conclusions sur leur recrutement.

3.2 Efficacité du Tévérélix

- L'efficacité du Tévérélix sur l'inhibition des GF est significativement différente ($P < 0,05$) par rapport au groupe contrôle.
Le nombre de MF reste identique au groupe témoin. Comme dans le groupe Buséreline, il se peut que les petits MF ne subissent pas l'influence des hormones gonadotropes chez les brebis Texel.

4. La stimulation FSH-LH exogène

- Pour le groupe Buséreline, la moyenne du T.O est de 5,5 GF. Cette moyenne est faible mais il semble que les brebis des séries 1 et 2 n'aient pas réagi au traitement. Le nombre de GF est hautement et significativement plus faible que pour le groupe C.
- Pour le groupe Tévérélix, la différence n'est pas significativement différente du groupe C. Afin d'expliquer ce manque de différence, il faudrait savoir si les différentes inhibitions n'ont pas engendré d'altérations des récepteurs ovariens. Ceci pourrait expliquer le manque de proliférations des follicules ovariens.

5. Le taux d'ovulation

Les résultats obtenus sont de 3,4 pour le groupe Buséreline et de 5,8 pour le groupe tévérélix. Selon Baril et al (2001), Le T.O moyen varie entre 8 et 14 pour des brebis superovulées. Les résultats obtenus se situent en dehors de cet intervalle.

Vu le petit nombre de GF préovulatoires, il semble logique d'obtenir un faible T.O. La stimulation par la LH exogène a bien été effectuée et le problème du faible taux d'ovulation doit plutôt être recherché dans l'utilisation des substances inhibitrices du GnRH.

La différence du groupe Tévérélix par rapport au groupe contrôle n'est pas significative ($P < 0,05$). Le traitement à base de Tévérélix semble aussi efficace que la pose d'une éponge P4 mais sa supériorité n'est pas mise en évidence.

Si on compare le groupe B et le groupe T, on peut émettre l'hypothèse que le traitement à base de Tévérélix est plus efficace que celui à base de Buséreline, mais l'étude statistique démontre qu'aucune différence significative ne peut être mise en évidence.

6. Le Taux de récupération

La valeur moyenne d'embryons récupérés est de 0,5 pour les 2 techniques. Or, selon Baril et al (2001), pour une T.O. de 10 chez une brebis superovulée, le nombre moyen d'embryons récupérés doit être proche de 7,5 ; d'après ces chiffres, la récupération d'embryons lors de l'expérience est faible.

Le problème peut venir de la fécondation artificielle. Comme la technique permet d'introduire directement le sperme dans les cornes utérines, que le sperme est hautement concentré et de grande qualité, il est peu probable que la qualité du sperme soit en cause. Par contre, aucune brebis n'avait commencé à ovuler au moment de l'insémination ce qui est pourtant souvent observé. Il est permis de suspecter un problème de timing entre l'IA et l'ovulation induite bien que le délai habituel entre l'injection de LH et l'insémination ait été respecté. Le fait d'avoir réalisé l'essai en contre saison de reproduction est peut-être une explication.

Le faible taux de récupération peut aussi provenir de la technique de récolte. En effet, la technique par endoscopie a révélé plusieurs failles. Il se peut que des embryons ne soient pas entraînés par le liquide de rinçage et se perdent dans l'utérus. Il s'est produit aussi de nombreuses fuites du liquide de rinçage dans la cavité abdominale car l'orifice percé dans la corne utérine afin de faire pénétrer l'aiguille de rinçage, laissait passer du liquide malgré le ballonnet de sécurité. Sur les 40 ml de liquide de rinçage introduits, seul 10 à 15 ml étaient récupérés. Les embryons pouvaient donc se trouver dans le reste du liquide qui était perdu.

Une dernière cause du faible taux de récupération peut être la recherche des embryons dans le milieu de culture.

La recherche se fait sous binoculaire mais les embryons ont un petit diamètre, sont translucides et parfois abîmés par la récolte (malformation, éclatement une fois dans le milieu de récolte ou autre). Il peut donc arriver de passer à côté de certains embryons.

7. Comparaison entre le groupe Buséréline et Tévérélix.

Après le «flair up » engendré par la Buséréline, on peut se permettre de comparer les deux traitements. Du jour 4 au jour 7 inclus, le traitement Tévérélix est significativement différent du traitement Buséréline. La moyenne du taux de LH du traitement Tévérélix se situe sous la moyenne du traitement B. A partir du jour 8, la différence entre les deux traitements n'est plus significative.

Sans pour autant avoir une efficacité significative par rapport au groupe contrôle, on peut émettre l'hypothèse que le traitement T semble plus efficace que le traitement B.

II. Conclusions

1. Test de la technique

1.1 Inhibition par un agoniste en excès (la Buséreline)

- L'efficacité de l'inhibition par la Buséreline est démontrée puisque la diminution du nombre de gros follicules est hautement significative ($P < 0,01$) par rapport au groupe contrôle.
- Le nombre de petits follicules semble également augmenté mais on ne peut pas ici tirer de conclusions puisque le recensement des petits follicules n'a pas été effectué avec précision pour éviter une manipulation excessive des ovaires.
- Le taux d'ovulation est de 3,4, ce qui est nettement en dessous de la moyenne attendue lors d'une superovulation. La différence est significative par rapport au groupe témoin. Celui-ci semble plus efficace que la technique à base de Buséreline. Les petits follicules ne se développent pas jusqu'au stade de corps jaune, ils semblent bloqués ou inhibés par le traitement permettant leur recrutement.
- Malheureusement, l'expérience effectuée *in vitro* n'a pas pu confirmer ou infirmer cette hypothèse.

1.2 Inhibition par un antagoniste (le Tévérélix)

- L'efficacité de la technique de superovulation par inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire par le Tévérélix n'est pas démontrée.
Le nombre de GF préovulatoire et le taux d'ovulation obtenus n'engendrent pas une différence significative ($P < 0,05$) par rapport au groupe témoin. De plus, ce taux d'ovulation obtenu se situe sous la limite acceptable lorsque l'on procède à une superovulation.
Il est impossible d'affirmer l'efficacité de cette technique de superovulation. Le traitement avec du Tévérélix semble aussi efficace que la pose d'une éponge de P4 mais sa supériorité n'est pas démontrée.
- Cette absence d'effets de Tévérélix est difficile à expliquer car cette substance doit normalement entraîner une diminution brusque des taux plasmatiques d'hormones hypophysaires en se fixant sur les récepteurs à GnRH (*Cognié et al, 1992*) doit empêcher l'action de cette hormone, inhiber les gros follicules et permettre le recrutement des petits follicules.
- L'inhibition des gros follicules semble avoir été efficace ainsi que le recrutement des petits follicules. Le problème proviendrait de l'effet négatif que ces inhibitions entraîneraient sur l'action ultérieure des hormones exogènes sur les follicules qui doivent entrer en maturation.
- Les essais *in vitro* n'ont pas pu apporter d'enseignement à ce sujet.

1.3 Comparaison des 2 techniques

- Le nombre de GF est effectivement diminué grâce à la technique de l'inhibition. Malgré cela, il semblerait que l'efficacité des 2 techniques ne soit pas identique. L'inhibition par la Buséreline semble permettre une inhibition plus importante mais l'étude statistique révèle que la différence observée entre les 2 techniques n'est pas significativement différente ($P < 0,05$).
Pour les MF (+/- 3 mm), aucune des 2 techniques n'arrive à diminuer significativement leur nombre. Il semble donc que ces MF puissent se développer indépendamment de l'influence des hormones gonadotropes. Ceci demande également confirmation par différentes expériences.
Malgré la mauvaise comptabilisation des PF, il semble que l'efficacité que l'on attribue au Tévérélix et à la Buséreline soit fondée.
- Le taux d'ovulation le plus important est celui du groupe contrôle. Celui-ci n'est pas significativement différent du groupe Tévérélix mais bien du groupe Buséreline. L'étude comparative ($P < 0,05$) démontre que le traitement contrôle serait le plus efficace alors que l'objectif de cette expérience était de prouver une plus grande efficacité des traitements Buséreline et Tévérélix.
- Le taux de récupération est très faible, mais nous testions pour la première fois la technique de récolte par laparoscopie. Notre inexpérience dans l'utilisation de cette technique et les différentes causes possibles détaillées plus haut peuvent expliquer ce faible taux.
De plus, notre intérêt premier lors de cette expérience était de visualiser l'évolution des follicules tout au long du traitement. Pour ce faire de multiples endoscopies ont été réalisées qui ont très certainement endommagés les différents tissus.
Il faudrait recommencer l'expérience avec 1 ou 2 endoscopies au maximum afin d'optimiser les chances de fécondation et de récupération de l'ovocyte.
- Le transfert d'embryons n'a engendré aucune gestation. Vu le petit nombre d'embryons transférés (2) et le transfert effectué dans des conditions peu optimales, il était peu probable d'obtenir des résultats positifs.

2. Test des résultats des dosages hormonaux

2.1 Le taux de LH

- Pour la Buséreline, l'étude statistique ($P < 0,05$) montre que la différence entre le groupe témoin et le groupe Buséreline n'est pas significative. L'inhibition engendrée par une quantité excessive d'agoniste du GnRH, n'a pas plus d'effet que la simple pose d'une éponge de P4 sur la libération de la LH par l'hypophyse, tout au moins sur les taux de base. Mais la sécrétion de LH étant pulsatile, une étude plus fine de la fréquence et de l'amplitude des pulses aurait été nécessaire pour analyser l'effet de la Buséreline. Ces prises de sang répétées n'ont pas été envisagées dans ce travail pour éviter un stress supplémentaire aux brebis.
- Pour le Tévérélix, la différence au groupe témoin n'est pas significative. Le Tévérélix n'affecte pas le taux de LH endogène.

2.2 Le taux de FSH

- Pour le groupe Busérelina, la différence par rapport au groupe contrôle est hautement significative. Les taux de FSH endogènes restent sous les taux de FSH observés dans des conditions physiologiques normales.
- On peut conclure que les traitements au GnRH agoniste ou antagoniste ont un effet uniquement sur la libération de la FSH.

Références bibliographiques

- **Alabart J.L., Folch J., Fernandez-Arias A., Ramon J.P., Garbayo A., Cocero M.J., 1995**, Screening of some variables influencing the results of embryo transfer in the ewe. I. Five-day-old embryos, *Theriogenology*, 44, p.1011-1026.
- **Armstrong D.T., Evans G., (1983)**, Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats, *Theriogenology*, 19 n°1, p.31-42.
- **Baril G., Brebion P., Chesné P., 1995**. Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. FAO 115 ISBN 92-5-303388-6
- **Baril G., Traldi A.L., Cognié Y., Leboeuf B., Beckers J.F., Mermillod P., 2001**, Successful direct transfer of vitrified sheep embryos, *Theriogenology*, 56 n°2, p.299-305.
- **Bister J.L., 2001**. Reproduction assistée chez les mammifères. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.
- **Bister J.L., 2002**. La reproduction des petits ruminants, Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- **Bister J.L., Artoisenet P., Paquay R., 1983**. traitements hormonaux et fécondité de la brebis Texel en période normale de lutte, *Revue de l'agriculture*, 36, p.1451-1458.
- **Bister J.L., Derycke G., Jacques E., Paquay R., 1988**. Effects of immunisation against androstènedione on the ovarian follicular dynamics and ovulation rate in ewes, *Fundp. Clin. Pharmacl.*, 1.
- **Bister J.L., Perrard B., Lagache F., Paquay R., 1994**. Exogenous GH administrations stimulate the ovarian activity in ewes during the anoestrus. *Journal of reproduction and fertility*, 14 , p.18-19.
- **Brebion P., Baril G., Vallet J.C., 1992**. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.*, 41: 331-339.
- **Chenineau P., 1986**. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical creole meat goat. I. Female oestrous behaviour and ovarious activity. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26: 441-452.
- **Chemineau P., Cognié Y., Guérin Y., Orgeur P., Vallet J.C., 1993**. training manuel on artificial insemination in s sheep and goats. *Animal Production an Health paper No. 83*, Food and Ageiculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp. 222.ISBN 92-5-202808-0
- **Cognié., 1988**. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *Production animale*.

- **Cognié Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P., 2003.** International journal of animal reproduction. Guest Editors, T. Nagai & J. Piedrahita.
- **Cole H.H., 1975.** Studies of reproduction with emphasis on gonadotropins, antigonadotropins and progonadotropins, *Biology of reproduction*, 12, p.194-211.
- **Derivaux J., Ectors F., 1986.** Reproduction chez les animaux domestiques, 3^{ème} édition revue.
- **Driancourt M.A., Gougeon A., Royere D., Thibault C., 1991.** La fonction ovarienne. La reproduction chez les mammifères et l'homme de THIBAUT C., LEVASSEUR M.C., Editions Ellipses, Paris.
- **Derycke G., Bister J.L., Paquay R., 1991.** Influence de l'électroéjaculation sur le spermogramme, *The control of animal reproduction*, Tours France, 5, p.1.
- **Evans A.C.O., Flynn J.D., Quinn K.M., Duffy P., Quinn P., Madgwick S., Crosby T.F., Boland M.P., Beard A.P., 2001,** Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronisation protocol in ewes, *Theriogenology*, 56 n°5, p.923-936.
- **Fortune J.E., 1994.** Ovarian follicular growth and development in mammals, *Biology Reprod.*
- **Fry R.C., Clarke I.J & Cahill L.P., 1987.** Changes in gonadotrophin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep. *J. Reprod. Fert* 79.
- **Goldstein D.P., 1979.** Gestational neoplasms, *Endocrinology*, 3, p.1629-1648.
- **Gordon I., 1997.** Reproduction in sheep and goats, *Controlled reproduction in farm animals series*, 2, Cab. International, ISBN: 0-85199-1157.
- **Gougeon A., Lefèvre B., Testart J., 1984.** Recrutement et sélection du follicule dominant pendant le cycle menstruel spontané ou stimulé chez la femme, *Période péri-ovulatoire* (Salat-Baroux J. et Thibaut Ch.) Masson Paris, ISBN: 2-225-80221-1, p.1-11.
- **Leclercq L., 1994.** Première approche de la maturation et de la fécondation in vitro de l'ovocyte ovin. *Mémoire biologie*
- **Mc Neilly A.S., Fraser H.M., 1987.** Effects of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *Jour. Of Endocrinology*, 115, p.273-282.
- **Mandiki S.M.N., Noël B., Bister J.L., Perrard B., Vissher A., Beerlandt G., Peeters R., Kaulfuss K.H., Suss R., Paquay R., 1997.** Comparison of follicular parameters in different ewe genotypes, carriers or non-carriers of the fecundity Booroola or Cambridge gene, *Journal of reproduction and fertility*, 19, p.173.

- **Murray F.A., 1978**, Embryo Transfer in Large Domestic Mammals, Methods in mammalian reproduction (Joseph C.D.Jr), Academic Press London, ISBN: 0-12-201850-8, p.285-305.
- **Noël B., Mandiki S.N.M., Perrard B., Bister J.L., Vissher A., Paquay R., 1996**. Terminal follicular growth in Booroola-Texel ewes carriers and non-carriers of the F-gene, Proceeding of the 13th Int. Congres on animal reproduction (Stone G.M et Evans G.), 7, p.20.
- **Norman W.A., Litwack G., 1987**. Hormones, Academic Press LTD UK, ISB:0-12-521440-5, p.173-200 et 532-549.
- **Perrard B., Noël B., Lagache F., Bister J.L., Paquay R., 1996**. Effects of growth hormone administration on ovarian activity and hormonal secretions dyrind the ovine estrus cycle. Eur. J. Physiol., 431.
- **Ryan J.P., Hunton J.R., Maxwell W.M., 1991**. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combinaison of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone, Reproduction, fertility and development, 3, n°5, p.551-560.
- **Scaramuzzi R.S., Adam N.R., Baird D.T., Campbell K., Dowing J.A., Findlay J.K., Henderson K.M., Martin G.B., Mc Natty A.S., 1993**. A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. Reprod. Fert. And Dev.
- **Shwartz N.B., 1973**. Mechanisms controlling ovulation in smoll mammals, handbook of physiology, Endocrinology (section 7), 2, (female reproductive system, part I.), Washington D.C., n°60-4587, p.145-147.
- **Stringfellow., D.A., Riddel., K.P and Zurovac., 1991**. The potential of embtyo transfer for infections disease control in livestock. New Zealand Vet. J., 8-17.
- **Tarès S., Sevellec C., 1987**, Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe, Reproduction, nutrition, development, 27 n°4, p.859-863.
- **Yen S.S.C & Jaffe R.B, 1991**. Reproductive Endocrinology. Hird Edition. W.B. Sauders Compagny. T.

