

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Transfert d'embryons chez le mouton: première approche

Guaietta, Géraldine

Award date:
2002

[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

**TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LE MOUTON :
PREMIERE APPROCHE**

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

Géraldine GUAETTA

Année académique 2001-2002

Facultés Universitaires 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 : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Transfert d'embryons chez le mouton : Première approche

GUAJETTA Géraldine

Résumé

La transplantation embryonnaire est un procédé consistant à transférer les embryons obtenus à partir d'une femelle donneuse, choisie pour son potentiel génétique élevé, chez une femelle receveuse qui les conduira à terme.

Il s'agit d'une technique actuellement bien maîtrisée chez le bovin, ce qui n'est pas le cas chez les ovins.

Cette transplantation comporte toute une série d'étapes qu'il est impératif de maîtriser : traitement hormonal des donneuses et des receveuses, fécondation et manipulations des embryons (collecte, conservation et transfert).

L'objectif de ce travail est de mettre en œuvre différents traitements de superovulation afin de déterminer leur efficacité.

Les traitements utilisés sont constitués d'éponges de progestagènes et d'un antagoniste de GnRH, appelé Antarelix, afin d'assurer le blocage hypophysaire. L'Antarelix sera injecté aux différents groupes de brebis selon trois schémas différents.

La seconde partie du traitement est constituée de FSH dans un premier temps et de LH ou de Busereline, c'est-à-dire un agoniste de GnRH, dans un deuxième temps afin d'assurer la superovulation.

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

L'effet de l'Antarelix n'a pu être démontré au cours de nos essais mais le traitement de superovulation lui-même s'est révélé efficace car les taux d'ovulation obtenus sont acceptables.

Aucune receveuse ne présentait un état gravide.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Année académique 2001-2002
Promoteur : R. Paquay
Co-promoteur : J.-L. Bister

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci au Dr. J.-L. Bister pour son suivi permanent et ses réponses à mes nombreuses questions qui m'ont été précieuses lors de la rédaction de ce travail.

Merci également au Prof. R. Paquay pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire et pour ses remarques qui m'ont aidées à réaliser ce travail.

Merci aux autres membres du laboratoire et plus particulièrement à Fabienne et Marie-Antoinette pour leur écoute et leur sympathie.

Merci aux membres du CISO pour leur accueil au centre de Faulx-Les-Tombes.

Merci au Dr. Perrisoud de la société Europeptides et au Professeur J.F. Beckers du laboratoire de Physiologie de la Reproduction des Facultés de Médecine Vétérinaire de l'ULg, pour nous avoir fourni gracieusement, à titre expérimental, les produits nécessaires à la réalisation de cet essai.

Merci au laboratoire d'Histologie-Embryologie des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur pour leur aide lors de la fixation des embryons.

Merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Merci à eux et à tous les autres pour avoir contribué à la réalisation de ce mémoire.

Liste des abréviations

Liste des abréviations.

Ala	Alanine
Arg	Arginine
Da	Dalton
E ₂	Oestradiol
FIVETE	Fécondation in vitro et transfert d'embryons
La FSH	Hormone stimulant les follicules
La GH	Hormone de croissance
GIFT	Transfert de gamètes dans l'oviducte en pénétrant par le pavillon
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GnRH	Hormones entraînant la libération des gonadotrophines
His	Histidine
IGF ₁	Insulin like growth factor 1
Leu	Leucine
La LH	Hormone lutéinisante
Lys	Lysine
MHz	Mégahertz
MOET	Maturation ovocytaire et transfert d'embryons
OPU	Pick-up ovocytaire
P ₄	Progestérone
PAG	Pregnancy Associated Protein
PBS	Phosphate Buffer Saline
Phe	Phénylalanine
PM	Poids moléculaire
Pro	Proline
RIA	Radio Immuno Assay
Ser	Sérine
TH	Tyrosine oxydase
Trp	Tryptophane
TSH	Hormone stimulant la thyroïde
Tyr	Tyrosine
UI	Unités Internationales

Table des Matières

Table des matières.

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Chapitre 1 : Superovulation	3
1. Croissance folliculaire	3
1.1. Folliculogenèse précoce	3
1.2. Folliculogenèse terminale	4
2. Timing	4
3. Stimulation ovarienne par les hormones gonadotropes	5
3.1. La eCG	5
3.2. La hCG	6
3.3. La hMG	7
3.4. La FSH et la LH	7
4. Immunisation	9
4.1. L'inhibine	9
4.2. Les stéroïdes endogènes	9
5. Blocage de l'hypophyse	9
5.1. Agonistes de GnRH	9
5.2. Antagonistes de GnRH	10
6. Répétition des traitements	11
7. Diagnostic	11
Chapitre 2 : Conditionnement du sperme	12
1. Collecte	12
2. Détermination de la qualité du sperme	12
3. Conservation	13
4. Décongélation	14
Chapitre 3 : Fécondation	15
1. Généralités	15
2. Fécondation in vivo	15
3. Laparoscopie	16
4. Fécondation in vitro	16
Chapitre 4 : Collecte des embryons	18
1. Caractéristiques du développement embryonnaire	18
2. Collecte des embryons	18
3. Conservation des embryons	18
3.1. Conservation des embryons frais	19
3.2. Congélation et décongélation	19
3.2.1 Congélation classique	19
3.2.2. Vitrification	20
3.2.3. Réchauffement	21

Chapitre 5 : Préparation des receveuses	22
1. Gestation	22
2. Synchronisation des donneuses et des receveuses	22
Chapitre 6 : Techniques de transfert des embryons	24
Chapitre 7 : Diagnostic de gestation	25
 OBJECTIFS	 27
 MATERIEL ET METHODES	 28
1. Les animaux	28
2. Les produits utilisés	29
3. Plan expérimental	31
3.1. Première expérience	31
3.2. Seconde expérience	32
4. Insémination	33
4.1. Collecte du sperme	33
4.2 . Insémination intra-utérine	33
5. Collecte et conditionnement des embryons	34
5.1. Collecte chirurgicale	34
5.2. Vitrification des embryons	34
6. Synchronisation des receveuses	36
7. Transfert des embryons	37
7.1. Décongélation	37
7.2. Transfert chirurgical	37
8. Diagnostic de gestation	38
8.1. Dosage des PAG	38
8.2. Echographie	38
9. Dosages hormonaux	39
9.1. Prises de sang	39
9.2. Dosages	39
9.3. Protocole pour le dosage de l'E ₂	41
9.3.1. Extraction	41
9.3.2. Compétition-incubation	41
9.4. Protocole pour le dosage de la FSH	42
9.5. Protocole pour le dosage de la LH	42
 RESULTATS ET DISCUSSION	 43
1. Première expérience	43
1.1. Taux d'ovulation	43
1.1.1. Présence de follicules	43

1.1.2. Présence de corps jaunes	43
1.2. Nombre d'embryons	44
1.3. Résultats des transferts	44
1.3.1. Qualité des embryons	44
1.3.2. Transferts d'embryons	45
1.4. Evolution des hormones dans le sang	46
1.4.1. Dosage de la LH	46
1.4.1.1. Analyse des jours 0 à 15 : effet de l'Antarelix	47
1.4.1.2. Analyse des jours 15 à 25 : effet des traitements FSH-LH/Busereline	47
1.4.2. Dosage de la FSH	47
1.4.2.1. Analyse des jours 0 à 15 : effet de l'Antarelix	48
1.4.2.2 Analyse des jours 15 à 25 : effet des traitements FSH-LH/Busereline	48
1.4.3. Dosage de l'oestradiol	48
1.4.3.1. Analyse des jours 0 à 15 : effet de l'Antartelix	48
1.4.3.2. Analyse des jours 15 à 25 : effet des traitements FSH-LH/Busereline	48
1.5. Discussion partielle de la première expérience	49
2. Seconde expérience	51
2.1. Taux d'ovulation	51
2.2. Evolution des hormones dans le sang	52
2.2.1. Dosage de la LH	52
2.2.2. Dosage de la FSH	52
2.3. Discussion partielle de la seconde expérience	53
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	55
Discussion générale et conclusions	55
3.1. Test de la technique	55
3.2. Etude physiologique	56
Perspectives	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58

Introduction

Introduction

Le premier transfert d'embryons a été réalisé en 1933 par Warwick et Berry (*Brebion et al, 1992*). L'objectif de cette technique est l'obtention d'un nombre important d'embryons à partir de femelles donneuses constituant des animaux d'élite et le transfert de ces embryons à des femelles receveuses chez qui ils seront conduits à terme (*Brice et al, 1995*). Ces manipulations permettent donc de disséminer un potentiel génétique supérieur lorsque le transfert d'embryons est combiné avec une insémination artificielle et la sélection génétique de béliers (*Crighton et al, 1978*).

On peut, de cette façon, augmenter la pression de sélection en vue d'améliorer certains caractères choisis et multiplier la descendance des meilleures génitrices (*Armstrong et Evans, 1983*). Il s'agit donc à la fois d'un outil de recherche et d'un outil commercial (*Murray, 1978*). En effet, l'intérêt commercial est important car ce procédé permet la production de jeunes femelles présentant un potentiel élevé pour le renouvellement du troupeau ainsi que la production de jeunes destinés à l'abattage.

Il est également possible d'éviter la transmission de certaines maladies en contrôlant les reproducteurs utilisés. Cependant, il faut essayer de diversifier les origines des reproducteurs afin d'éviter une diminution de la variabilité génétique. Il faut encore garder à l'esprit qu'une diffusion des défauts héréditaires est toujours possible (*Baril et al 1993*).

Les techniques destinées à assister la reproduction chez les animaux domestiques se sont développées et améliorées au cours du temps.

Par exemple, les ovulations peuvent être induites chez des femelles en anoestrus, ce qui permet de réduire les intervalles entre les mises bas. Cette induction peut être engendrée par la présence d'un mâle, par une photopériode artificielle adaptée à la période de reproduction de l'animal, de même que par une administration de mélatonine, d'hormones hypophysaires et/ou de progestagènes.

Le taux d'ovulation peut, lui, être augmenté dans les limites physiologiques ou de façon extrême (ce qui est le cas lorsqu'on veut collecter un grand nombre d'embryons) via 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 purifiées.

Des procédures complètes font intervenir le transfert d'embryons lui-même ainsi que les procédés cités ci-dessus.

Parmi ces procédures, la FIVETE désigne la fécondation in vitro suivie du transfert d'embryons. Cette technique consiste à recueillir les gamètes mâles et femelles arrivés à maturité et à les mettre en présence afin de réaliser une fécondation in vitro. Le développement embryonnaire débute in vitro et, ensuite, ces embryons pourront être manipulés et transférés.

Une autre technique qui se développe actuellement est la MOET, qui signifie la maturation ovocytaire et le transfert d'embryons. C'est la maturation in vitro d'ovocytes, leur fécondation in vitro, la culture des embryons et leur transfert. Il s'agit d'une technique de mieux en mieux maîtrisée qui permet aussi d'étudier les processus physiologiques de l'ovogenèse et de la fécondation (*Bister, 2001*).

Le transfert d'embryons est une technique utilisée beaucoup plus couramment chez le bovin que chez le mouton. En 1999, 520 000 embryons bovins ont été transférés à travers le monde pour seulement 13700 embryons ovins. Ces faibles valeurs chez le mouton s'expliquent par le fait qu'il s'agit d'une technique complexe, lourde à mettre en œuvre et chère proportionnellement à la valeur de l'animal. Une réduction des coûts permettrait un plus grand nombre de transferts et donc une sélection génétique plus importante (*Baril et al, 2001*). Le transfert est également appliqué à toute une série d'autres espèces afin de préserver celles-ci. C'est par exemple le cas du daim de Mésopotamie qui est en voie de disparition (*Marrow et al, 1994*). Des emplois similaires sont aussi observés chez des espèces plus communes comme le mouton Chios car ceux-ci sont déclarés en danger depuis 1997, année durant laquelle on dénombrait moins de 9000 individus (*Lymberopoulos et al, 2001*).

L'objectif de ce mémoire est de mettre au point chez la brebis Texel la technique de transfert avec des embryons produits in vivo après insémination artificielle de brebis superovulées. Une attention plus particulière est apportée à l'étude de la superovulation et des processus physiologiques qui accompagnent son induction.

Première partie :

**Revue
bibliographique**

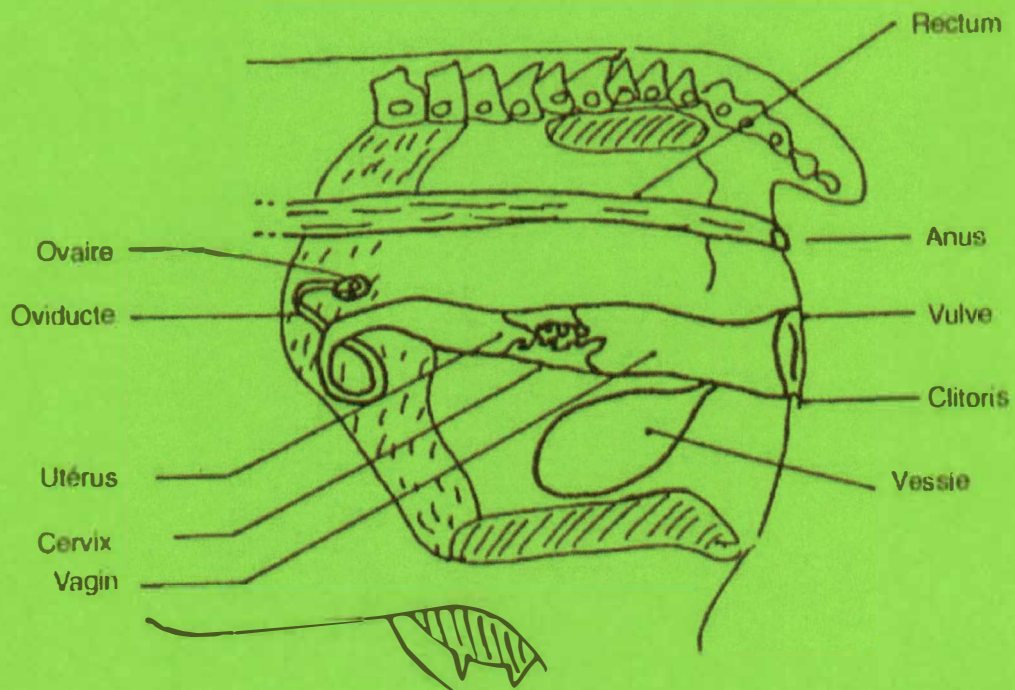


Figure 1 : Tractus génital de la brebis (Baril et al, 1993)

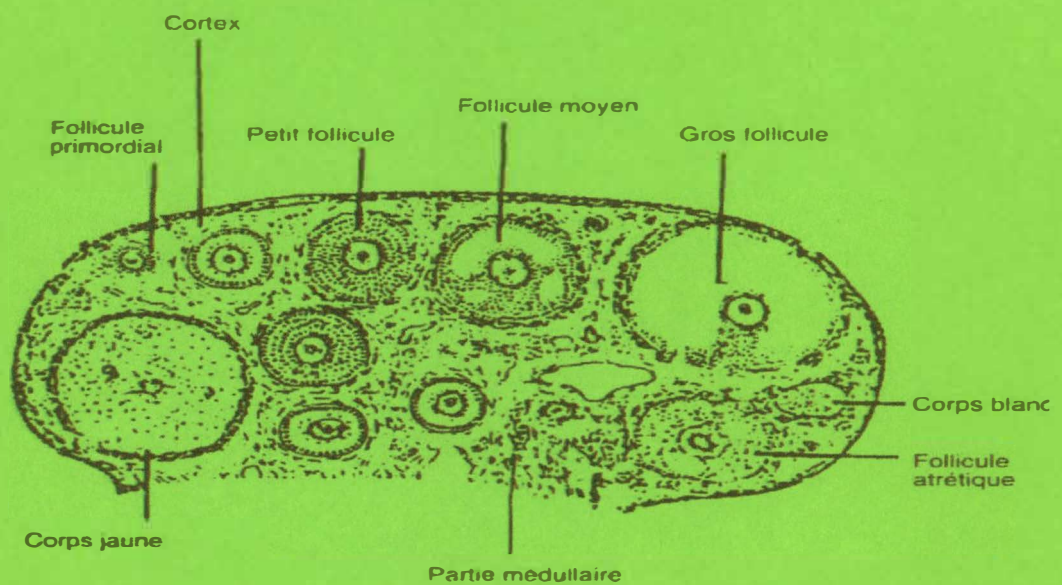


Figure 2 : Coupe longitudinale de l'ovaire de brebis (Baril et al, 1993)

Chapitre 1 : Superovulation

1. Croissance folliculaire

Une brebis est capable de se reproduire à la puberté, c'est-à-dire lorsqu'elle a atteint l'âge et le poids auxquels elle peut être fécondée lors de l'œstrus et auxquels elle peut conduire une gestation jusqu'à son terme. Les conditions d'âge et de poids doivent toutes deux être remplies afin de pouvoir affirmer que la brebis a atteint la puberté. Le poids à atteindre correspond à 60 % du poids adulte (ce qui signifie entre 30 et 35 kg), et l'âge se situe entre 7 et 10 mois (*Dziuk, 1973 ; Mbayahaga et al, 1997*).

Chez les espèces à reproduction saisonnée, la puberté n'apparaît que lors de la saison de reproduction. L'apparition de la puberté correspond généralement à la séquence d'évènements suivants : première ovulation silencieuse suivie d'un corps jaune de courte durée, deuxième ovulation silencieuse suivie d'un corps jaune de durée normale et troisième ovulation associée à un comportement d'œstrus suivie d'un corps jaune de durée normale. La durée de l'œstrus augmente de l'agnelle à la brebis.

Le tractus reproducteur de la femelle (fig.1) est constitué des ovaires (dont l'activité est contrôlée par les sécrétions hypophysaires), des oviductes, de l'utérus, du vagin et de la vulve.

L'ovaire comprend le stroma et le cortex (fig.2). C'est dans le cortex qu'a lieu la folliculogénèse (fig.3). A partir d'un stock de +/- 50 000 follicules, une brebis adulte conduit un maximum de 200 follicules à ovulation (*Baril et al, 1993*).

1.1. Folliculogénèse précoce

Au départ, le follicule est appelé follicule primordial. Il est formé d'un ovocyte et d'un petit nombre de cellules dont il est séparé par la zone pellucide. Ces dernières évolueront en granulosa. Le stock d'ovocytes est formé dès la fin de la vie fœtale et diminue progressivement par atrophie ou évolution des follicules primordiaux.

Du pool de follicules primordiaux, émergent régulièrement des follicules qui vont entamer un processus de développement qui pourra les amener, s'ils ne disparaissent pas auparavant, à un stade auquel ils pourront entamer la folliculogénèse terminale. Au cours de cette partie de la folliculogénèse, les follicules vont passer par divers stades : follicule primaire – follicule secondaire – follicule tertiaire. Ce dernier évolue en follicule de De Graaf qui comporte une cavité remplie de liquide ou antrum (*Stevens et Lowe, 1997*).

Le contrôle de cette folliculogénèse précoce ou basale est encore mal connu. Il est principalement joué par des facteurs paracrines, internes à l'ovaire, mais certaines hormones comme la GH (ou l'IGF₁) semblent impliquées (*Bister et al, 1994 ; Perrard et al, 1996 ; Perrard et al, 1995*).

Ce n'est qu'au terme de cette croissance basale que les cellules des follicules acquièrent des récepteurs, et donc une sensibilité, aux hormones gonadotropes. Les follicules sont alors au stade antral et ont un diamètre de l'ordre de 2 mm.

La durée de la croissance basale complète (follicule primaire, secondaire, tertiaire puis antral) est estimée à 6 mois chez la brebis.

OOGÉNÈSE

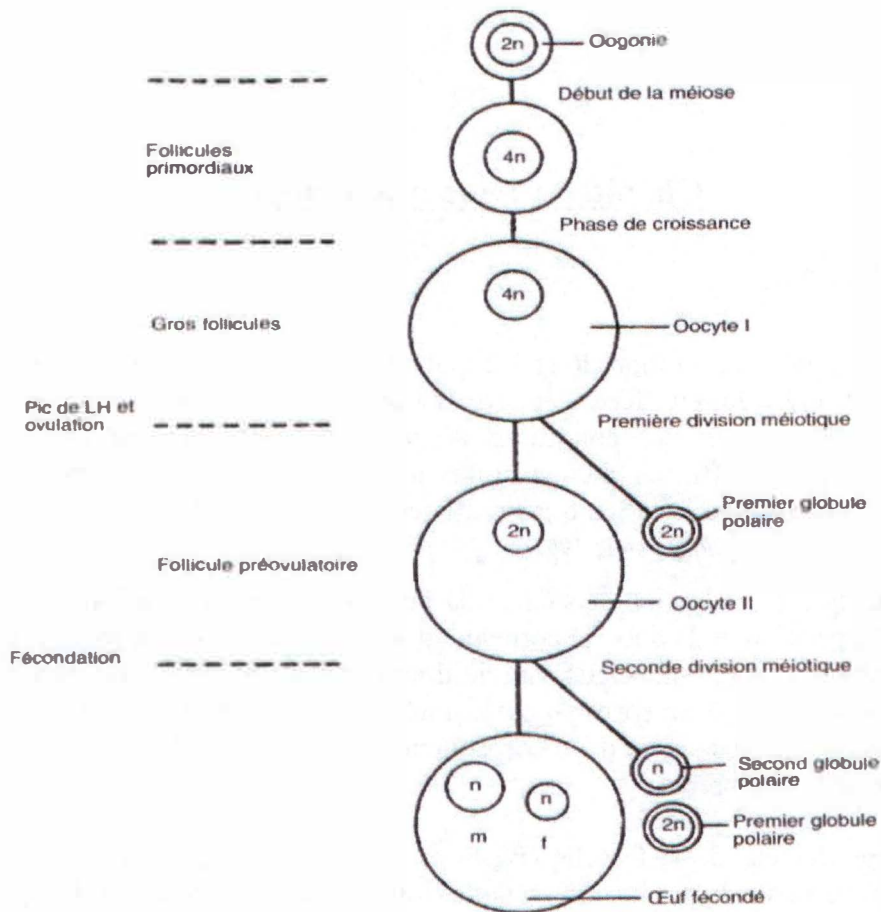


Figure 3 : Folliculogenèse (Baril et al, 1993)

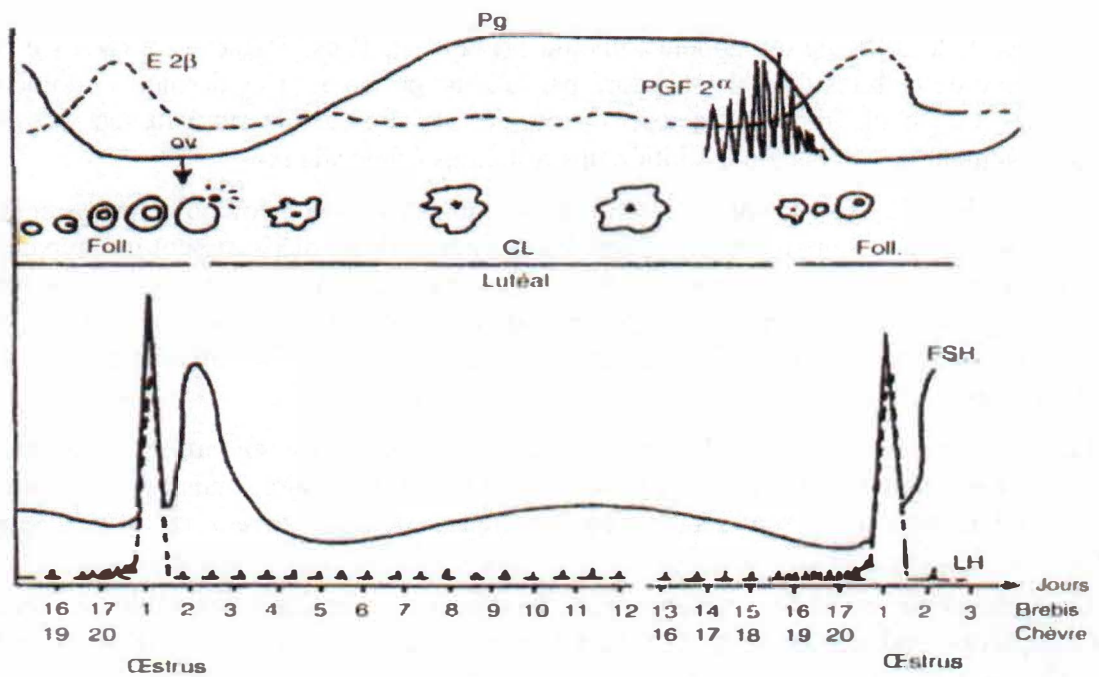


Figure 4 : Timing au cours d'un cycle chez la brebis (Baril et al, 1993)

1.2. Folliculogenèse terminale

La croissance folliculaire terminale (CFT) est un processus beaucoup plus rapide. Les follicules qui ont terminé leur croissance basale et acquis des récepteurs à la FSH sont recrutés lors d'une élévation des taux plasmatiques de FSH et entament une croissance qui les mène d'un diamètre de 2mm à un diamètre de 7-8mm en une durée de l'ordre de 5 à 6 jours (Noel et al, 1996 ; Mandiki et al, 1997).

Au cours du cycle de la brebis, 3 vagues de croissance bien distinctes peuvent être observées à la surface des ovaires (Bister et al, 1983 ; Jacques et al, 1986 ; Noel et al, 1991 ; Noel et al, 1993). Des follicules sont recrutés aux 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 sécrétion de FSH. Ces follicules croissent en augmentant leur diamètre de 1mm par jour environ. Certains deviennent « dominants », sécrètent beaucoup d'E₂ (hormone sécrétée par le follicule ovarien, responsable du comportement d'oestrus) et induisent l'atrésie successive des autres (Bister et al, 1999 ; Noel et al, 1999).

Au cours des deux vagues de croissance se déroulant pendant la phase d'activité du corps jaune, les sécrétions d'E₂ ne sont pas capables de déclencher la décharge de GnRH et de LH par rétroaction positive car l'hypothalamus est bloqué par les taux de progestérone (P₄) (hormone qui inhibe les sécrétions hypothalamiques et hypophysaires). L'oestradiol et l'inhibine exercent un rétrocontrôle négatif sur la FSH, ce qui engendre l'atrésie folliculaire.

Après la lutéolyse, la 3^{ème} vague de CFT se déroule dans un environnement avec très peu de P₄ ; la sécrétion d'E₂ induit les décharges préovulatoires de GnRH et de LH qui déclenchent la maturation finale et l'ovulation du ou des follicules dominants.

2. Timing

Le timing d'un cycle chez une brebis est le suivant : sachant que le cycle a une durée de 16,5 jours, on considère que l'ovulation a lieu le 2ème jour du cycle (fig.4). Cette ovulation est engendrée par les pics pré-ovulatoires de FSH et de LH. Un second pic de FSH suit le 1^{er} de 24 heures et est appelé le rebound de la FSH (Baril et al, 1993 ; Bister et Paquay, 1983 ; Bister et al, 1983). L'oestrus, qui précède l'ovulation de quelques heures, est enclenché par la sécrétion d'oestradiol par les gros follicules. Cinq jours après l'oestrus, des quantités très importantes de progestérone sont sécrétées dans le plasma. Cette hormone inhibe l'ovulation alors que la croissance folliculaire se poursuit. Lors de la diminution des taux de progestérone dans le plasma, vers le 11^{ème} jour, la PGF2α est sécrétée et initie la lutéolyse. Un nouveau cycle peut alors commencer.

Le but des techniques de superovulation est d'augmenter le taux d'ovulation afin notamment de pouvoir récolter un grand nombre d'embryons pour le transfert tout en assurant un environnement physiologique normal dans le tractus reproducteur de la brebis pour le développement précoce de l'embryon.

Si l'on considère le pic pré-ovulatoire de LH induit par les oestrogènes, il existe différentes façons de stimuler ses effets gonadotropes : une augmentation de la quantité de LH dans la circulation, une augmentation dans l'intensité de la réponse du tissu cible (ici, l'ovaire), une altération qualitative de la molécule de LH permettant une demi-vie prolongée (à l'origine, la

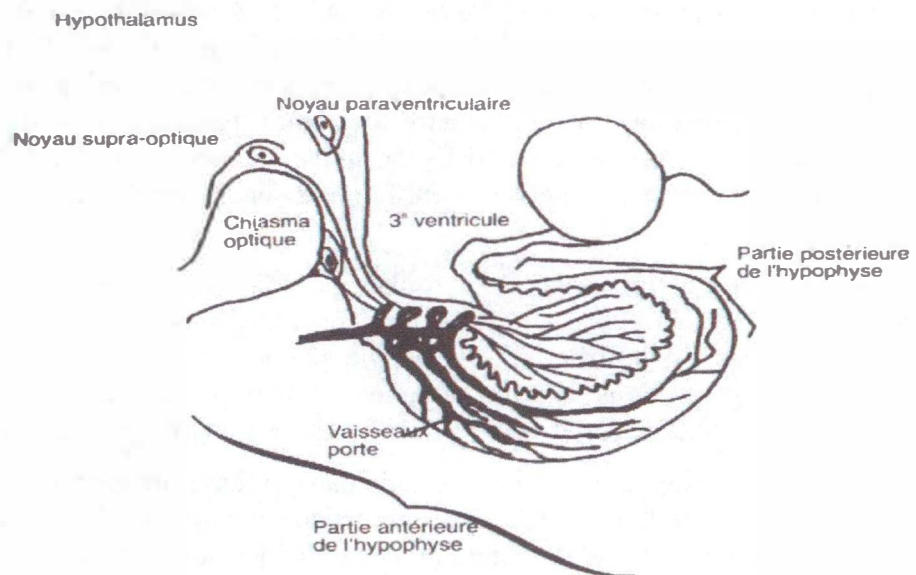


Figure 5 : Système hypothalamo - hypophysaire chez les petits ruminants (Baril et al, 1993)

demi-vie de cette hormone est de 21 minutes (*Bister et Paquay, 1982*)) ou une plus grande affinité vis-à-vis des récepteurs ovariens (*Hodgen, 1984*).

Cependant, le taux de superovulation ne peut être prédit car de nombreux facteurs peuvent limiter cette réponse : des facteurs intrinsèques comme l'âge ou la prolificité naturelle et des facteurs extrinsèques comme la saison ou l'état nutritionnel (*Kafi et McGowan, 1997*).

Mis à part les facteurs environnementaux, divers traitements hormonaux peuvent être appliqués à cette fin (*Bister, 2001*). Cependant, le nombre d'ovulations sera limité par la quantité de follicules en croissance dans les ovaires et, de plus, il existe une variabilité importante entre les individus. Il a, entre autres, été suggéré que la diminution de fertilité des brebis qui reçoivent un traitement de progestagènes durant 11 jours lors de l'anoestrus est due à l'ovulation d'un follicule âgé (*Evans et al, 2001*).

Avant d'appliquer des traitements inducteurs d'une ovulation, on peut synchroniser tout le troupeau afin que les brebis puissent être inséminées le même jour. Pour cela, le traitement appliqué est constitué soit de progestagènes exogènes qui prolongent la phase lutéale et dont la distribution est stoppée simultanément chez toutes les femelles, soit de prostaglandines qui terminent de façon synchrone la phase lutéale de femelles cycliques. Les progestagènes peuvent être administrés sous forme d'analogues synthétiques qui sont plus efficaces, la médroxy-progestérone ou l'acétate de fluorogestone par exemple. Ces analogues sont présentés sous la forme d'éponges vaginales ou d'implants sous-cutanés (*Derycke et al, 1987 ; Bister et al, 1983*).

Le timing de l'ovulation est variable et dépend du développement du follicule au moment du retrait des éponges. De plus, les caractéristiques du follicule ovulatoire dépendent aussi de la capacité du traitement de progestagènes à contrôler la sécrétion de gonadotrophines. En absence d'un corps jaune, la fréquence des pulses de LH augmente alors que le largage des progestagènes à partir des moyens de synchronisation diminue. Cela engendre une croissance continue des grands follicules (*Evans et al, 2001*).

3. Stimulation ovarienne par les hormones gonadotropes

Les hormones gonadotropes sont des hormones produites par l'hypophyse (fig.5) ou le placenta et qui, une fois libérées, vont atteindre et stimuler les gonades. Ce sont des glycoprotéines dont la teneur en acide sialique conditionne la résistance à la dégradation par le foie et donc leur demi-vie dans le sang (*Baril et al, 1993*).

Il existe une diversité d'hormones gonadotropes permettant un traitement superovulatoire: eCG, FSH, LH, hMG... Les hormones gonadotropes les plus utilisées actuellement pour la superovulation sont l'eCG, la FSH et la LH (*Brebion et al, 1992*).

3.1. La eCG

La eCG (qui signifie gonadotrophine chorionique équine et qui est également appelée PMSG, c'est-à-dire gonadotrophine sérique de jument gestante) est une hormone proche de la LH synthétisée par le placenta de jument. Cette hormone 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 (*Cole, 1975*). Elle présente un effet FSH lorsqu'elle est injectée chez les autres espèces et induit la croissance des follicules (*Bister, 2001*). Elle permet aux follicules de répondre à la LH en ovulant (*Schwartz, 1973*). La dose administrée doit être adaptée en fonction de l'espèce, de l'environnement et du but poursuivi (augmentation de la prolificité de la brebis ou prélèvement d'embryons). Par exemple, chez une brebis, alors qu'un taux de 600 à 800 UI

H-Ser-Arg-Gly-Pro-Leu-Arg-Pro-Trp-Cys-Gly-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu-Ala-Val-Gly-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Val-Cys-Ile-Thr-Val-Asp-Thr-Thr-
H-Ser-Lys-Glu-Pro-Leu-Arg-Pro-Arg-Cys-Arg-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu-Ala-Val-Glu-Lys-Glu-Gly-Cys-Pro-Val-Cys-Ile-Thr-Val-Asn-Thr-Thr

Ile-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Pro-Thr-Met-Arg-Met-Leu-Leu-Glx-Ala-Val-Leu-Pro-Pro-Val-Pro-Glx-Pro-Val-Cys-Thr-Tyr-Arg-Asx-Val-Arg-Phe
Ile-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Pro-Thr-Met-Thr-Arg-Val-Leu-Gln-Gly-Val-Leu-Pro-Ala-Leu-Pro-Gln-Val-Val-Cys-Asn-Tyr-Arg-Asp-Val-Arg-Phe

Glx-Ser-Ile-Arg-Leu-Pro-Gly-Cys-Pro-Arg-Gly-Val-Asx-Pro-Val-Val-Ser-Phe-Pro-Val-Ala-Leu-Ser-Cys-Arg-Cys-Gly-Pro-Cys-Arg-Arg
Glu-Ser-Ile-Arg-Leu-Pro-Gly-Cys-Pro-Arg-Gly-Val-Asn-Pro-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Val-Ala-Leu-Ser-Cys-Gln-Cys-Ala-Leu-Cys-Arg-Arg

Ser-Thr-Ser-Asx-Cys-Gly-Gly-Pro-Lys-Asx-His-Pro-Leu-Thr-Cys-Glx-Asx-Ser-Lys-Gly-OH
Ser-Thr-Thr-Asp-Cys-Gly-Gly-Pro-Lys-Asp-His-Pro-Leu-Thr-Cys-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-

Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-OH

*Figure 6 : Similitudes entre les compositions en acides aminés entre la LH humaine (composition donnée par Closset et al) (au-dessus) et hCG.
(Morgan et al, 1974).*

donne de bons résultats en période d'œstrus, la dose efficace en période d'anoestrus est de 800 à 1000 UI (Bister, 2001 ; Heins et al, 1986 ; Bister et al, 1987 ; Bister et al, 1987 ; Noel et al, 1991 ; Noel et al, 1992) .

Si cette hormone est injectée en cours de lactation, elle induit l'ovulation, mais la fertilité reste basse (Dziuk, 1973).

Cependant, le traitement à l'eCG peut provoquer une hyperstimulation ovarienne et l'apparition de follicules kystiques (Brebion et al, 1992).

En temps normal, le développement des follicules pré-ovulatoires implique une phase initiale de différenciation cellulaire somatique et une phase finale de maturation. Des anomalies ont été observées dans ce schéma après superovulation : au niveau de 28 % des ovocytes, l'administration de eCG induit des changements dans la maturation normale des ovocytes (Moor et al, 1985). Ce phénomène n'est jamais observé avec la FSH et cela, peut-être, grâce à sa clearance élevée (Brebion et al, 1992).

La eCG est souvent administrée chez les brebis le jour du retrait de l'éponge afin d'essayer d'augmenter le taux d'ovulation car 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 (Evans et al, 2001).

3.2. La hCG

La hCG ou hormone gonadotrope chorionique humaine est une glycoprotéine produite par les tissus trophoblastiques du placenta et constituée de deux chaînes polypeptidiques attachées à un hydrate de carbone (Goldstein, 1979). Sa sous-unité α est identique à celle de la FSH et la LH (Norman et Litwack, 1987). Son PM est de 38 000 Da et 66 % de ce poids correspond à la portion peptidique. Elle contient beaucoup de prolines, cystéines et sérines avec des SH non libres (Goldstein, 1979). Sa richesse sialique lui confère une demi-vie beaucoup plus importante que les hormones hypophysaires (Bister, 2001). La demi-vie de la hCG est d'environ 40 heures (Derivaux et Ectors, 1986). Sa production durant la gestation fournit le stimulus hormonal pour la production de progestérone (Norman et Litwack, 1987). Elle peut stimuler et prolonger l'existence du corps jaune et assure ainsi la sécrétion de progestérone ovarienne jusqu'à ce que le placenta puisse la sécréter (Goldstein, 1979).

La hCG présente surtout une activité LH (Schwartz, 1973). Il en résulte que, 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. Cela entraîne une légère amélioration de la fécondité (Bister, 2001). Ceci est dû au fait qu'en plus de posséder une sous-unité α identique à celle de la LH, elle présente diverses similitudes avec cette hormone au niveau de la sous-unité β (fig.6). D'après Morgan et al (1974), 94 résidus sur les 115 de la LH humaine seraient identiques au niveau de hCG. Entre autres, la région des acides aminés 89-95 de cette sous-unité comprend deux cystéines chez les deux hormones. La hCG possède en plus 30 résidus au niveau de l'extrémité carboxyle qui ne sont pas retrouvés au niveau de la LH humaine ou des autres hormones glycoprotéiques. Ces résidus supplémentaires constituent un déterminant antigénique permettant de distinguer les hormones par des RIA spécifiques (Morgan et al, 1974).

Il faut cependant savoir qu'une injection d'hCG peut entraîner une diminution des réponses de superovulation (Barrier-Battut et al, 2001).

Tableau 1 : Comparaison de la FSH et de la LH

Cellules	Hormones	Coloration	Diamètre des cellules sécrétoires	T _{1/2} dans le sang (min)	PM (K=1000)	Caractéristiques
Gonadotrophes	FSH	Basophile	200µm	240	34	Le RER et le golgi jouent un rôle dans la synthèse des sous-unités.
Lutéotrophes	LH	Basophile	250µm	21	28,5	Les granules sécrétoires tendent à s'accumuler à un pôle de la cellule en périphérie.

3.3. La hMG

La hMG est l'hormone gonadotrope ménopausale humaine. Elle est produite par l'hypophyse lors de la ménopause et est très semblable à la FSH (Bister, 2001). Elle est surtout employée chez la femme et on la trouve commercialisée sous l'appellation de Néopergonal.

L'injection de cette hormone lors d'un traitement de superovulation accroît l'activité mitotique des follicules et donc, stimule leur croissance. Pour ce faire, hMG doit être administrée en fin de phase lutéale ou en début de phase folliculaire (Gougeon, 1984). Cette hormone engendre aussi un pourcentage de follicules 2-5mm sains supérieur à celui observé au niveau d'ovaires non stimulés, donc, elle permet la sélection de plusieurs follicules de 2 à 5 mm qui pourront se développer et mûrir de façon adéquate (Hoggen et al, 1984).

On peut conclure que la hMG renforce la capacité de développement des follicules en stimulant leur activité mitotique et, de cette façon, leur vitesse de croissance (Gougeon, 1984).

3.4. La FSH et la LH

La FSH et la LH sont les hormones qui seront employées dans la partie pratique de ce travail (tableau 1).

Elles sont synthétisées au niveau de l'adénohypophyse. Dans la partie distale de celle-ci, on trouve 10-15 % de granules basophiles ayant un diamètre de 15-25 μm et contenant de la LH et de la FSH. Leur sous-unité α est identique (de même que chez hCG et TSH qui est l'hormone agissant sur la thyroïde) et ce sont les différences présentes dans la sous-unité β qui permettent la reconnaissance de cellules spécifiques.

Leur libération se fait sous le contrôle de la GnRH, de l'inhibine et sous l'influence du niveau d'hormones stéroïdiennes circulantes.

Ces hormones jouent des rôles importants pour la maturation folliculaire et l'ovulation.

La LH, à des concentrations très importantes (lors du pic pré-ovulatoire), induit la transformation des cellules de la thèque et de la granulosa en corps jaune qui sécrète la progestérone.

Durant la période précédant l'oestrus, des niveaux de LH légèrement élevés permettent le maintien de la concentration en oestradiol (Schwartz et Ely, 1974). La LH intervient également au niveau du follicule arrivé au voisinage de la maturité : elle agit en synergie avec FSH pour provoquer la rupture du follicule. L'ovocyte est alors expulsé et les cellules folliculaires sont transformées en corps jaune (Racadot et al, 1972).

Le pic de FSH, lui, est nécessaire à la maturation des follicules autres que ceux qui ovulent au moment de ce pic (Schwartz et Ely, 1974). Il stimule le recrutement et la croissance des follicules de la 1^{ère} vague du cycle par prolifération des cellules folliculaires et développement de l'antrum (Racadot et al, 1972). Enfin, à la fois chez le mâle et la femelle, la FSH permet le développement des gamètes et la sécrétion d'hormones par les gonades (Brown R.E., 1994).

Chez la brebis, l'augmentation de la fréquence des pulses de LH durant la phase folliculaire induit la maturation finale des follicules ovulatoires, incluant l'augmentation de la production d'oestradiol et l'augmentation des récepteurs à LH au niveau de la thèque et de la granulosa. Ce processus de maturation finale assure l'ovulation du follicule en réponse au pic pré-ovulatoire d'hormones gonadotropes, en dépit de la faible régulation du nombre de récepteurs à LH et de l'inhibition de la production d'oestradiol qui a lieu durant le pic de LH pré-ovulatoire (Webb et Gauld, 1984).

Lors d'un traitement de superovulation, le rapport FSH-LH diminue au fur et à mesure. En effet, si le traitement FSH-LH est étalé sur 5 jours, les injections de FSH vont en diminuant au cours du traitement (6UA-5UA-3UA-2UA et 0) tandis que la première dose de LH est injectée le 4^{ème} jour. Il en résulte un pic de LH après un temps de 24 à 48 heures tandis que les ovulations surviennent 48 à 72 heures après le retrait de l'éponge (Cognié et al, 1990).

Les superovulations répétées avec FSH sont seulement valables si on récupère les embryons par perfusion ou avec un cathéter approprié. Cela s'est observé lors d'expériences réalisées en utilisant trois traitements de FSH à des intervalles de 45 à 55 jours. Le taux de récupération diminue régulièrement ainsi que la proportion des embryons au stade morula-blastocystes. Des lésions chirurgicales pourraient être impliquées dans cette diminution (Tarès et Sevellec, 1987).

Un traitement de superovulation utilisant un homologue de FSH combiné avec une insémination artificielle par laparoscopie donne de bonnes réponses ovariennes et de bons résultats concernant la fécondation, la récupération des embryons et la qualité de ceux-ci (Lymberopoulos, 2001).

On peut réaliser des combinaisons d'hormones comme PMSG et FSH. Si on administre 800 IU de PMSG et 12 ou 18 mg de FSH, on observe une augmentation du taux d'ovulation par rapport à FSH seule. Si la dose de PMSG est de 1600 IU, il se produit une augmentation du nombre de follicules persistants et une diminution du taux d'ovulation par rapport à une dose de 800 IU (Ryan et al, 1991).

Cependant, les préparations de FSH et de PMSG destinées à la superovulation ont un effet sur les niveaux de catécholamines impliquées dans le contrôle de beaucoup de fonctions comportementales et physiologiques comme l'état de veille, la température corporelle, la prise d'eau et de nourriture et la pression sanguine. Parmi ces catécholamines, on trouve la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline (Müller et Nisticò, 1989).

Des mesures ont été effectuées avant l'application de FSH puis après 24h - 48h - 96h et 120h. Si on injecte 24 mg de FSH, les concentrations en dopamine augmentent après 24 et 48 heures puis restent à des niveaux élevés. La noradrénaline montre seulement un changement significatif après 24 heures et l'adrénaline après 24 à 48 heures (Pástorová et Várady, 1996).

Les traitements superovulatoires pourraient donc entraîner de légères variations au niveau des fonctions vitales. Il faut tout de même noter que ces variations sont minimales et sans effet néfaste réel pour la brebis.

Des combinaisons d'hormones sont mises au point pour induire la superovulation chez d'autres espèces. Par exemple, chez la souris, différentes combinaisons d'hormones ont été utilisées (PMSG 10 IU/ hCG 10 IU, PMSG 5 IU/ hCG 5 IU, PMSG 3 IU/ hCG 5 IU). La dose la plus élevée d'hormones gonadotropes donne une moyenne de 27,5 ovocytes par animal. De ceux-ci, environ un tiers montrent des signes de dégénérescence comme des globules de tailles inégales.

Le rapport 5/5 donne une valeur moyenne de 16,8 ovocytes par animal avec un taux de fragmentation de 13,3. Ce rapport donne un nombre suffisant d'ovocytes.

Enfin, le rapport 3/5 donne 7,7 ovocytes par animal avec un taux de dégénérescence de 7,8.

4. Immunisation

On peut également utiliser une technique d'immunisation contre des hormones comme l'inhibine ou des stéroïdes endogènes pour augmenter le taux d'ovulation. Celui-ci restera cependant toujours dans des proportions physiologiques, sans relation avec les niveaux recherchés en transfert d'embryons (*Bister, 2001*).

4.1. L'inhibine

L'inhibine est une hormone produite par les cellules de la granulosa des follicules ovariens. Elle est constituée de deux sous-unités liées par des ponts disulfures et a un poids moléculaire approximatif de 32 000 Da. Elle contrôle la sécrétion de FSH en exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. (*Norman et Litwack, 1987*). Si on dispose de brebis immunisées avec la sous-unité α de l'inhibine recombinante humaine et d'un groupe contrôle, le taux d'ovulation avant la synchronisation est environ quatre fois plus élevé chez les brebis immunisées. Après synchronisation, le taux d'ovulation est plus ou moins 1,5 fois plus important chez les brebis immunisées (*Mizumachi et al 1990*). 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 (*Bister, 2001*). L'inhibine humaine a donc un pouvoir immunogène, ses anticorps suppriment les effets de l'inhibine endogène et jouent le rôle de facteur de régulation dans le contrôle du taux d'ovulation (*Mizumachi et al, 1990*).

4.2. Les stéroïdes endogènes

Les stéroïdes endogènes peuvent également constituer la cible d'une immunisation. Si on immunise contre les œstrogènes ou la progestérone, bien que le taux d'ovulation soit augmenté, le cycle est perturbé. Il est donc préférable de trouver une autre cible. L'injection de $\Delta 4$ -androstènedione liée à de l'albumine sérique humaine provoque une réaction immunitaire contre l'androstènedione. Or, celle-ci facilite l'atrésie des follicules. Donc, son inactivation permet la survie de follicules supplémentaires jusqu'à l'ovulation. Parallèlement, la teneur plasmatique en œstradiol diminue, ce qui réduit le rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et augmente les niveaux de FSH et de LH dans le sang (*Bister et al, 1988 ; Derycke et al, 1988 ; Bister et al, 1988*).

5. Blocage de l'hypophyse

L'hypophyse peut être bloquée de deux manières principales, par une overdose d'agonistes de la GnRH ou par des antagonistes de la GnRH.

5.1. Agonistes de GnRH

La séquence de GnRH est:

P₆Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (*Zhu et al, 2002*).

Il s'agit d'un décapeptide dont la demi-vie est très courte (4 à 5 minutes) et l'action localisée au niveau de l'hypophyse (*Baril et al, 1993*).

L'agoniste synthétique de la GnRH le plus connu est la Busereline dont la formule est très proche de celle du GnRH:

P₆Glu-His-Trp-Ser-Tyr-(But)Ser-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

La Buséréline est une substance qui accélère l'ovulation en l'induisant 24 à 48 heures après le début du traitement.

Elle provoque une augmentation de la concentration en LH durant une période de 48 heures et les taux de LH avant l'ovulation sont plus hauts chez des individus traités avec de la Buséréline que chez des individus pour qui un placebo remplace la Buséréline. Ces résultats ne sont pas accompagnés d'une altération de la fertilité. La Buséréline peut donc être utilisée comme substituant de hCG pour induire l'ovulation (*Barrier-Battut et al, 2001*). Des expériences montrent que la Buséréline permet d'augmenter le taux de gestation de 10 % (*Newcombe et al, 2001*).

La Busereline peut être associée à hMG pour induire une hyperstimulation, mais cette combinaison est surtout employée chez la femme.

Elle est utilisée aussi afin de désensibiliser l'hypophyse et, de cette façon, exercer un contrôle exogène sur la croissance folliculaire et l'ovulation. Les effets de la Buséréline ont été examinés chez la femme lors de traitements combinant cette substance avec des stimulations diverses, hMG ou CC-hMG. Le CC (ou citrate de clomifène) présente une formule chimique assez proche de celle des oestrogènes, ce qui lui permet de se fixer sur les récepteurs de ceux-ci et donc de les inactiver.

L'utilisation de Buséréline diminue le nombre de cycles défavorables (c'est-à-dire avec peu d'ovocytes disponibles ou permettant la récupération de peu d'embryons) : seulement 7 % dans le cas de la Buséréline contre 19 % pour CC-hMG et 27 % pour hMG. Il en résulte une augmentation du nombre d'oocytes pouvant être récupérés et du nombre d'embryons disponibles pour le transfert. La proportion de gestations par cycle est de 20,4 % dans le cas de la Buséréline tandis qu'elle est de 13,5 % dans les 2 autres cas. Enfin, le nombre de gestations qui évoluent normalement est similaire dans tous les cas (*Loumaye et al, 1988*).

5.2. Antagonistes de GnRH

Il s'agit de nouvelles molécules permettant le blocage de l'hypophyse.

Parmi ces substances, il existe l'Antarelix (commercialisé sous l'appellation de Teverelix) dont la séquence est :

AcDNal-DpHe(pCL)-Dpal-Ser-Tyr-Dhci-Leu-Lys(iPr)-Pro-Dala-NH₂ (*Deghenghi et al, 1993*).

Il s'agit d'une molécule soluble dans l'eau, ce qui est un avantage important par rapport aux antagonistes courants du GnRH (*Deghenghi R., 1993*). Cette molécule, en se fixant sur les récepteurs hypophysaires à GnRH, bloque l'effet de l'hormone hypothalamique. Ce mécanisme a pour conséquence de ramener le taux de LH à un niveau de base dans les 4 heures, de le maintenir pendant un nombre de jours variables en fonction de la dose administrée et de réduire le taux de FSH à un minimum. L'Antarelix favorise donc une plus grande réponse superovulatoire en bloquant l'hypophyse, ce qui permettra un contrôle de la réponse ovarienne en utilisant des hormones gonadotropes exogènes (*Dufour et al, 2000*).

Cette substance permet d'augmenter le taux de fécondation qui est faible après la fin d'un traitement aux progestagènes. Une injection idéale est de 0,5 mg d'Antarelix car cette quantité permet une inhibition du pic endogène de LH sans effet néfaste sur la qualité des embryons (*Baril et al, 1996*). L'Antarelix provoque toute une série d'effets secondaires chez l'homme et sera donc préférentiellement utilisé chez l'animal. Dans la thérapie humaine, on utilise une

molécule proche de l'Antarelix appelée Cetrorelix dont la séquence est: AcDNaI-DpHe(pCl)-Dpal-Ser-Tyr-Dcit-Leu-Arg-Pro-Dala-NH₂.

Il faut savoir que l'Antarelix est également utilisé à d'autres fins comme la suppression de la sécrétion de testostérone chez le mâle, la suppression de LH chez le bélier castré... (Deghenghi, 1993).

6. Répétition des traitements

La superovulation répétée jusqu'à 5 fois durant la saison de reproduction ou non avec des intervalles de 6 mois à 1 an, engendre des réponses totales moyennes satisfaisantes, mais, on observe une diminution progressive dans la proportion de brebis superovulées et une chute significative dans le taux d'ovulation moyen spécialement entre le premier et le second traitement. Malgré ces variations dans le degré des réponses superovulatoires, le nombre d'embryons récupérés par brebis donneuse est très similaire pour un même animal ayant subi plusieurs traitements successifs (Bari et al, 2001).

7. Diagnostic

L'estimation du taux d'ovulation par comptage des corps jaunes peut être réalisée par échographie transrectale. Une expérience de diagnostic pendant l'œstrus et 8 jours après l'œstrus a été réalisée. Une sonde linéaire rectale de 7,5 MHz est utilisée chez des brebis couchées sur le dos. Cette méthode s'est révélée efficace pour vérifier les résultats de superovulation dans le transfert d'embryons (Kaulfuss et al, 1995).

Le diagnostic est aussi réalisé lors de l'insémination artificielle par laparoscopie. Il s'agit d'une technique qui utilise un endoscope et qui permet d'observer les organes internes. Le taux d'ovulation peut être estimé lors de l'observation des ovaires.



Figure 7 : Vagin artificiel (Baril et al, 1993)

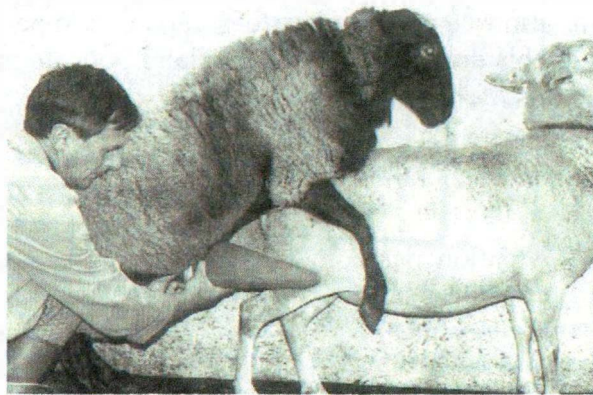


Figure 8 : Collecte de la semence (Baril et al, 1993)

Tableau 2 : Détermination de la note de motilité de la semence

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

Chapitre 2 : Conditionnement du sperme

1. Collecte

La collecte du sperme est préférentiellement réalisée à l'aide d'un vagin artificiel (fig.7-8). Celui-ci est constitué d'un manchon de caoutchouc souple doublé d'un autre, rigide. En continuité de ces manchons, on trouve un cône récolteur et un tube gradué afin de déterminer le volume de la semence. Le mâle est mis en présence d'une femelle en chaleur et lorsqu'il veut saillir, le pénis est détourné dans le vagin artificiel. Si le mâle a été préparé correctement à cette opération, la femelle peut ne pas être en chaleur et, parfois, on peut même utiliser un mannequin (Gordon, 1997).

Le sperme peut aussi être obtenu par électroéjaculation, mais cette technique donne des résultats moins bons (Derycke et al, 1991). Il s'agit de courants électriques de faible intensité qui vont stimuler la zone médullaire qui s'étend des vertèbres L2 à S1 et qui est responsable du contrôle de l'éjaculation. Cela se pratique surtout si l'animal n'est plus apte à saillir ou s'il refuse le vagin artificiel (Bister, 2001).

Il est important de préparer les béliers à cette opération. Cette préparation consiste à collecter du sperme deux à trois fois par jour pendant trois semaines avant la période d'insémination artificielle. Lors d'une expérience réalisée en Russie, on a enregistré un pourcentage de gestation de 66,4 % si les brebis étaient confrontées à des béliers préparés alors que le pourcentage observé dans le cas des béliers non préparés était de 20,9 %.

En fonction de la saison, la production de sperme subit des variations. En effet, chez des Suffolk, on obtient 1,1ml de sperme entre septembre et janvier tandis qu'un volume de 0,8ml est recueilli entre janvier et juin (Derycke et al, 1990 ; Mandiki, 1998).

Une femelle en œstrus augmente le volume de sperme collecté de 17 % par rapport à une femelle en non-œstrus.

De même, on observe un gain dans la collection de sperme si les béliers sont gardés constamment à proximité des brebis en œstrus car, dans ce cas, les fonctions testiculaires sont augmentées.

2. Détermination de la qualité du sperme

La qualité du sperme est évaluée sur différents paramètres comme la motilité, la concentration en spermatozoïdes, la morphologie...

- La motilité est décrite par des grades allant de 0 à 5 (tableau 2). Lorsqu'on attribue un grade de 0, cela signifie que l'on n'observe pas de mouvement tandis que si l'on attribue un grade de 5, cela correspond à de forts mouvements de tourbillons observés au microscope à faible grossissement dans une goutte de sperme. Généralement, les spermatozoïdes utilisés ont un grade supérieur ou égal à 4 (Gordon, 1997).
- Le volume est lu directement sur le tube de récolte sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat. Le volume moyen pour un bélier varie de 1ml à 1,5ml.
- La coloration est un paramètre directement observable à l'œil nu. Si le sperme récolté n'est pas blanchâtre mais présente une autre coloration, c'est un signe de pathologie. Par exemple, une couleur rose signale la présence de sang dans l'échantillon.
- Le pH est également un paramètre à mesurer car un pH trop alcalin par rapport à la moyenne est signe d'infertilité. Le pH moyen chez le bélier est de 6,8.

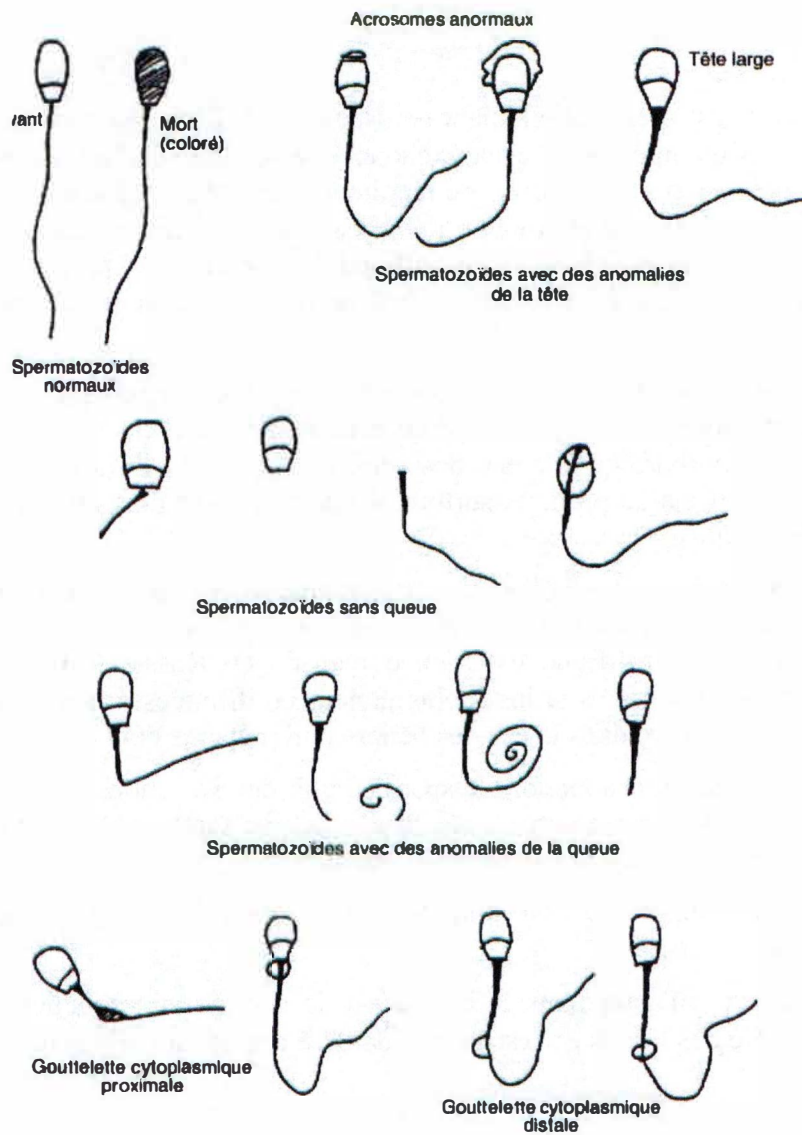


Figure 9 : Anomalies spermatiques (Baril et al, 1993)

- On peut estimer à la fois le taux de spermatozoïdes vivants et de normaux (fig.9) par une coloration vitale utilisant un colorant non toxique rejeté par les cellules vivantes et absorbé par les cellules mortes, comme l'éosine ou le bleu de méthylène. L'analyse microscopique permet de juger de la quantité de sperme, rejeté s'il présente un pourcentage de spermatozoïdes morts ou anormaux supérieur à 20 % (*Baril et al, 1993*).

D'autres tests peuvent encore être réalisés comme la mesure de la concentration, la morphologie, la présence de certaines substances...

3. Conservation

Il existe une méthode de conservation à court terme et une à long terme.

La conservation à court terme nécessite l'apport d'un dilueur afin de fournir les conditions optimales aux spermatozoïdes ainsi qu'un refroidissement pour limiter les pertes d'énergie. Le dilueur doit être isotonique par rapport au plasma séminal. Il doit présenter un pouvoir tampon, ne pas être toxique et apporter tous les éléments nécessaires au maintien d'un métabolisme de base du spermatozoïde. Les sucres présents dans le dilueur permettent de préserver la motilité des spermatozoïdes, de maintenir la pression osmotique extracellulaire et l'intégrité membranaire durant le stockage. Le refroidissement sera d'autant plus important que la conservation doit être longue. Mais dès 15°C, on observe des modifications pouvant entraîner des dénaturations. Les spermatozoïdes seront donc généralement conservés à la température-seuil de 16°C. Si la conservation doit être plus longue, un refroidissement progressif jusqu'à 4°C en +/- 2 heures est appliqué au sperme dilué et lui permet de garder son pouvoir de fécondité pendant au moins 48 heures dans le dilueur mis au point au Centre d'Insémination et de Sélection Ovines (CISO) (*Bister, 2001*).

La conservation à long terme est réalisée par congélation. Les cellules sont refroidies jusqu'à -196°C, température de l'azote liquide. Cette technique assure théoriquement une conservation infinie. Cette diminution de température est réalisée en plusieurs étapes. Tout d'abord, un refroidissement lent jusqu'à un point de surfusion (environ -7°C) est effectué. La cristallisation est initiée à ce moment par seeding (ce processus sera expliqué dans le Chapitre 4 au point 3 : Conservation des embryons). Le refroidissement se poursuit lentement jusqu'à -100°C et ensuite les spermatozoïdes sont plongés dans l'azote liquide à -196°C (*Bister, 2001*). Cependant, on observe une diminution des taux de conception après que le sperme a été stocké dans l'azote liquide pendant plus de quinze à vingt mois (*Gordon, 1997*). Des cryoprotecteurs sont utilisés afin de minimiser les dégâts causés par congélation (*Bister, 2001*). Le glycérol est le cryoprotecteur le plus efficace et l'on n'obtient aucun avantage lorsque l'on ajoute d'autres composants (*Gordon, 1997*). Cependant, un cryoprotecteur ne peut pas être utilisé à une concentration trop importante car cela engendre une toxicité pour les cellules (*Bister, 2001*).

Le sperme congelé présente de nombreux avantages dans les programmes d'insémination artificielle :

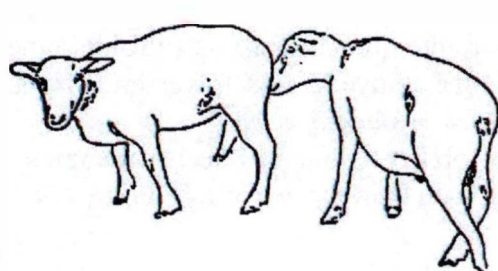
- Il permet d'utiliser de plus faibles doses dans l'insémination intra-utérine.
 - Il fournit des taux de fertilisation importants si l'insémination artificielle a lieu 48 à 55 heures après le retrait de l'éponge.
 - Il donne une chance d'accumuler des stocks de sperme de béliers pour les utiliser hors de la saison de reproduction.
 - Il permet l'import et l'export de sperme à travers différents pays.
- (*Gordon, 1997*).

Il faut néanmoins savoir que ces techniques de conservation de la semence présentent des résultats variables d'une espèce à l'autre du fait de la physiologie et de la biochimie des spermatozoïdes et des variations dans le transport du sperme chez les femelles de différentes espèces (*Holt, 2000*).

4. Décongélation

La phase de réchauffement est aussi importante que la phase de refroidissement lors de la congélation car les spermatozoïdes doivent une nouvelle fois traverser la zone critique de température située entre -15°C et -60°C (*Salamon et Maxwell, 2000*).

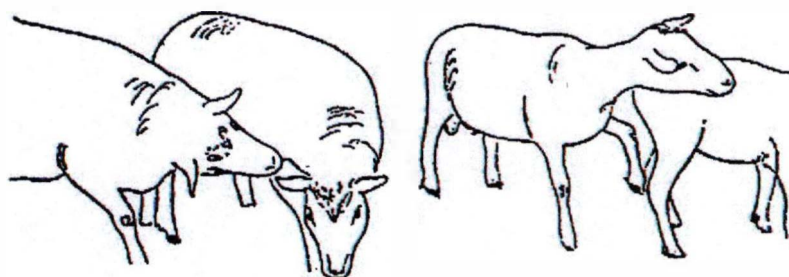
Le taux maximal de survie cellulaire est observé pour des réchauffements très rapides, c'est-à-dire plonger la paillette 8 secondes dans un bain-marie à 60°C (*Bister, 2001*).



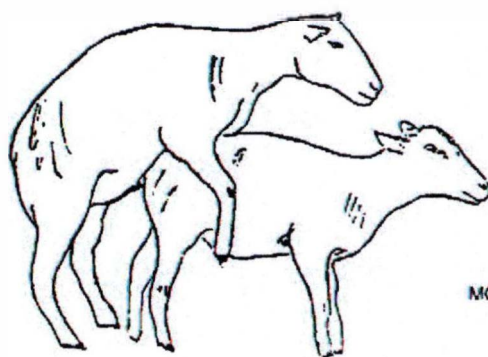
FLAIRAGES



FLEHMEN



APPROCHES



MONTES

Figure 10 : Comportement du mâle avant l'accouplement (Baril et al, 1993)

Chapitre 3 : Fécondation

1. Généralités

Chez le mouton, le dépôt de la semence est effectué dans le vagin par le mâle. Pour cela, la femelle doit être en période d'œstrus (fig.10). Les spermatozoïdes passent alors par le cervix et l'utérus avant d'atteindre l'oviducte où la fécondation peut avoir lieu entre l'ovule et un seul spermatozoïde (fig.11). La vitesse à laquelle les spermatozoïdes atteignent le site de fécondation dépend non seulement de leur motilité individuelle, mais surtout de la motilité du tractus génital femelle. Lorsqu'un spermatozoïde pénètre un ovocyte, il induit divers changements dont une modification de la zone pellucide afin d'empêcher la pénétration de plusieurs spermatozoïdes ainsi que la reprise et l'achèvement de la méiose. On observe une fusion des noyaux et l'œuf activé commencera à se diviser 24 heures plus tard (*Baril et al 1993*).

La fécondation peut être réalisée in vivo ou in vitro.

2. Fécondation in vivo

Dans ce cas, le dépôt de la semence doit être effectué de façon à ce que les spermatozoïdes se trouvent sur le lieu de fécondation au bon moment pour pouvoir pénétrer l'ovule car la durée de vie des gamètes est très courte ; ce paramètre est donc à prendre en compte lors du choix du moment optimum de l'insémination artificielle (*Baril et al, 1993*).

Le dépôt de la semence peut être :

- Vaginal : le sperme est déposé le plus loin possible dans le vagin, si possible à l'entrée du cervix. Il s'agit d'une insémination dite exocervicale. Cette méthode est souvent employée chez la brebis car il est difficile de traverser le cervix chez cet animal. Elle nécessite l'administration de 400.10^6 spermatozoïdes pour une fertilité maximale. Auparavant, on réalisait généralement deux inséminations espacées de 8 à 12 heures. Actuellement, on observe que le taux de réussite n'est pas significativement inférieur si on réalise une seule insémination généralement 54 heures après la fin du traitement progestatif de synchronisation de l'ovulation (*Gordon, 1997*).
- Utérin transcervical: le sperme est déposé dans l'utérus. Cette technique est réalisée pour des espèces dont le col est facile à franchir, comme la jument (*Bister, 2001*). Dans ce cas, le taux de conception est plus faible si on utilise du sperme congelé que si on utilise du sperme frais dilué (*Gordon, 1997*).
- Utérin par endoscopie : les spermatozoïdes sont injectés dans l'utérus à travers la paroi abdominale. Une fibre optique et un pistolet d'insémination terminé par une fine aiguille sont introduits dans la paroi abdominale sous anesthésie. Du sperme est injecté dans chacune des cornes utérines. Cette technique permet l'utilisation d'un plus petit nombre de spermatozoïdes (2×20.10^6 chez la brebis) et ceux-ci peuvent être moins vigoureux car ils seront directement injectés dans la cavité utérine (*Bister et al, 1989*). Cette technique est aussi beaucoup employée chez le mouton (*Bister, 2001*). Le taux de fertilisation est identique pour du sperme congelé et pour du frais (*Gordon, 1997*). Chez la brebis superovulée, la qualité embryonnaire est maximale si elle subit une insémination intra-utérine avec 100 millions de spermatozoïdes 2 à 6 heures après le début des chaleurs en sachant que celles-ci durent en moyenne 20 heures (*Brebion et al, 1992*).
- GIFT : les spermatozoïdes sont injectés dans l'oviducte en pénétrant par le pavillon.
- Malgré les avantages qu'elle présente, cette méthode est peu utilisée car elle est difficile à réaliser.

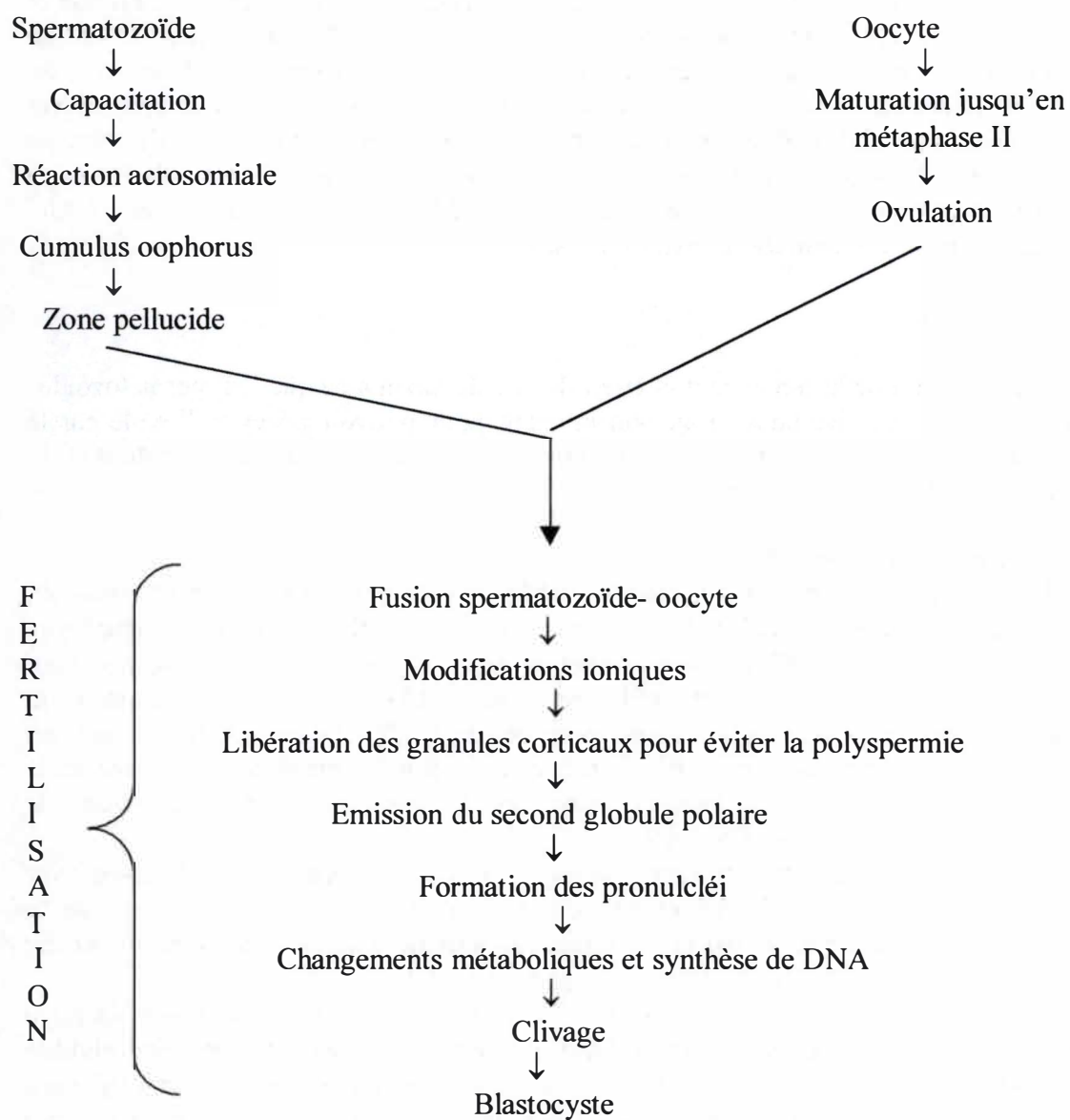


Figure 11: Schéma théorique des différentes étapes du processus de fécondation.

- Intra-folliculaire : les spermatozoïdes sont directement injectés dans le follicule ovarien qui constitue un excellent milieu de capacitation.
- Intra-péritonéale : le dépôt est effectué dans les cul-de-sac de Douglas via une injection de spermatozoïdes à travers la paroi profonde du vagin (*Bister, 2001*).

3. Laparoscopie

Antérieurement, les techniques d'insémination intra-utérine et de récupération d'embryons chez les brebis impliquaient une chirurgie importante et des manipulations de l'utérus. Plus tard, on a émis l'hypothèse que ces procédures pourraient réduire la fertilité des brebis en provoquant des adhésions post-opératoires. C'est pourquoi des techniques utilisant la laparoscopie ont été développées et peuvent maintenant être appliquées (*Lymberopoulos et al, 2001*).

La laparoscopie est une technique d'exploration des cavités internes qui utilise un système optique présentant 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 technique sont à jeun depuis 24 heures afin de réduire le volume de la vessie et de la panse, ce qui facilite l'examen. La brebis est positionnée en décubitus dorsal sur la table d'endoscopie (fig.12-13). Le ventre est alors tondu et désinfecté. Deux injections sont réalisées en évitant les vaisseaux sanguins afin d'induire une anesthésie locale. L'arrière-train est élevé d'un angle de 40° par rapport à l'horizontale.

L'endoscope est connecté à la source de lumière froide et la canule est reliée à la bonbonne de gaz. La canule munie du premier trocart est insérée à gauche de la ligne médiane dans la cavité abdominale, puis, le trocart est remplacé par l'endoscope. La seconde canule recevant les instruments d'insémination et munie du deuxième trocart est insérée à droite de la ligne médiane (fig.14-15). Le contenu abdominal est rendu visible par insufflation d'un volume d'air

L'insémination proprement dite peut alors avoir lieu (*Bari et al, 1993*).

4. Fécondation in vitro

Il s'agit d'une technique qui permet d'étudier plus en détail la maturation des gamètes, qui permet la production de jeunes par des femelles stériles et qui aide au développement de certaines techniques comme le transfert d'embryons. On observe de cette façon que le temps nécessaire à la maturation in vitro varie en fonction des différentes espèces : si ce temps est de 24 heures pour la brebis, il est de 36 heures pour la jument (*Cognié et al, 1992*).

La fécondation a lieu dans un puits où sont placés les ovocytes maturés et les spermatozoïdes capacités.

La récupération des ovocytes est réalisée par OPU (ovum pick-up) c'est-à-dire une méthode consistant à aspirer le contenu des follicules. Chez les animaux, la force d'aspiration est importante afin de décoller le cumulus oophorus de la granulosa. Les COC (complexes ovocyte-cumulus) sont triés et lavés dans des milieux stériles contenant des antibiotiques puis transférés dans des milieux contenant des hormones et du fluide folliculaire qui déclenchent la maturation ovocytaire.

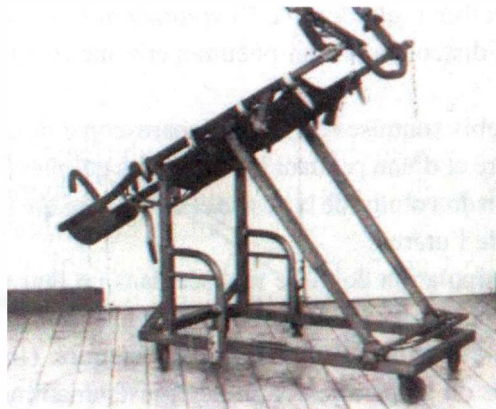


Figure 12 : *Table d'endoscopie (Baril et al, 1993)*

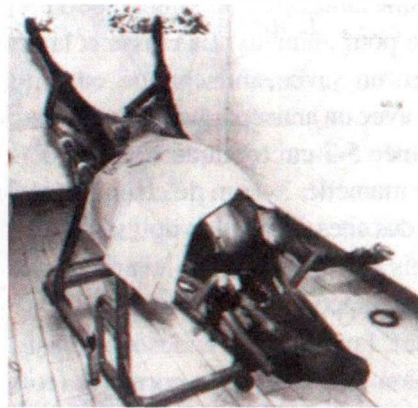


Figure 13 : *Brebis en décubitus dorsal sur une table d'endoscopie (Baril et al, 1993)*

Les spermatozoïdes sont également capités in vitro.

Une fois ces étapes réalisées, les ovocytes sont placés dans un puits et sont additionnés des spermatozoïdes. La fécondation peut avoir lieu (*Bister, 2001*).



IA par voie laparoscopique. Lieux d'insertion des instruments chirurgicaux
1 = Trocart et canule recevant les instruments d'optique
2 = Trocart et canule recevant les instruments d'IA
3 = Champ opératoire
4 = Ligne abdominale médiane

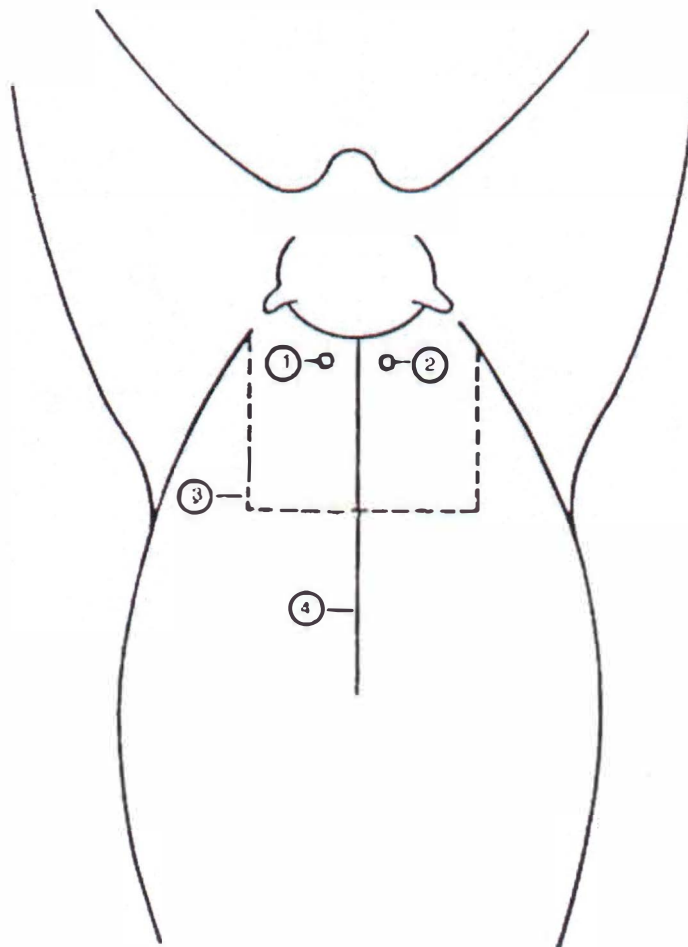


Figure 14 : Champ opératoire lors d'une insémination artificielle

IA par voie laparoscopique. Les différents instruments en place dans la femelle, avec le
palpateur
I = palpateur, voir figure 73

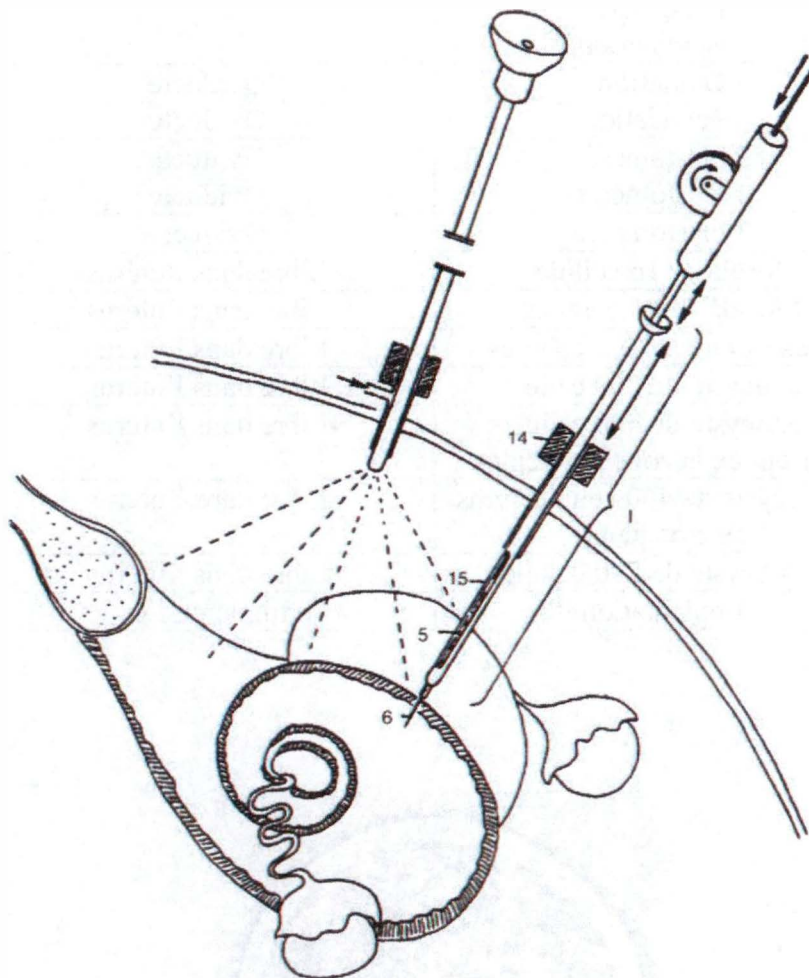


Figure 15 : Coupe sagittale lors d'une I.A. chez la brebis (Baril et al, 1993)

Tableau 3 : Développement embryonnaire chez le mouton

Jour	Stade	Situation	Temps après le début de l'oestrus (h)
0	Début de l'oestrus Pic de LH Insémination		0 Oestrus 0-12
1	Ovulation Fécondation	Oviducte Oviducte	24-30 25-31
2	2 blastomères 4 blastomères	Oviducte Oviducte	56 60
3	8 blastomères	Oviducte	72
4	Morula de 16 cellules	Libre dans l'utérus	96
5	Morula de 48 cellules	Libre dans l'utérus	
6	Blastocyste de 100 cellules	Libre dans l'utérus	
7	Blastocyste de 200 cellules	Libre dans l'utérus	
8	Blastocyste de 400 cellules sortant de la zone pellucide	Libre dans l'utérus	
9	Blastocyste de 400 cellules sans zone pellucide	Libre dans l'utérus	
10	Blastocyste de 700 cellules	Libre dans l'utérus	
14	Implantation	Implantation	

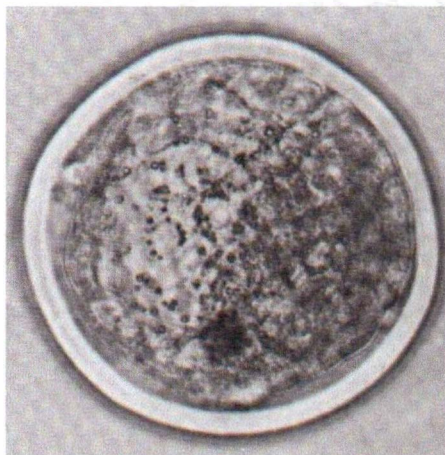


Figure 16 : Embryon au stade blastocyste avec bouton embryonnaire en formation
(Wintenberger Torres S. et Sevellec C., 1987)

Chapitre 4 : Collecte des embryons

1. Caractéristiques du développement embryonnaire

Une fois l'ovocyte fécondé, la mitose permet la formation d'un embryon à 2 blastomères environ 24 heures après la fusion des gamètes. Les divisions vont alors se succéder pour donner des cellules de plus en plus petites étant donné que la taille de l'embryon ne change pas, celui-ci restant enfermé dans sa zone pellucide.

Lorsque le nombre de cellules constituant l'embryon est compris entre 16 et 32, on parle de morula. C'est au début de ce stade que l'embryon quitte l'oviducte pour rejoindre l'utérus.

On observe ensuite la formation d'une cavité pleine de liquide. A ce stade l'embryon est le blastocyste. Les embryons sont collectés à ce stade, c'est-à-dire vers le jour 6 ou 7 de leur développement. En effet, à ce stade, l'embryon est toujours protégé par sa zone pellucide et ne se trouve plus dans l'oviducte mais est encore libre dans l'utérus.

La technique de collecte réalisée dans la partie pratique de ce mémoire est un rinçage des cornes utérines à l'aide de PBS, c'est pourquoi il est impératif que les embryons ne se trouvent plus dans l'oviducte à ce moment.

L'embryon subit ensuite toute une série d'expansions qui vont aboutir à sa sortie de la zone pellucide. Il s'attache à l'épithélium de la corne utérine le jour 14 de la gestation. Il sécrète de multiples substances dont une, appelée trophoblastine en raison de son origine, qui induit au niveau de l'utérus la synthèse et la sécrétion de PGE_2 . Cette trophoblastine a été identifiée et correspond chez les ruminants à l'interféron τ . La PGE_2 possède une forte action lutéotrope et est à même de contrecarrer l'action de $PGF_{2\alpha}$ produite aussi par l'utérus et qui est responsable de la lutéolyse lors des cycles sans fécondation. Le tableau 3 reprend les différentes étapes du développement embryonnaire chez la brebis (*Baril et al, 1993*).

2. Collecte des embryons

Les embryons doivent être collectés au stade morula compactée ou au stade blastocyste, ce qui correspond au jour 6-7 chez la brebis (fig.16). Le taux de survie le plus élevé est obtenu pour des embryons au stade blastocyste (*Armstrong et Evans, 1983*). De plus, les techniques de congélation disponibles aujourd'hui s'adressent surtout aux stades morula compactée ou blastocyste (*Baril et al, 1993*).

La collecte est réalisée via un rinçage de chaque corne utérine ou de l'oviducte avec un tampon phosphate. Celui-ci est recueilli avec les embryons dont on examine la morphologie et seuls les « normaux » sont sélectionnés pour la conservation et le transfert. Cette sélection est principalement basée sur trois critères : uniformité dans la taille et l'apparence, étape de développement de l'embryon en relation avec le moment présumé de l'ovulation et enfin, compaction et symétrie de la masse (*Murray, 1978*).

3. Conservation des embryons

Les embryons peuvent être transférés « en frais » ou congelés et transférés ultérieurement.

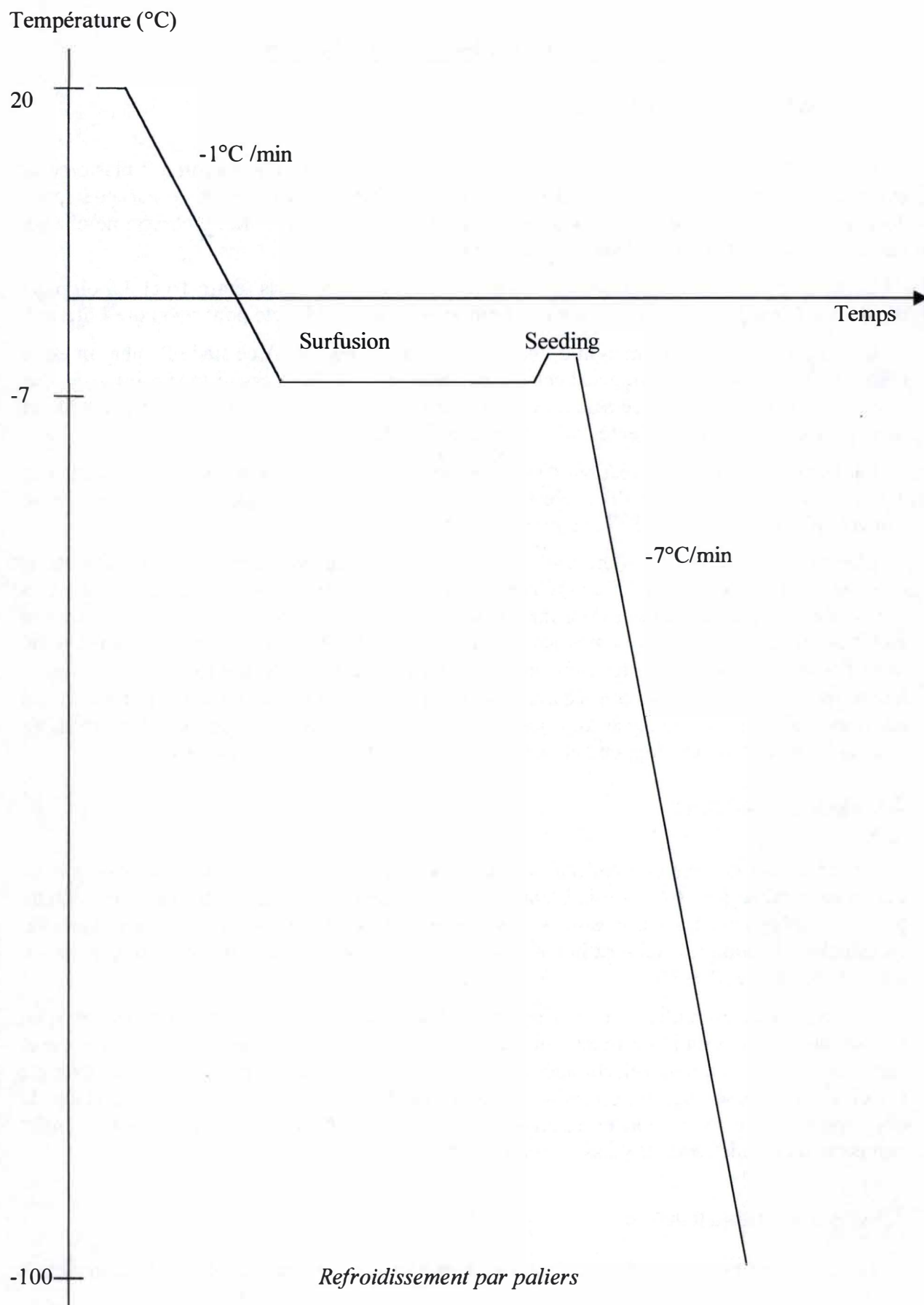


Figure 17 : Etapes de refroidissement pour la congélation des embryons.

3.1. Conservation des embryons frais

Ce moyen de conservation est employé lorsque la congélation n'est pas réalisable ou lorsqu'on veut simplement différer le transfert de 24 ou 48 heures (par exemple pour transférer les embryons vers un autre élevage où se trouvent les receveuses). Dans ce cas, on réalise un abaissement de la température afin de ralentir le métabolisme des embryons de façon temporaire. Si la température est amenée à 4°C, il est possible de conserver les embryons durant 48 heures sans agent cryoprotecteur.

Les embryons sont soit directement baignés dans une solution de PBS enrichi en protéines à 4°C ou refroidis à la vitesse de 1°C par minute pour finalement atteindre cette température de conservation. Le stockage a lieu dans un réfrigérateur ordinaire ou dans des containers spéciaux (avantageux par exemple en cas de transport).

Le réchauffement sera réalisé par passage direct dans une solution de PBS à 37°C (*Baril et al, 1993*).

3.2. Congélation-décongélation

La congélation des embryons est une procédure qui permet de mettre les embryons en culture mais également de les transférer ultérieurement, après décongélation, chez des femelles disponibles. Les embryons congelés pourront également être transportés à travers le monde. On comprend de cette façon que cette technique présente de nombreux avantages commerciaux ainsi que dans le domaine de la recherche fondamentale. Une mutation présente chez un embryon isolé et que l'on ne peut exploiter dans l'immédiat pourra être utilisée ultérieurement (*Leibo et Mazur, 1978*).

Le refroidissement peut être effectué selon deux méthodes qui donnent des résultats similaires.

3.2.1. Congélation classique

La méthode de congélation consiste à refroidir les embryons selon un programme complexe comme celui qui est appliqué aux spermatozoïdes. Bien qu'efficace et largement utilisée, elle nécessite du matériel coûteux et du temps (*Baril et al, 2001*).

Les embryons prélevés chez des femelles qui ont ovulé naturellement ou en réponse à des hormones entraînant la superovulation sont mis en suspension dans une solution contenant un cryoprotecteur comme le glycérol ou le DMSO (diméthyl sulfoxyde). Parfois, les embryons sont placés dans des bains à concentration de cryoprotecteurs croissantes afin d'éviter les chocs osmotiques.

La solution cryoprotectrice contenant l'embryon est refroidie jusqu'à une température légèrement inférieure à 0°C et soumise au seeding (fig.17). Ce procédé est important car il induit la formation très rapide de glace dans le milieu extracellulaire, ce qui est indispensable pour une congélation d'embryons réussie. Le seeding peut être réalisé de différentes manières. Une des approches consiste à remplir l'extrémité d'une pipette Pasteur avec de l'eau ou du milieu sans glycérol ni DMSO et de geler ce fluide à l'aide d'azote liquide ou

dans un congélateur. L'échantillon sera alors touché à l'aide de la glace formée dans la pipette. Il existe d'autres possibilités comme toucher l'échantillon à l'aide d'un fil de fer stérile.

La solution est ensuite refroidie jusqu'à -100°C à une vitesse critique (c'est-à-dire environ $0,3^{\circ}\text{C}$ par minute) de manière à ce que la cellule reste en équilibre osmotique approximatif avec le milieu et ce, jusqu'à ce que le système entier soit solidifié. Cette solidification a lieu entre -50°C et -75°C .

Enfin, le tout est plongé dans l'azote liquide à -196°C . Les échantillons sont alors conservés dans une cuve contenant de l'azote liquide. L'azote est le matériel de choix car il est disponible, relativement peu coûteux et non réactif. Cependant, si le refroidissement est effectué de façon trop rapide, la cellule ne peut conserver son équilibre osmotique et l'on observe la formation de glace dans le milieu intracellulaire, ce qui constitue un des facteurs de mortalité cellulaire durant le refroidissement (*Leibo et Mazur, 1978*).

Selon certains auteurs, prolonger le refroidissement lent au-delà de -35°C est inutile car, à cette température, le degré de déshydratation atteint limite considérablement les risques liés à la glace. Dans ce cas, une fois le palier de -35°C atteint, les paillettes sont directement plongées dans l'azote liquide (*Baril et al, 1993*).

3.2.2. Vitrification

La seconde méthode de cryopréservation est la vitrification qui est définie comme le processus physique par lequel une solution de cryoprotecteurs hautement concentrée se solidifie brusquement sans formation de cristaux de glace (*Dhali et al, 2000*). Lors de ce processus, les embryons baignent dans différents milieux (dont une solution de vitrification) pour ensuite être plongés dans l'azote liquide. Cette méthode est donc rapide et ne nécessite pas de matériel particulier ou coûteux. (*Baril et al, 2001*). De plus, cette méthode évite les dommages physiques causés par la formation de cristaux de glace observés dans la première méthode de refroidissement.

Cependant, pour permettre un état vitrifié lorsque l'embryon est plongé dans l'azote liquide, le cryoprotecteur doit être présent en concentration importante et cela présente une toxicité pour les embryons. Les cryoprotecteurs doivent donc être choisis judicieusement, leur concentration adaptée et le temps d'exposition des embryons à ces solutions réduit au minimum. Les solutions de cryopréservation sont supplémentées par une source protéique qui stabilise les membranes plasmiques et réduit la glace dans le milieu de vitrification. Ces sources protéiques peuvent être de l'albumine sérique bovine (BSA) ou du sérum de veau fœtal (*Naitana et al, 1997*).

La méthode consiste à baigner les embryons dans différents bains de plus en plus concentrés en agents cryoprotecteurs. Plus le cryoprotecteur se trouve en concentration importante dans la solution, moins le temps d'exposition de l'embryon à cette solution doit être important car cela pourrait présenter une certaine toxicité pour lui (*Mermillod et al, 1997*). Les embryons pourront alors être transférés soit après décongélation, soit directement sans retrait de l'agent cryopréservateur.

3.2.3. Réchauffement

L'étape suivante consiste à ramener les embryons à des températures physiologiques. Leur survie dépend tout autant de la vitesse à laquelle ils sont refroidis que de celle à laquelle ils sont réchauffés (*Leibo et Mazur, 1978*). Après dégel, si les embryons sont exempts d'anomalie, le taux de réanimation moyen est de 70 % (*Brebion et al 1992*).

Afin de réaliser cette opération, les paillettes sont placées à l'air puis dans l'eau pendant un court laps de temps. Ensuite, le contenu de la paillette est extrait pour pouvoir repérer les embryons qui seront placés dans différents bains d'osmolarités décroissantes destinés à les réhydrater. Les embryons pourront alors être transférés (*Mermillod et al, 1997*).

Chapitre 5 : Préparation des receveuses

1. Gestation

L'implantation a lieu entre le 14^{ième} et le 17^{ième} jour. A ce moment, l'embryon et l'utérus maternel vont établir un placenta épithéliochorial à travers lequel auront lieu tous les échanges. Chez la brebis, la présence du corps jaune est indispensable durant les 2 premiers mois afin d'assurer la production de progestérone. La durée d'une gestation varie entre 140 et 152 jours, ce qui correspond à une période d'environ 5 mois (*Bari et al, 1993*).

Cependant, durant les semaines suivant la conception, il arrive d'observer une mort embryonnaire. Cette mortalité peut être due à des anomalies survenant durant le développement embryonnaire qui inclut l'implantation, la reconnaissance maternelle de gestation (c'est-à-dire la modification de la fonction ovarienne), la formation du placenta et du système cardiovasculaire.

L'implantation implique une interaction entre le blastocyste et l'endomètre utérin. Cette interaction dépend d'un signal endocrine au niveau de l'endomètre qui est sous l'influence de plusieurs gènes dont, par exemple, le gène LIF. On sait que ce gène est exprimé par l'endomètre en période d'implantation, mais les mécanismes d'action de la protéine codée par ce gène et de son récepteur restent obscurs. Par contre, la dépendance de l'implantation vis-à-vis de ce gène est claire car, chez les mutants LIF⁻ en culture, l'implantation n'a pas lieu. Les embryons qui ne possèdent pas de récepteur LIF peuvent néanmoins s'implanter in vivo. Donc, bien que ce gène semble important pour le développement embryonnaire son rôle n'est pas encore bien compris.

Les défauts du placenta peuvent être engendrés par divers mécanismes moléculaires résultant en anomalies du trophoblaste, du mésenchyme ou des composants vasculaires. Les gènes exerçant un contrôle sur ces formations sont également nombreux. Parmi ceux-ci, on trouve Mash2 et Hand1 qui jouent des rôles importants dans la différenciation des cellules du trophoblaste. De plus, ces gènes sont en interaction car ils contrôlent des phénomènes opposés (Hand1 permet la différenciation cellulaire et Mash2 empêche la différenciation d'un trop grand nombre de cellules trophoblastiques) et Hand1 exerce un rétrocontrôle négatif sur Mash2. D'autres gènes sont encore importants comme Ets2 qui est un facteur de transcription nécessaire pour l'invasion du trophoblaste dans l'utérus, Gata2 et 3 qui interviennent dans la régulation du flux sanguin maternel, etc...

Bien que les connaissances dans ce domaine soient faibles, la mise en évidence de certains gènes indispensables pour le développement embryonnaire est un point positif dans le diagnostic des problèmes cliniques chez les embryons (*Cross, 2001*).

2. Synchronisation des donneuses et des receveuses

Les cycles ovulatoires de la donneuse et de la receveuse doivent être synchronisés afin que la brebis soit prête à recevoir l'embryon au stade auquel il est transféré. Autrement dit, la receveuse doit se trouver dans les mêmes conditions embryologiques que la donneuse afin de pouvoir accueillir les embryons dans l'environnement intra-utérin.

La synchronisation peut être naturelle, mais cela nécessite un grand nombre de receveuses pour que, finalement, seul un petit nombre se révèle être vraiment synchronisé. Elle est donc souvent engendrée de façon artificielle (*Murray, 1978*). Généralement, elle est réalisée grâce à

un traitement semblable à celui administré aux donneuses, c'est-à-dire via des éponges de progestérone et l'injection d'hormones gonadotropes (*Armstrong et Evans, 1983*).

La synchronisation doit présenter une marge maximum de 24 heures entre l'état de développement de l'embryon et le jour du cycle de la brebis receveuse afin de pouvoir réaliser un transfert efficace (*Murray, 1978*).

Souvent, le transfert est réalisé avec 2, 3 embryons ou même plus car les chances d'observer une gestation augmentent avec le nombre d'embryons transférés (de même que le risque d'observer des jumeaux) (*Bister, 2001*).

Les brebis receveuses doivent être judicieusement choisies car les facteurs maternels peuvent avoir une influence sur la taille du fœtus. Cette influence est davantage observée lorsque de gros fœtus se développent dans une petite brebis que lorsque de petits fœtus se développent dans une grosse brebis (*Armstrong et Evans, 1983*).

Les variables principales qui influencent le taux de fécondité chez les receveuses sont le degré de synchronisation, le taux d'ovulation des donneuses et des receveuses, l'étape de développement des embryons transférés, le temps écoulé depuis l'agnelage précédent chez les receveuses, la fécondité des receveuses lors de l'agnelage précédent, l'âge des donneuses, la concentration plasmatique de progestérone chez les receveuses... (*Alabart et al, 1995*).

Chapitre 6 : Techniques de transfert des embryons

Après avoir récupéré les embryons obtenus chez les femelles donneuses, ceux-ci seront placés chez des brebis receveuses. De cette façon, on augmente la descendance des meilleures brebis qui seront destinées à produire des embryons sans perdre de temps avec la gestation (Courot).

Si on transfère deux embryons frais par laparoscopie à une receveuse bien synchronisée, la fertilité est de 70-80 % (Brebion et al, 1992).

La brebis est placée en décubitus dorsal sur une table d'endoscopie et son abdomen est tondu, lavé et désinfecté. Le transfert est réalisé sous anesthésie locale ou générale et une incision est pratiquée dans l'abdomen. Le transfert a lieu dans les cornes utérines, l'utérus ou l'oviducte grâce à la pointe d'une aiguille stérile permettant de perforer légèrement l'endroit considéré. Une pipette contenant les embryons est insérée et le transfert peut avoir lieu.

Il existe des méthodes de transfert non-chirurgical, mais elles semblent surtout efficaces chez le cheval et le bovin. Une de ces méthodes consiste à faire passer un tube à travers le cervix pour déposer les embryons dans l'utérus. Dans ce cas, le passage du cervix doit être aisé, ce qui n'est pas le cas chez le mouton (Murray, 1978).

Le transfert d'embryons congelés est réalisé dans les 30 minutes après le retrait du cryoprotecteur. Des essais ont également été réalisés sans enlever ce cryoprotecteur et sans évaluer la qualité des embryons avant le transfert. Dans ce cas, on utilise un instrument particulier et tout le contenu de la paillette est transféré chez la receveuse, ce qui augmente de 10 fois le volume de liquide injecté dans l'utérus par rapport au transfert classique, mais cela ne semble pas avoir d'impact négatif (Baril et al, 1993).

Généralement, les taux de gestation observés sont les mêmes pour les embryons transférés « en frais » que pour ceux qui sont soumis à une vitrification mais le taux de survie est légèrement supérieur dans le premier cas. Le fait d'enlever ou non le cryopréservateur n'a apparemment pas d'effet sur les taux de gestation, d'agnelage et de survie.

Si les embryons ont subi une vitrification, les résultats observés seront meilleurs pour ceux obtenus in vivo tandis que, si les embryons sont transférés « en frais », on n'observe aucune différence, que les embryons soient issus d'une fécondation in vivo ou in vitro (Martinez, 1997).

Le taux de survie des embryons est défini comme la proportion d'embryons transférés résultant en agneaux à terme (McMillan et Hall, 1994). Ce taux peut être influencé par toute une série de facteurs :

- Lorsque c'est possible, les techniques non-chirurgicales sont préférables car elles sont moins risquées pour la santé de la brebis, qu'il s'agisse de la donneuse ou de la receveuse et leur coût est moins important. Cependant, de telles techniques entraînent des taux de gestation moindres.
- L'utérus peut être victime d'une infection, ce qui réduit le taux de survie des embryons. Néanmoins, ce problème peut être évité en utilisant des techniques aseptiques, des antibiotiques....
- Les taux observés sont plus élevés pour les embryons plus avancés en âge ; par exemple, le taux de survie sera plus important pour un embryon au jour 4 transféré dans un utérus au jour 3 que pour un embryon au jour 3 transféré au jour 3.
- On observe également une diminution importante si la différence dans les synchronisations est supérieure à 24 heures.

Chapitre 7 : Diagnostic de gestation

Il existe des techniques très anciennes de diagnostic de gestation qui ne nécessitent pas de matériel particulier. Parmi ces techniques, on trouve la détection de l'oestrus un cycle après l'insémination artificielle et la palpation manuelle des femelles. Mises à part ces techniques assez rudimentaires, des techniques biochimiques et biophysiques ont été mises au point

On peut réaliser un diagnostic basé sur un dosage hormonal.

Le dosage de progestérone les jours 18 et 19 chez la brebis permet de mettre les femelles non-gestantes en évidence. Il s'agit d'un test précoce dont la précision est supérieure à 90 %. Ce test peut également être utilisé afin de détecter les femelles en gestation, mais, dans ce cas, il s'agit d'un test tardif et qui nécessite plusieurs prélèvements afin de différencier les femelles gestantes des femelles vides présentant un corps jaune cyclique. La progestérone peut facilement être dosée lors de tests immunologiques réalisés en laboratoire sur des prélèvements de sérum ou de lait *Bister et al, 1986*).

Les oestrogènes peuvent également servir à détecter la gestation. Une femelle gestante sécrète des quantités importantes d'oestradiol par le placenta si celui-ci est suffisamment développé tandis que les oestrogènes produits par le follicule pré-ovulatoire sont difficilement détectables dans le plasma sanguin. Il s'agit d'un diagnostic tardif de gestation qui doit être réalisé entre les jours 100 et 110 afin de présenter une fiabilité suffisante.

Un autre dosage a été mis au point récemment pour diagnostiquer la gestation. Il s'agit de celui des PAG (pregnancy associated glycoproteins). Ces glycoprotéines constituent une famille dans laquelle le PM varie de 43 000 à 67 000 Da. Elles sont synthétisées par le placenta et sont déversées dans la circulation maternelle dès le début de la gestation. Une fois dans le sang maternel, ces protéines sont très stables et leur demi-vie s'exprime en dizaines d'heures, voire en jours. Leurs rôles présumés restent des hypothèses, mais on pense qu'elles interviendraient dans le transport de peptides et seraient de cette façon impliquées dans l'établissement de la gestation, dans le maintien du corps jaune, dans la croissance fœtale ainsi que dans les processus d'immunotolérance du fœtus par la mère (grâce à leur capacité de suppression de l'activité des lymphocytes). La concentration de ces protéines n'augmente pas considérablement en fonction de l'évolution de la gestation.

Ces protéines permettent de réaliser un diagnostic précoce de gestation vu qu'elles sont synthétisées vers le 11^{ème} jour de gestation par les cellules binuclées du trophoblaste placentaire dans lesquelles elles seront stockées avant d'être déversées dans la circulation maternelle (*Zoli et al, 1993*)

Chez la brebis, la gestation peut être mise en évidence par la méthode utilisant l'effet Doppler. Il s'agit d'un processus basé sur la détection de la circulation sanguine fœtale à l'aide d'une sonde externe ou du flux sanguin utérin de la mère avec une sonde rectale. Dans les deux cas, on perçoit les sons des échos ultrasoniques provenant du flux sanguin. (*Baril et al, 1993*). Cette méthode est valable si elle est utilisée après 50 jours de gestation (*Murray, 1978*).

L'échoscopie est une méthode qui utilise la détection d'une poche de liquide chez la femelle. Le diagnostic sera suffisamment précis après 65 jours de gestation.

On peut également utiliser la méthode classique de l'échographie qui permet la visualisation directe du fœtus et du liquide amniotique sur écran. L'échographe est un appareil composé d'une sonde émettrice - réceptrice, d'un ordinateur et d'un écran. La sonde émet des ondes ultrasonores réfléchies de façon différente en fonction qu'elles rencontrent tel ou tel tissu. Les ondes réfléchies sont traduites en image par l'ordinateur et apparaissent à l'écran. Pouvoir interpréter ces images demande une certaine expérience. Si la sonde est externe, elle

est appliquée près du pis dans la région de l'aine. L'échographie peut être réalisée après 21 jours avec une sonde rectale et après 32 jours avec une sonde externe. Cette dernière méthode présente une précision de 100 % si elle est réalisée après 37 jours. Après le centième jour de gestation, le jeune prend trop de place sur l'écran par rapport à la sonde et il devient malaisé d'estimer la taille, et plus encore le nombre de jeunes présents (*Baril et al, 1993 ; Marot et Bister, 1990*)).

Objectifs du Mémoire

Objectifs

Les recherches qui ont été initiées et rapportées dans ce mémoire ont pour but de répondre à l'évaluation des techniques de reproduction ovine. Pour augmenter l'intensité de la sélection et en accélérer le progrès, certains éleveurs de pointe souhaitent pouvoir utiliser les avantages du transfert d'embryons. Cette technique, bien maîtrisée chez les bovins, est encore au stade expérimental chez les ovins et quelques laboratoires se penchent sur ce problème.

L'objectif de ce travail est de tester les techniques qui donnent les résultats les plus sûrs à l'heure actuelle même s'il s'agit de méthodes assez lourdes et traumatisantes, à savoir l'insémination artificielle intra-utérine par laparoscopie, la collecte d'embryons par voie chirurgicale via un flux de rinçage unidirectionnel des cornes utérines et ce, après extériorisation du tractus reproducteur de la cavité abdominale et enfin, le transfert semi-chirurgical des embryons avec extériorisation de l'extrémité de la corne utérine.

Outre le côté technique à mettre au point, l'objectif du mémoire est d'étudier la superovulation induite par une nouvelle méthode de contrôle endocrinien.

Celle-ci est basée sur l'utilisation d'un nouvel antagoniste du GnRH appelé Antarelix qui, en bloquant les sécrétions de LH et de FSH, doit aussi bloquer la croissance folliculaire terminale et permettre l'établissement d'un stock important de petits follicules recrutables qui seront ensuite stimulés par des hormones gonadotropes exogènes.

L'administration de progestagènes par voie vaginale doit bloquer les cycles et améliorer le taux d'ovulation.

L'injection de FSH selon un mode décroissant doit induire la croissance folliculaire. L'administration de cette hormone est étalée sur une durée de 4 jours.

L'ovulation est induite en comparant une injection classique de LH avec 2 injections de Busereline, c'est-à-dire un agoniste de GnRH.

Au terme de ces traitements, différentes analyses seront réalisées : les sécrétions endocrines, la population folliculaire, le taux d'ovulation et le taux de récolte des embryons.

Une première expérience a été conduite en vue d'analyser ces paramètres et de suivre l'évolution des hormones sur base de prises de sang quotidiennes.

Au vu des résultats, une seconde expérience a été mise sur pied pour comparer un des modes d'administration d'Antarelix à l'absence d'Antarelix, témoin négatif absent du premier essai, et pour suivre de plus près les événements endocriniens se déroulant en période pré-ovulatoire.

Deuxième partie :

Matériel et méthodes.

1. Les animaux

Les 18 brebis utilisées durant ces expériences sont élevées au Centre de Recherches Ovines (CRO) à Faulx-Les-Tombes. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau 4. Il s'agit de brebis de la race Texel, choisies car elles appartiennent à une race pure soumise au plus grand effort de sélection dans notre pays.

Toutes ces brebis participeront à la 1^{ère} expérience, et 8 d'entre elles à la seconde.

Tableau 4 : Caractéristiques des brebis.

N° de brebis	N° SANITEL	Date de naissance	Date du dernier agnelage	A participé à la 2 nd e expérience
1	7145	23.03.92	03.05.01	Oui
2	7165	08.02.95	13.02.01	Non
3	5305	10.04.97	10.05.00	Oui
4	7254	21.03.00	/	Oui
5	7118	20.03.00	/	Non
6	5341	08.10.97	28.02.01	Oui
7	7170	01.01.98	19.02.01	Non
8	7253	04.03.96	05.04.99	Oui
9	4033	12.03.99	07.02.01	Oui
10	5228	04.04.93	29.03.99	Non
11	5349	10.03.98	04.04.01	Non
12	4044	05.04.99	28.04.01	Non
13	4010	04.03.98	05.03.01	Oui
14	Perdu	?	?	Non
15	7109	16.04.00	/	Oui
16	7252	20.03.92	07.02.00	Non
17	7255	26.03.97	16.04.00	Non
18	5299	03.03.97	12.03.99	Non

2. Les produits utilisés

Le tableau 5 donne la liste des produits utilisés lors des expériences.

Tableau 5 : liste des produits utilisés, leur référence et leur rôle.

Produit	Référence	Rôle
Antarelix	Teverelix®Sygena EP24332#379	Blocage de l'hypophyse
Eponges de progestagènes	Veramix® 60mg Upjohn	Blocage de l'ovulation
FSH	Batch F020121 Ulg prof. J.F.Beckers	Croissance et maturation folliculaire
LH	Batch L990301-0628 Ulg Prof. J.F.Beckers	Ovulation
Solvant pour stimufol	Ulg (Université de Liège)FMV 1376 S1F12	Dilution de la FSH et de la LH
Busereline	Receptal® N877-373	Superovulation
Paillettes	IMV 6370	Stockage des embryons
Lignocaïne	IC KELA 97K24/4658	Anesthésie locale
Novalgine	3006IE107F12	Prévention de l'inflammation
Duphaphen (Pénicilline)	Duphaphen® 3003IE49F12	Antibiotique
PBS (phosphate buffer saline)	IMV 2250	Récupération des embryons
OCM (oocyte culture medium)	IMV 2163	Milieu nutritif pour les embryons
Glycérol	Vel 1384	Cryoprotecteur
Ethylène glycol	Sigma E-9129	Cryoprotecteur
Galactose	Sigma G-5388	Remplissage de la paillette

La première partie de l'expérience consiste à engendrer un blocage hypophysaire chez les brebis. Ce blocage sera réalisé à l'aide d'Antarelix qui est un antagoniste de la GnRH et d'éponges de progestagènes .

L'Antarelix nous a gracieusement été fourni sous forme cristalline par la firme Europeptide à titre expérimental. Cette substance est administrée en injections sous-cutanées selon des schémas différents pour permettre l'observation de ses effets lorsqu'il est administré

en petite quantité. L'avantage de la réduction des administrations serait secondairement de réduire le coût du traitement. L'Antarelix est mis en solution dans du Mannitol 5 % stérile en fioles stériles sous hotte à flux laminaire. La concentration finale est de 0,5mg/ml.

Le blocage de l'ovulation est renforcé par la pose d'éponges de progestagènes qui permettent également la synchronisation du troupeau. Ces éponges sont remplacées après 7 jours afin de maintenir un taux élevé de progestagènes dans le sang. L'éponge est fixée au bout d'un tube en PVC (qui est désinfecté avant chaque utilisation) et placée dans le fond du vagin. Le retrait est réalisé via la ficelle reliée à l'éponge et qui sort de la vulve. Ce traitement est normalement facultatif si l'Antarelix est efficace mais est maintenu pour le pouvoir stimulant de la progestérone sur le début de la croissance folliculaire terminale.

Les produits utilisés pour induire la maturation folliculaire sont la FSH et la LH ou la Busereline en fonction du traitement.

La LH et la FSH sont injectées en intra-musculaires après avoir été diluées dans du solvant pour Stimufol. Les hormones sont des hormones purifiées extraites de l'hypophyse de porc.

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

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

Chez certaines brebis, la LH est remplacée par de la Busereline. Celle-ci est un agoniste de la GnRH et permet l'induction de l'ovulation. L'objectif est également de diminuer le prix de l'opération.

Les paillettes sont utilisées lors de l'insémination artificielle afin d'y placer la semence qui sera injectée dans les cornes utérines.

La Lignocaïne induit une anesthésie locale à l'endroit où sont insérés les trocars.

Une fois l'opération terminée, la Novalgine et le Duphaphen permettent d'éviter l'apparition d'une inflammation.

La collecte des embryons est réalisée par un rinçage des cornes utérines avec du PBS.

Après la récupération, l'injection de Pénicilline empêche l'apparition d'infection.

L'OCM est un milieu nutritif qui permet de maintenir les embryons en vie entre la collecte et la vitrification. Cette solution est aussi utilisée dans la préparation des différents bains de vitrification.

Le glycérol et l'éthylène glycol sont des cryoprotecteurs qui interviennent dans le processus de vitrification des embryons.

Enfin, le galactose est employé pour remplir les paillettes dans lesquelles les embryons sont conservés à -196°C .

Brebis superovulées	Groupe 1			Groupe 2				Groupe 3				Groupe 4				Groupe 5		
	At-LH 1	A4-LH 2	A3-LH 3	At-B 4	A4-B 5	A3-B 6	At-LH 7	A4-LH 8	A3-LH 9	At-B 10	A4-B 11	A3-B 12	At-LH 13	A4-LH 14	A3-LH 15	At-LH 16	A4-LH 17	A3-LH 18
Date	DPS	DPS	DPS															
Lu 4/2																		
Ma 5/2																		
Me 6/2	E-A0,5	E-A0,5	E-A1															
Je 7/2	A0,5																	
Ve 8/2	A0,5																	
Sa 9/2	A0,5	A0,5		DPS	DPS	DPS	DPS											
Di 10/2	A0,5																	
Lu 11/2	A0,5			E-A0,5	E-A0,5	E-A1	E-A0,5											
Ma 12/2	A0,5		A1	A0,5			A0,5											
Me 13/2	E-A0,5	E-A0,5	E	A0,5			A0,5											
Je 14/2	A0,5			A0,5	A0,5		A0,5											
Ve 15/2	A0,5			A0,5			A0,5											
Sa 16/2	A0,5	A0,5	A0,5	A0,5			A0,5	DPS	DPS	DPS	DPS							
Di 17/2				A0,5		A1	A0,5											
Lu 18/2		FSH6+6		E-A0,5	E-A0,5	E	E-A0,5	E-A0,5	E-A1	E-A0,5	E-A0,5							
Ma 19/2		FSH5+5		A0,5			A0,5			A0,5								
Me 20/2		FSH3+3		A0,5			A0,5			A0,5								
Je 21/2		RE-FSH2+2-LH0,06+0,09		A0,5	A0,5	A0,5	A0,5	A0,5		A0,5	A0,5							
Ve 22/2		LH3								A0,5								
Sa 23/2		IAIU			FSH6+6					A0,5		DPS	DPS	DPS	DPS			
Di 24/2					FSH5+5				A1	A0,5								
Lu 25/2					FSH3+3			E-A0,5	E	E-A0,5	E-A0,5	E-A1	E-A0,5	E-A0,5	E-A1			
Ma 26/2					RE-FSH2+2-LH0,06+0,09					A0,5								
Me 27/2					B10+10		LH3			A0,5								
Je 28/2					IAIU			A0,5	A0,5	A0,5	A0,5							
Ve 1/3		Collecte																
Sa 2/3																		
Di 3/3																		
Lu 4/3																		
Ma 5/3																		
Me 6/3																		
Je 7/3																		
Ve 8/3																		
Sa 9/3																		
Di 10/3																		
Lu 11/3																		
Ma 12/3																		
Me 13/3																		
Je 14/3																		
Ve 15/3																		
Sa 16/3																		
Di 17/3																		
Lu 18/3																		
Ma 19/3																		
Me 20/3																		
Je 21/3																		
Ve 22/3																		
Sa 23/3																		
Di 24/3																		
Lu 25/3																		
Ma 26/3																		
Me 27/3																		Collecte

Tableau 6 : Planning des essais de la première expérience.

At = 1 injection d'Antarelix tous les jours pendant 11 jours; A3/4 = 3/4 injections d'Antarelix réparties sur 11 jours; A0,5/1=0,5/1 mg d'Antarelix ; B=Busereline ; DPS=début des prises de sang ; E=éponge de progestagènes ; FSHx=x unités Armour d'Antarelix ; IAIU=insémination artificielle intra-utérine ; LHx=x mg de LH ; RE=retrait de l'éponge

3. Plan expérimental

3.1. 1^{ère} expérience

Le tableau 6 illustre le planning de l'expérience. Les 18 brebis sont réparties en 5 groupes (2 groupes de 3 et 3 groupes de 4 pour la facilité des manipulations) en fonction de la date à laquelle débute le traitement.

Le traitement débute avec le blocage des cycles (et donc de l'ovulation) pendant 15 jours grâce à la pose d'éponges de progestagènes (60mg de MAP). Les éponges sont remplacées par des neuves après 7 jours.

Les sécrétions de LH et de FSH sont bloquées par l'administration d'Antarelix. Les brebis reçoivent cette substance sur un laps de temps qui débute le même jour que la pose des éponges et qui se termine 4 jours avant le retrait de celles-ci (car l'Antarelix est connu pour avoir des effets pendant 4 jours à la dose de 0,5mg). Cet antagoniste est administré selon 3 formes différentes :

- 0,5mg du jour 1 au jour 11
- 4 doses de 0,5mg réparties sur les 11 jours
- 1 dose de 1mg et 2 doses de 0,5mg réparties sur le même laps de temps

La croissance folliculaire terminale est stimulée par l'administration de FSH selon un mode identique pour tous les groupes de brebis.

L'ovulation est déclenchée par stimulation ovarienne au jour 17, soit directement par injection de 3mg de LH 32 heures après le retrait de l'éponge, soit indirectement par injection de 2 doses de 10pg de Busereline 32 et 36 heures après le retrait.

L'insémination est réalisée au jour 18 environ 2 heures avant l'ovulation attendue. Six jours plus tard, les embryons sont collectés et transférés directement chez les receveuses ou congelés.

Lors de cette 1^{ère} expérience, les prises de sang sont réalisées tous les matins sur les brebis en cours de traitement.

Le traitement du 1^{er} groupe débute le 4 février avec les prises de sang.

Les trois brebis du dernier groupe doivent normalement recevoir de la Busereline, mais, vu l'absence d'embryons chez les brebis du groupe 3 qui ont reçu de la Busereline, cette dernière est remplacée par de la LH dans le groupe 5.

Pour l'ensemble des brebis, les traitements à comparer sont donc au nombre de 6 (puisque les injections de FSH sont les mêmes dans tous les groupes):

- A11-LH
- A4-LH
- A3-LH
- A11-Buse
- A4-Buse
- A3-Buse

Tableau 7 : Planning de la 2^{ème} expérience

Série	1		2		
Traitement	A3-LH	A0-LH	A3-Buse	A0-Buse	
N° SANITEL	7254 5305	7109 7145	4010 5341	7253 4033	
Date					
29.04	E + A1	E	E + A1	E	PS
30.04					
01.05					
02.05					
03.05					PS
04.05					
05.05	E + A1	E	E + A1	E	
06.05					PS
07.05					
08.05					
09.05					
10.05	A0,5		A0,5		PS
11.05					
12.05	FSH 6 + 6				
13.05	FSH 5 + 5				
14.05	FSH 3 + 3				
15.05	RE FSH 2 + 2 LH0,06 (8h) + 0,09 (20h)				PS avant et 30 min après injection
16.05	LH3 (16h)		Buse10 (16h) + 10 (20h)		PS ttes les heures de 15h à 5h
17.05					
18.05					
19.05					
20.05					
21.05	Taux d'ovulation				

A3=3 injections d'Antarelix réparties sur 12 jours ; A0=aucune injection d'Antarelix ; A1/0,5=1/0,5mg d'Antarelix ; E=éponge de progestagènes ; RE=retrait de l'éponge ; PS=prise de sang ; Buse=Busereline.

3.2. 2nde expérience

Le tableau 7 représente le planning de la seconde expérience au cours de laquelle 8 brebis ont reçu un traitement de superovulation. Cette expérience est calquée sur la 1^{ère} sinon que 2 traitements à l'Antarelix sont programmés : un basé sur 3 injections identique à celui de la 1^{ère} expérience, tandis que l'autre moitié des brebis ne reçoivent pas d'Antarelix. Ces deux traitements vont permettre d'évaluer l'effet de l'Antarelix.

La principale différence concerne la programmation des prises de sang. Elles seront effectuées à des moments précis afin de pouvoir suivre plus précisément l'évolution des taux hormonaux plasmatiques et d'apporter des renseignements complémentaires suite aux résultats obtenus lors de la 1^{ère} expérience.

Au cours de cette expérience, les taux d'ovulation sont mesurés mais les brebis ne subissent pas d'insémination.



Figure18 : *Insémination artificielle par endoscopie*

4. Insémination

4.1. Collecte du sperme

Le sperme est obtenu par la technique du vagin artificiel à partir de béliers appartenant au Centre d'Insémination et de Sélection Ovines (CISO, agrégation CIAO BEL 01) situé à Faulx-Les-Tombes. Le bélier Texel choisi est Cyrano Van Smeyersmark (tatouage : 2002/0/0102). Il est placé en présence d'une brebis et, au moment du saut, le sperme est récupéré dans le vagin artificiel. Le sperme est analysé (motilité massale, concentration) et dilué dans un milieu spécial (DBB⁺) pour atteindre une concentration de 400.10^6 spermatozoïdes/ml; il est conservé à une température de 30°C pendant les quelques minutes qui précèdent les inséminations.

4.2. Insémination intra-utérine

L'insémination intra-utérine est réalisée le jour 17 du traitement. Au moment de l'insémination artificielle, une paillette fine de 0,25ml est remplie de sperme par aspiration. La paillette est placée dans le pistolet d'insémination et le contenu d'une demi paillette est injecté dans chacune des cornes utérines, soit 100 millions de spermatozoïdes par brebis.

Les brebis sont positionnées en décubitus dorsal sur une table d'endoscopie. La paroi abdominale est tondue et désinfectée à l'aide d'Hibitane et d'Iso-Bétadine. Deux injections sous-cutanées et intra-musculaires de 1ml de Lignocaïne sont réalisées à 5cm de part et d'autre de la ligne blanche en avant de la glande mammaire afin de provoquer une anesthésie locale à l'endroit où est prévue la pose de l'endoscope et du palpeur. L'arrière-train de la brebis est alors surélevé par rapport à la tête, ce qui a pour effet de tasser les viscères contre le diaphragme et de faciliter grandement l'observation du tractus génital. Les instruments sont introduits par perforation au trocar et de l'air sec et stérile est insufflé afin de soulever la paroi abdominale et le péritoine et de visualiser plus facilement les ovaires et les cornes utérines.

Grâce à un endoscope (Fig.18), il est possible de visualiser rapidement le tractus reproducteur. Avant l'insémination, les ovaires sont délicatement dégagés du ligament sous lequel ils sont généralement cachés et mis en évidence pour une estimation de la réponse folliculaire au traitement superovulatoire.

On repère les cornes utérines et, à l'aide d'une aiguille adaptée, on injecte 50.10^6 spermatozoïdes dans chaque corne utérine. Étant donné l'endroit où est réalisé le dépôt, cette technique permet d'inséminer avec de plus petites quantités de spermatozoïdes (*Hunter R.H.F., Greve T., 1997*).

Les instruments sont délicatement extraits de l'abdomen et plongés dans une solution désinfectante tandis que les incisions sont recouvertes d'aluminium en spray afin de protéger la plaie et refermées par une agrafe. Une injection intra-musculaire de Novalgine est enfin réalisée sur chaque brebis en guise de prévention d'une réaction inflammatoire excessive (et d'une douleur post-opératoire) et une injection d'antibiotiques (Duphaphen) l'accompagne.

5. Collecte et conditionnement des embryons

5.1. Collecte chirurgicale

La collecte des embryons est réalisée le jour 23 du traitement, ce qui correspond au 6^{ième} jour suivant l'insémination. Les embryons doivent donc se trouver au stade blastocyste.

La brebis est placée en décubitus dorsal sur la table d'endoscopie après avoir subi une sédation avec 1ml de Rompun IV. La paroi abdominale est tondue, désinfectée et recouverte d'un champ. La table est inclinée de manière à ce que la tête de la brebis soit plus basse que l'arrière-train.

Avant tout, les ovaires sont observés et on dénombre les corps jaunes présents. Bien sûr, si l'on ne détecte aucun corps jaune, la collecte n'a pas lieu.

On incise l'abdomen pour permettre l'externalisation du tractus reproducteur. Le corps utérin est pincé par la main de l'opérateur et une aiguille à multiples ouvertures est insérée à l'extrémité de la corne près de l'oviducte. Elle est reliée par un fin tuyau au tube de récolte tandis que 20ml de PBS conservé à 39°C sont injectés à la base de la corne et récupérés à l'autre extrémité dans un tube stérile également maintenu à 39°C.

Une fois le lavage de chaque corne réalisé, 5ml de pénicilline sont introduits dans la cavité abdominale. L'incision est suturée et de l'aluminium en spray est vaporisé. Une injection de 5ml de Novalgine est encore réalisée afin de prévenir une éventuelle inflammation.

5.2. Vitrification des embryons

Le PBS contenant les embryons est versé dans une boîte de Pétri. Le fond de celle-ci a été strié de manière à faciliter les recherches sous binoculaire. En effet, les observations sont réalisées en suivant les stries de manière à balayer tout le fond de la boîte. Plusieurs passages sont nécessaires afin de détecter le maximum d'embryons.

Les embryons sont aspirés à l'aide d'une unopette, petit capillaire inséré au bout d'une seringue de 1ml.

Les embryons sont placés dans de l'OCM qui est un milieu nutritif permettant de conserver les embryons durant le laps de temps précédant leur vitrification. L'OCM est soit en préparation pharmaceutique, soit préparé en laboratoire. Dans ce cas, il est constitué de 40 ml de PBS et de 10ml de sérum de veau fœtal. Le tout est filtré sur 0,22µm.

Une fois les embryons récoltés, ils sont tout d'abord placés dans un premier bain durant 5 minutes. Ce milieu est constitué d'OCM et de glycérol 10 %.

Ils sont alors récupérés et placés pendant 5 minutes dans un deuxième bain d'OCM contenant du glycérol 10 % et de l'éthylène glycol 20 %.

Ensuite, et pour une durée maximale de 30 secondes, les embryons baignent dans une solution d'OCM contenant du glycérol 25 % et de l'éthylène glycol 25 %. L'osmolarité importante de la solution 3 protège les embryons de la formation de cristaux d'eau mais présente une certaine toxicité. Un laps de temps de 30 secondes est considéré comme un maximum entre l'introduction de l'embryon et l'immersion de la paillette dans l'azote liquide.

Enfin, les embryons seront placés dans une paillette de conservation numérotée remplie de la façon suivante : bouchon d'usine – galactose - bulle d'air- OCM+glycérol 25%+éthylène glycol 25%-bulle d'air – embryons - bulle d'air – galactose - poudre d'alcool polyvinylique.

Une fois remplie, cette paillette est directement plongée dans l'azote liquide pour sa conservation. Les paillettes sont conservées dans une cuve contenant de l'azote liquide à -196°C . Seuls 2 embryons collectés dans le dernier groupe ne subissent pas ce traitement puisqu'ils sont transférés en frais.

6. Synchronisation des receveuses

Les brebis receveuses sont des croisées Laitier-Suffolk de l'élevage du CRO de Faulx-Les-Tombes. Les caractéristiques de ces brebis sont données dans le tableau 8. Elles ont été choisies pour leur bonne fécondité naturelle, leur aptitude laitière et leur phénotype fort différent des Texel.

Tableau 8 : Caractéristiques des brebis receveuses de l'élevage du CRO.

N° de brebis	N° SANITEL	Date de naissance	Date du dernier agnelage
21	4006	10.04.97	06.02.01
22	2032	18.02.96	15.03.00
23	4005	13.01.97	04.03.01
24	4567	15.01.97	02.03.01
25	0179	09.04.97	23.04.01
26	2243	26.01.94	30.03.00
27	2098	26.01.94	28.03.00
28	0114	27.01.95	26.01.01
29	0103	30.01.96	07.02.01
30	2231	20.01.96	11.02.01

Ces brebis doivent être synchronisées afin de se trouver au jour 7 du cycle au moment du transfert. Cela signifie qu'elles seront synchrones avec les donneuses lors de transferts d'embryons frais et synchrones avec l'étape de développement de l'embryon lors d'un transfert d'embryons congelés. Pour cela, des éponges de progestagènes sont posées 22 jours avant le transfert ; leur retrait, 13 jours plus tard, est accompagné d'une injection de PMSG (500UI).

Lors du transfert des embryons programmé le 1^{er} mars, suite à un problème technique, seuls deux embryons ont pu être transférés. Nous avons donc prévu une série de transferts d'embryons congelés pour les neuf receveuses restantes. Cette fois, la dose de PMSG a été augmentée à 750UI car, lors du premier transfert, nous avons constaté que certaines brebis n'avaient pas suffisamment répondu au traitement et ne présentaient pas de corps jaune.

Tableau 9 : Origine et état des embryons. Corne de transfert.

N° de brebis	Origine des embryons (n° de la brebis donneuse)	Etat des embryons	Corne de transfert
21	18	Frais	Gauche
22	18	Congelés	Gauche
23	13	Congelés	Gauche
24	18	Congelés	Droite
25	1	Congelés	Gauche
26	4	Congelés	Gauche
27	6	Congelés	Droite
28	13	Congelés	Droite
29	4	Congelés	Gauche
30	14	Congelés	Gauche

7. Transfert des embryons

Il était prévu de transférer 10 embryons frais (2 par receveuse) et 10 vitrifiés-décongelés. Cependant, suite à un problème technique, seuls 2 embryons frais ont pu être transférés chez une receveuse tandis que les autres transferts, reportés ultérieurement, ont été réalisés avec des embryons décongelés.

7.1. Décongélation

Avant d'être transférés, les embryons doivent être décongelés. Le seul produit nécessaire à cette opération est l'OCM.

La paillette choisie est sortie de la cuve d'azote liquide à l'aide d'une pince. Cette paillette est laissée 5 secondes à l'air à température ambiante, puis est placée 15 secondes dans l'eau à 22°C. Durant ces 15 secondes, la paillette est agitée. On peut alors couper le bouchon de poudre d'alcool polyvinylique et l'on vide le contenu de la paillette dans une boîte de Pétri que l'on agite immédiatement afin de mélanger intimement les différentes portions de la paillette. La boîte est laissée durant 5 minutes à température ambiante. Les embryons sont ensuite repris avec un peu de milieu à l'aide de l'unopette et le tout est déposé dans une seconde boîte de Pétri dans laquelle sont placés 2ml d'OCM. La solution est de nouveau laissée pendant 5 minutes à température ambiante. Les embryons sont aspirés une nouvelle fois avec de l'OCM à l'aide de la seringue. La seringue est placée dans un tube, lui-même se trouvant dans un tube plus gros contenant de l'eau à 39°C. Le tout est emmené dans la salle de transfert afin que l'opération puisse avoir lieu.

7.2. Transfert chirurgical

Le tableau 9 présente les caractéristiques du transfert.

Il s'agit d'un transfert semi-chirurgical. La brebis receveuse synchronisée, et donc se trouvant au jour 7 du cycle, est placée sur la table d'endoscopie. La paroi abdominale est tondue, désinfectée, et deux anesthésies locales sont effectuées. Deux incisions sont réalisées à 10cm du pis : une sur la ligne blanche et l'autre à 10cm. L'endoscope est inséré par la seconde incision et de l'air est insufflé dans l'abdomen. Le tractus génital est observé et on repère l'ovaire portant un ou plusieurs corps jaunes. Au niveau de la première incision (de la taille de la lame du bistouri), on introduit une fine pince atraumatique pour saisir le bout de la corne utérine ipsilatérale au corps jaune. Cette extrémité de la corne est extériorisée sur 2 à 3cm et un petit trou y est pratiqué avec une aiguille de seringue. Les embryons contenus dans le capillaire de l'unopette sont injectés par ce petit trou. Le bout de la corne est alors libéré et retrouve sa place dans la cavité abdominale. Le matériel d'endoscopie est enlevé, les petites incisions refermées à l'aide d'une agrafe et pulvérisées d'aluminium. Afin de prévenir une éventuelle infection, on injecte 5ml de pénicilline à la brebis qui peut alors être relâchée.

8. Diagnostic de gestation

Les diagnostics de gestation sont destinés à confirmer ou infirmer l'état de gestation des brebis receveuses. Au départ, il était prévu que le diagnostic soit réalisé par échographie. Cependant, vu la période tardive à laquelle la seconde série de transferts a eu lieu, un diagnostic par dosage des PAG (pregnancy associated glycoproteins) qui est un diagnostic plus précoce a été réalisé. L'échographie a permis de confirmer les résultats obtenus.

8.1. Dosage des PAG

Il est possible de déterminer si une brebis est gravide en dosant les taux sanguins de PAG. Cette analyse est intéressante car elle peut être réalisée dès le 15^{ième} jour de la gestation.

Des prises de sang ont donc été réalisées sur les 9 brebis receveuses le 14 mai (soit 20 jours après le transfert) et les échantillons ont été envoyés au Laboratoire de Physiologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire à l'ULg pour y être analysés.

8.2. Echographie

Ce diagnostic a finalement été réalisé le 29 mai pour confirmer les résultats du dosage de PAG. L'échographie permet un diagnostic à partir de 35^{ième} jour. Il s'agit d'un processus au cours duquel une sonde émettrice et réceptrice est placée sur la paroi abdominale de la brebis. La sonde est reliée à un ordinateur qui analyse l'écart entre les ultrasons émis et leurs échos réfléchis et l'intensité de ceux-ci. Ces paramètres donnent une idée de profondeur et de densité des tissus permettant de créer une image sur laquelle il est possible d'observer des fœtus mesurant 1cm.

9. Dosages hormonaux

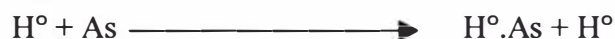
Les dosages sont réalisés afin d'observer l'évolution de l'oestradiol, de la FSH et de la LH plasmatiques tout au long du traitement superovulatoire. De cette façon, il est possible d'évaluer les effets de l'Antarelix sur ces hormones et de comparer les résultats obtenus pour les brebis traitées avec de la LH et les résultats de celles traitées avec de la Busereline.

9.1. Prises de sang

Les prises de sang sont réalisées chaque matin sur les brebis en cours de traitement au niveau de la veine jugulaire rendue turgescente à l'aide d'un garrot placé à la base du cou. Le sang est recueilli dans des tubes où ont été placées quelques gouttes d'héparine afin d'éviter la coagulation. Ces tubes sont alors centrifugés afin de pouvoir récolter le plasma qui est conservé à -20°C .

9.2. Dosages

Le RIA (radio immuno assay) est une technique permettant de doser des hormones dans les fluides corporels dont le sérum (Crowe M.A. et al, 1997). Il s'agit d'une technique basée sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone marquée par la fixation d'un ou plusieurs atomes radioactifs et une quantité inconnue de la même hormone, non marquée, présente dans l'échantillon à analyser vis-à-vis d'un antisérum qui leur est spécifique. L'hormone froide peut se lier avec l'antisérum spécifique et la réaction finale peut s'écrire de la manière suivante :



H° : Hormone froide

As : Antisérum

On ajoute alors l'hormone marquée et la relation obtenue est la suivante :



H^* : Hormone marquée

D'après cette relation, on conclut que l'hormone se trouve sous 2 formes :

- Une liée à l'anticorps ($\text{H}^{\circ}.\text{As}$ et $\text{H}^*.\text{As}$)
- L'autre libre (H° et H^*)

Pour une même quantité d'anticorps et d'hormone marquée introduite au départ, on obtient d'autant plus de complexes $\text{H}^*.\text{As}$ qu'il y a moins d'hormone froide dans le milieu. De même, la quantité liée à l'anticorps est d'autant plus faible que la teneur en H° de l'échantillon est plus élevée.

Dans les expériences réalisées lors de ce mémoire, la séparation des phases liée et libre est réalisée par la méthode du double anticorps. Il s'agit d'une méthode consistant à précipiter le complexe hormone - anticorps par fixation sur des antigamma-globulines de lapin (ARGG) produites par un mouton. La comparaison avec une gamme étalon établie avec l'hormone de référence permet de déterminer la concentration en hormone du plasma.

Tableau 10 : Liste des produits utilisés pour les dosages et leur référence

Acétate éthyle	Vel 1355
Cyclohexane	Acros organics 176810025
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	Merck 6346
Na ₂ HPO ₄	Merck 6586
NaCl	Vel 1723
NaOH	Merck 6498
Gélatine	Vel 1381
Ethanol absolu	VEL 1115
Anti 17 β oestradiol	Anti 17 β oestradiol Marloie lot : 170497
E _{17β} tritié	Amersham TRK-587
Polyéthylène glycol	Vel 8727
Ecosint	LS-273
KH ₂ PO ₄	Ucb 1627
ARGG	ARGG Marloie
Cellulose	Merck 2331
AsFSH	NIAmDD.NIH, AFPC 288113
FSH pour marquage	NIAmDD-oFSH-I-1 (AFP-4117A)
FSH pour standards	NIAmDD-oFSH-RP-1 (AFP-5679C)
AsLH	NIADDK-anti oLH (AFP-192279)
LH	NIADDK-oLH-I-3 (AFP-9598 B)

Cette technique est appliquée aux plasmas ainsi qu'à une série de solutions d'hormone de concentrations connues destinées à l'établissement d'une courbe de standardisation.

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^o et H^*) pour leur fixation sur un antisérum spécifique :

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

A : radioactivité mesurée de la phase liée

A_0 : 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

La liste des produits utilisés pour les dosages hormonaux est présentée dans le tableau 10.

Tableau 11 : Solutions utilisées pour la compétition-incubation du dosage de l'E₂ :

Tampon Phosphate 0,1 M	13,7gr de Na H ₂ PO ₄ .H ₂ O 14,2gr de Na ₂ HPO ₄ anhydre 90gr de NaCl Dissoudre et porter à 1 litre	
Tampon Phosphate 0,01 M	100ml de tampon phosphate 0,1 M Porter à 1 litre Ajuster le pH à 7,25 avec du NaOH	
Tampon Phosphate gélatiné (TPG)	1 litre de tampon phosphate 0,01 M 1gr de gélatine diluée au préalable dans du tampon chauffé à 60°C	
ARGG	5ml d'ARGG 100ml de tampon phosphate gélatiné 6gr de polyéthylène glycol	
AsE _{17β}	1 flacon d'anticorps lyophilisés 100ml d'eau distillée	
E _{17β} tritié	Solution stock	50μl d'E _{17β} tritié 4,950μl d'éthanol absolu
	Solution à +/- 12000 Cpm/100μl	100μl de solution stock 10 à 15 ml de tampon phosphate 0,01 M non gélatiné Vérifier au compteur

Tableau 12 : Solutions pour les standards

Solution stock à 10μg/ml (10000ng/ml)	210μg de E _{17β} 21ml d'éthanol absolu Aliquoter en tubes de 1ml et conserver à -20°C
Solution à 1000ng/ml	500μl de solution stock 4500μl d'éthanol absolu Aliquoter en tubes de 1ml et conserver à -20°C
Solution à 10ng/ml (1000pg/ml)	100μl de solution à 1000ng/ml 9900μl de tampon gélatiné
Solution à 1 ng/ml (1000pg/ml)	- 1ml de solution à 10ng/ml 9ml de tampon gélatiné

9.3. Protocole pour le dosage de l'E₂

Les solutions préparées en laboratoire pour le dosage de l'oestradiol sont données dans les tableaux 11 et 12.

9.3.1. Extraction

Le dosage de l'E₂ nécessite une extraction préalable du stéroïde. Celle-ci est réalisée grâce à un mélange 50/50 d'acétate d'éthyl et de cyclohexane.

200µl de plasma sont additionnés de 2ml du mélange d'extraction, vortexés pendant 2 minutes puis placés au congélateur. Une fois le plasma congelé, le milieu d'extraction surnageant est transvasé dans un nouveau tube de verre. Cette opération est réalisée 2 fois. Les tubes sont placés dans une étuve sous vide (40°C) jusqu'à évaporation totale.

9.3.2. Compétition –incubation

L'extrait sec est dissous dans 200 µl de tampon phosphate 0,01M gélatiné.

Dans un nouveau tube en polypropylène, 100µl de cette solution sont mis en présence de 50µl d'antisérum (Anti-17β estradiol, Laboratoire d'Hormonologie de Marloie, lot 170497) et de 100µl d'hormone tritiée (+/- 12 000 cpm) ([2,4,6,7,16,17 H³]_{17β} oestradiol, 5,55 TBq/m mole, Amersham TRK 587). Les références de l'E₂ sont : SIGMA E-8875. L'équilibre s'établit pendant 4 heures à 37°C.

La séparation phase libre - phase liée s'effectue par addition de 500µl d'ARGG 1/20 en solution tampon contenant 6 % de PEG 6000. La réaction a lieu à 4°C durant la nuit, après quoi les tubes sont centrifugés, le surnageant éliminé à la trompe à vide et le culot (phase liée) suspendu dans 100µl d'éthanol absolu et additionné de 2,5ml de liquide scintillant.

Les tubes sont ensuite analysés dans un compteur de scintillations Beckman LS 6000 SC.

La sensibilité du dosage est de $0,56 \cdot 10^{-3}$ ng/ml. Les coefficients de variation intra- et inter-test sont respectivement de 8 et 11 %. Quelques valeurs de spécificité du test :

- 17 α oestradiol : 0,47 %
- Cholestérol : < 0,07 %
- Testostérone : < 0,07 %
- Progestérone : < 0,07 %

Tableau 13 : Solutions préparées en laboratoire pour le dosage de la FSH

Tampon phosphate 0,6M	7,5g de KH ₂ PO ₄ (PM=136,09) 77,9g de Na ₂ HPO ₄ (PM=141,96) 1l d'eau distillée
Tampon Wide 0,06M	Diluer 10 fois le tampon phosphate 0,6M Ajuster le pH à 7,55
Tampon BSA 0,5 %	1l de tampon Wide 5g de BSA
ARGG	5ml d'ARGG 100ml de tampon BSA 6g de PEG 0,5g de cellulose

Tableau 14 : Préparation de l'AsFSH

AsFSH	1ml dilué au huitième dans 2 % de NRS-PBS Dilution finale conseillée : 1/80 000
Solution stock	1ml d'AsFSH 49ml de tampon Wide Mélanger Répartir en 25 fois 2ml Dater Conserver au congélateur
Solution de travail	2ml de solution stock 48ml de tampon BSA

9.4. Protocole pour le dosage de la FSH

Les produits préparés en laboratoire pour le dosage de la FSH sont présentés dans les tableaux 13, 14, 15 et 16.

Ce dosage est réalisé sans extraction et en présence de FSH purifiée marquée à l'I¹²⁵. Cette dernière est préparée au laboratoire par marquage de 4 µg de oFSH à l'I¹²⁵ par la technique d'oxydation à la chloramine T.

Les manipulations du RIA sont les suivantes. Un échantillon de 50µl de plasma est additionné de 50µl d'anticorps spécifique (AFPC 288113). Après 2 à 4 heures d'incubation, 50µl d'hormone marquée (20 000 cpm) y sont mélangés par vortex et l'équilibre s'établit pendant la nuit. Le second anticorps (ARGG) en solution tampon avec PEG (6 %) et cellulose (0,5 %) est ajouté à raison de 250 µl. Après 2 à 4 heures, les tubes sont centrifugés, le surnageant éliminé à la trompe à vide, le culot resuspendu dans du tampon phosphate et recentrifugé. Après élimination du surnageant, le culot est analysé dans un compteur LKB Wallar 1277 GammaMaster à passeur d'échantillon.

Une courbe standard allant de 0 à 50ng/ml est réalisée à l'aide d'oFSH (réf: NIAMDD-oFSH-RP-1, AFP 5679 C).

Les références de la FSH pour le marquage sont les suivantes : NIAMDD-oFSH-RP-1 (AFP5679C)

La sensibilité du dosage est de 0,08ng/ml, ses coefficients de variation intra et inter-essais respectivement de 5,5 % et de 10,5 %. Les valeurs de spécificité du test sont : oLH : 0,17 %, oGH : 0,03 %, oPRL : < 0,01 %.

9.5. Protocole pour le dosage de la LH

Les solutions préparées en laboratoire pour ce dosage sont données dans les tableaux 17, 18, 19 et 20.

Le dosage de la LH est réalisé de façon identique à celui de la FSH avec 50µl d'anticorps spécifique de la LH (NIDDK-oLH-1, AFP-192279).

Les références de la LH sont les suivantes : NIDDK-oLH-I-2 (AFP 7071B).

Les caractéristiques du dosage sont les suivantes :

- Sensibilité : 0,07ng/ml
- Coefficient de variation intra-test : 7,5 %
- Coefficient de variation inter-test : 10,5 %
- Spécificité : bTSH : 0,15 % ; oFSH : 5,4 % ; oGH : 0,57 % ; oPRL : < 0,01 %.

Tableau 15 : Préparation de la FSH pour le marquage (uniquement)

Solution stock à 0,1 µg/µl	72µg de FSH à marquer 720µl de Wide Conserver au congélateur
Marquage de FSH	Mettre 25 µl de Wide dans de l'iode centrifugée 40µl de solution stock (soit 4µg) 20µl de chloramide T (40µg/10ml) Laisser agir 30 secondes 25µl de Na ₂ S ₂ O ₅ Mélanger à la pipette prélever la totalité du volume et l'ajouter à la colonne Attendre qu'il soit entièrement absorbé par le séphadex Ajouter du Wide pour la chromatographie Recueillir les fractions de 1 ml Vérifier l'activité au compteur Pooler les 2 ou 3 tubes correspondant au maximum d'activité du premier pic
Solution de travail	Diluer la solution marquée de telle sorte qu'elle corresponde à 20 000 cpm par 50µl

Tableau 16 : Préparation de la FSH pour les standards (uniquement)

Solution stock à 500ng/100µl	5µg de FSH 1000µl de tampon BSA Mélanger Répartir en 10 tubes de 100µl Mettre au congélateur
Solution à 50ng/ml	100µl de solution stock 9 900µl de tampon BSA Mélanger

Tableau 17 : Préparation de l'AsLH

AsLH	Dilution 1/100
Solution stock	1 ml de solution 1/100 49ml de tampon BSA Répartir en 25 fois 2ml Dater Conserver au congélateur
Solution de travail	2ml de solution stock 73ml de tampon BSA

Tableau 18 : Préparation de la solution stock de LH

Solution stock à 250mg/ml	500mg de oLH 2ml de tampon Wide et mélanger Répartir en 8×250µl Dater Conserver au congélateur
---------------------------	--

Tableau 19 : Marquage de la LH

Solution pour marquage	Solution stock répartie en 10×25µl et conservée au congélateur
Marquage de LH	20µl de solution pour marquage (5µg) 25µl de Wide 20µl de chloramine T (40mg/10ml) Laisser agir 30 secondes 25µl de Na ₂ S ₂ O ₅ Mélanger à la pipette Prélever tout le volume et l'ajouter à la colonne Attendre absorption complète par le Séphadex Ajouter du Wide Recueillir des fractions de 1 ml Vérifier l'activité des fractions au compteur Pooler les 2-3 tubes correspondant au maximum d'activité du 1 ^{er} pic
Solution de travail	Diluer la solution marquée pour atteindre 20 000 Cpm/50µl

Tableau 20 : Préparation de la LH pour les standards

Solution à 10 000ng de LH/ml	250µl de solution stock 6,250ml de tampon BSA Mélanger Répartir en 6×1 ml Dater Conserver au congélateur
Solution à 200ng de LH/ml	1 ml de solution à 10 000ng/ml 49ml de tampon BSA Mélanger Répartir en tubes de 3ml Dater Conserver au congélateur

Troisième partie :

**Résultats et
discussion**

Tableau 21 : Résultats obtenus lors de la première expérience.

Brebis	1 ^{er} traitement	Follicules	Corps jaunes	Embryons
1 (7145)	A11-LH	G : +++ D : +++	G : 9 D : 7	3
7 (7170)	A11-LH	G : +++ D : +++	G : 8 D : 10	2
13 (4010)	A11-LH	G : ++ D : +++	G : 3 D : 5	4
16 (7252)	A11-LH	G : +++ D : +++	G : 0 D : 0	0
2 (7165)	A4-LH	G : 0 D : 0	G : 0 D : 0	0
8 (7253)	A4-LH	G : +++ D : +++	G : 5 D : 6	3
14 (?)	A4-LH	G : ++ D : +++	G : 10 D : 4	5
17 (7255)	A4-LH	G : ++ D : ++	G : adhérences D : 4	1
3 (5305)	A3-LH	G : +++ D : +++	G : 13 D : 15	5
9 (4033)	A3-LH	G : + D : +++	G : 2 D : 5	1
15 (7109)	A3-LH	G : ++ D : ++	G : 4 D : 7	4
18 (5299)	A3-LH	G : +++ D : +++	G : 7 D : 15	7
4 (7254)	A11-Buse	G : +++ D : +++	G : 5 D : 4	4
10 (5228)	A11-Buse	G : +++ D : +	G : 3 D : 2	0
5 (7118)	A4-Buse	G : +++ D : +++	G : 1 D : 3	0
11 (5349)	A4-Buse	G : ++ D : +	G : 0 D : 0	0
6 (5341)	A3-Buse	G : +++ D : +++	G : 5 D : 5	2
12 (4044)	A3-Buse	G : +++ D : +++	G : 2 D : 5	0

1. Première expérience

Le tableau 21 ci-contre reprend les réponses ovariennes observées suite au traitement de superovulation.

1.1. Taux d'ovulation

1.1.1. Présence de follicules

Le jour de l'insémination, les follicules n'ont pas été dénombrés avec précision pour éviter de contrecarrer la fécondation par une manipulation excessive des ovaires en période ovulatoire, mais l'état des ovaires a été estimé en recevant un grade allant de 0 à +++.

La plupart des brebis présentent des ovaires couverts de follicules en croissance ou en cours d'ovulation qui sont cotés +++.

La brebis 7165 n'a pas réagi au traitement de superovulation. Cette brebis est parasitée par *Haemonchus contortus* qui entraîne des lésions au niveau de la caillette et une hémolyse intense. Cette pathologie est également caractérisée par une anémie avec pâleur des muqueuses, un arrêt de la prise alimentaire, un œdème sous-glossien et une accélération des mouvements respiratoires et cardiaques (*Brugère-Picoux, 1994*). L'hémolyse est confirmée par la coloration jaune des plasmas récoltés. Dans ces conditions, il n'est pas anormal que la physiologie ovarienne soit perturbée. Or, les follicules ovariens sécrètent l'oestradiol qui exerce un feed-back négatif au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse: le GnRH diminue, ce qui entraîne une diminution des concentrations en LH et FSH. Si ce rétrocontrôle est perturbé, il est normal que les valeurs observées soient très élevées.

La brebis 4033 qui a reçu 3 injections d'Antarelix et de la LH présente peu de follicules au niveau d'un ovaire. Il en est de même pour les brebis 5228 et 5349 qui ont reçu de la Busereline.

1.1.2. Présence de corps jaunes

Lors de la collecte des embryons, le 23^{ème} jour, les corps jaunes ont été dénombrés chez chaque brebis.

La brebis 7165 ne présente aucun corps jaune, ce qui est à mettre en relation avec l'état des ovaires au moment de l'I.A.. Les brebis 5349 et 7252 ne montrent pas de taux d'ovulation alors qu'elles avaient des follicules sur les ovaires au moment de l'I.A.. La première avait reçu un traitement A4-Buse et la seconde A11-LH.

Une comparaison des traitements utilisant la LH ou la Busereline comme inducteur de l'ovulation (tableau 22) montre une différence significative entre les deux traitements

Tableau 22 : Taux d'ovulation obtenus en fonction des différents traitements.

Traitement	LH	Busereline
Moyennes des TO	11,6	5,8
Moyennes sans les 0	13,9	7,0

Il est paru intéressant de refaire l'analyse en omettant les brebis qui n'ont pas ovulé car celles-ci présentaient des symptômes pathologiques (Haemonchus : on suspecte les brebis 5349 et 7252 d'être parasitées également) qui risquent de biaiser l'effet des traitements. Dans ce cas, la différence est toujours significative ($P < 0,1$) en faveur du traitement LH qui induit à peu près deux fois plus d'ovulations que la Busereline.

Les différences en fonction du nombre d'injections d'Antarelix ont été mises en évidence en utilisant des tests de t. La comparaison ne met en évidence aucune différence significative entre les traitements sauf lors de la comparaison entre A4 et A3 .

1.2. Nombre d'embryons

Le tableau 21 rapporte le nombre d'embryons collectés par brebis.

La collecte n'a pas été réalisée chez les brebis 7165, 5349 et 7252 car elles ne présentaient aucun corps jaune.

Les brebis 7118, 5228, et 4044 qui ont toutes reçu de la Busereline n'ont donné aucun embryon lors de la collecte.

Le nombre d'embryons récoltés chez les autres brebis varie de 1 à 7. Cette valeur maximale a été obtenue pour la brebis 5299 qui présentait un grand nombre de corps jaunes.

Sur les 18 brebis traitées, 41 embryons ont pu être collectés, soit une moyenne de 2,3 embryons par brebis.

Si l'on ne tient pas compte des brebis qui n'ont pas ovulé, la moyenne de collecte d'embryons est de 2,7.

En moyenne, le taux de récupération (nombre d'embryons collectés/nombre d'ovulations) est de 0,24 .

La comparaison entre les taux de récupération suite au traitement LH ou Busereline montre un avantage pour les brebis LH(on récupère 35 embryons pour un TO de 139, c'est-à-dire 27% de récupération) par rapport aux brebis Busereline (on récupère 6 embryons pour un TO de 35, ce qui correspond à 13% de récupération). D'autre part, seules des brebis traitées à la Busereline n'ont pas permis de récolter des embryons alors qu'elles avaient ovulé.

1.3. Résultats des transferts

1.3.1. Qualité des embryons

Avant d'entamer la série de transferts d'embryons, il est essentiel d'estimer la qualité des embryons et de tester la méthode de décongélation.

Une paillette contenant 3 embryons a subi les différentes étapes de la décongélation et de la réhydratation au CISO de Faulx-Les-Tombes. Ces embryons, une fois placés dans un bain d'OCM, ont rapidement été ramenés au laboratoire d'histologie afin de pouvoir les observer.

Leur manipulation est assez délicate. Le montage au DPX a rendu un premier embryon complètement invisible du fait, probablement, des indices de réfringence du milieu et de l'embryon trop proches.

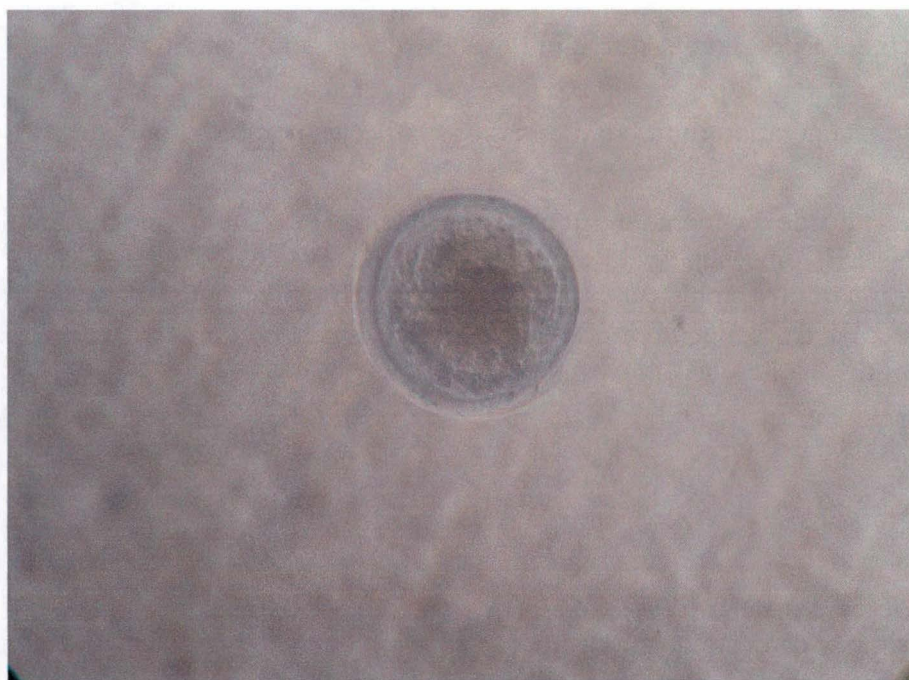


Figure 19 : Embryons récoltés lors du dégel de la paillette 8. Ces photos ont été réalisées au département d'Histologie - Embryologie des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur.

- 1. Zone pellucide déchirée et vide*
- 2. Embryon normal*

Le montage aqueux s'est avéré meilleur. Une rapide coloration au bleu Trypan facilite le repérage par coloration de la zone pellucide principalement.

Coloré de cette façon, un des embryons montrait une structure assez homogène et des cellules qui paraissaient régulières, signe d'une division de bonne qualité. Les embryons colorés au bleu Trypan sont présentés à la figure 19.

L'autre embryon n'a pas supporté les manipulations et sa zone pellucide a été retrouvée ouverte et vide.

Une seconde manipulation histologique a eu lieu quelques jours plus tard pour illustrer un stand du « Printemps des Sciences ». La blastula de l'embryon décongelé était régulière avec un bouton embryonnaire bien apparent.

Le nombre de paillettes congelées ne permettait pas d'approfondir ces essais, mais ces quelques manipulations ont montré que les embryons paraissaient de bonne qualité .

1.3.2. Transferts d'embryons

Le tableau 23 présente les numéros des brebis donneuses à partir desquelles les embryons ont été collectés et les receveuses chez qui ils seront transférés.

Tableau 23: Numéros des brebis donneuses et des brebis receveuses correspondantes.

Brebis donneuses	Brebis receveuses
18	22
13	23
18	24
1	25
4	26
6	27
13	28
3	29
?	30

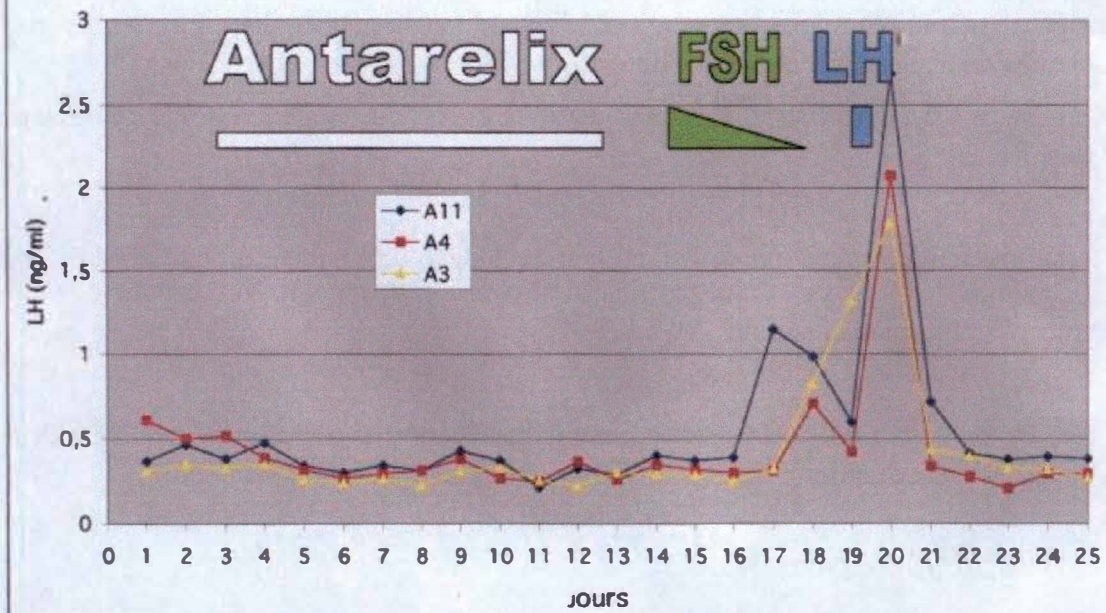
Une seule brebis a pu recevoir 2 embryons « en frais », il s'agit de la brebis 21 chez qui le transfert a été réalisé le 27 mars.

Les transferts d'embryons congelés ont eu lieu 1 mois plus tard. Les 9 brebis receveuses présentaient chacune plusieurs corps jaunes et ont toutes pu recevoir 2 embryons.

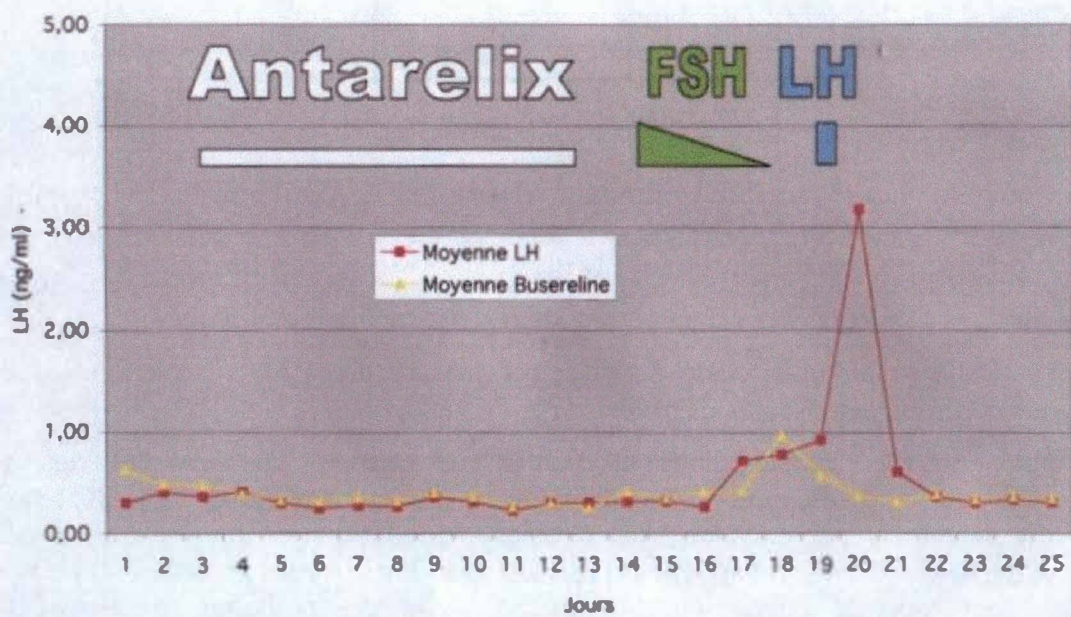
Le diagnostic de gestation effectué à l'ULg par mesure des PAG plasmatiques était négatif ; il a été confirmé deux semaines plus tard par l'échographie.

Les manipulations de décongélation ont montré que certains types de paillettes ne convenaient pas pour la vitrification. Le refroidissement extrêmement rapide et la dilatation du liquide ont fendu les paillettes utilisées classiquement (paillettes fines en cristal de polystyrène) pour la congélation du sperme et des embryons alors que les paillettes souples en polypropylène ont supporté l'opération. L'intérêt d'utiliser des paillettes souples a été démontré.

Comparaison des traitements Antarelix



Comparaison LH-Busereline



1.4. Evolution des hormones dans le sang

Les graphes en annexe présentent l'évolution des concentrations plasmatiques en LH, FSH et E₂ au cours du traitement superovulatoire.

Pour rappel, la première injection d'Antarelix a été effectuée juste après la prise de sang du 3^{ème} jour chez toutes les brebis et la dernière après la prise de sang du 13^{ème} jour. Entre ces 2 injections, le groupe A11 a reçu 9 injections de 0,5mg (1/jour), le groupe A4 en a reçu 2 de 0,5mg (jour 6 et jour 10) et le groupe A3 a reçu 1 seule injection de 1mg le jour 9.

La FSH a été administrée en doses décroissantes du jour 15 au jour 18. La LH ou la Busereline a été injectée le soir du jour 19 pour mimer ou induire la décharge ovulatoire après qu'une faible dose de LH (0,06 et 0,09mg) ait été additionnée aux injections de FSH du dernier jour pour stimuler la stéroïdogenèse et préparer la maturation des follicules.

1.4.1. Dosage de LH (voir graphes ci-contre)

Les profils de l'évolution de la concentration plasmatique de la LH au cours des 15 premiers jours sont réguliers dans les 3 groupes de 6 brebis et proches de 5ng/ml.

Seule la brebis 7165 maintient à plusieurs reprises des taux élevés. Cette brebis est celle qui ne présente pas de follicule ovarien. La prise de sang aurait été réalisée au moment d'une décharge pulsatile, ce qui, en conditions normales, est peu probable car ces pics n'apparaissent en cours de phase lutéale (c'est le cas puisque les brebis portent une éponge de progestagènes) qu'à une fréquence de 1 toutes les 4 à 8 heures et que la LH a une demi-vie de 21 minutes. Cette brebis ne réagit donc pas à l'Antarelix et ses teneurs élevées pourraient être le reflet d'une absence d'un feed-back par les stéroïdes ovariens. La moyenne des teneurs hormonales a été réalisée en éliminant cet animal atypique.

A la fin de la période d'injection de FSH, une augmentation des teneurs en LH se manifeste. Celle-ci est importante chez certains animaux au jour 20. Ensuite, les taux de LH plasmatiques retournent au niveau de base.

1.4.1.1. Analyse des jours 0 à 15 : effet de l'Antarelix

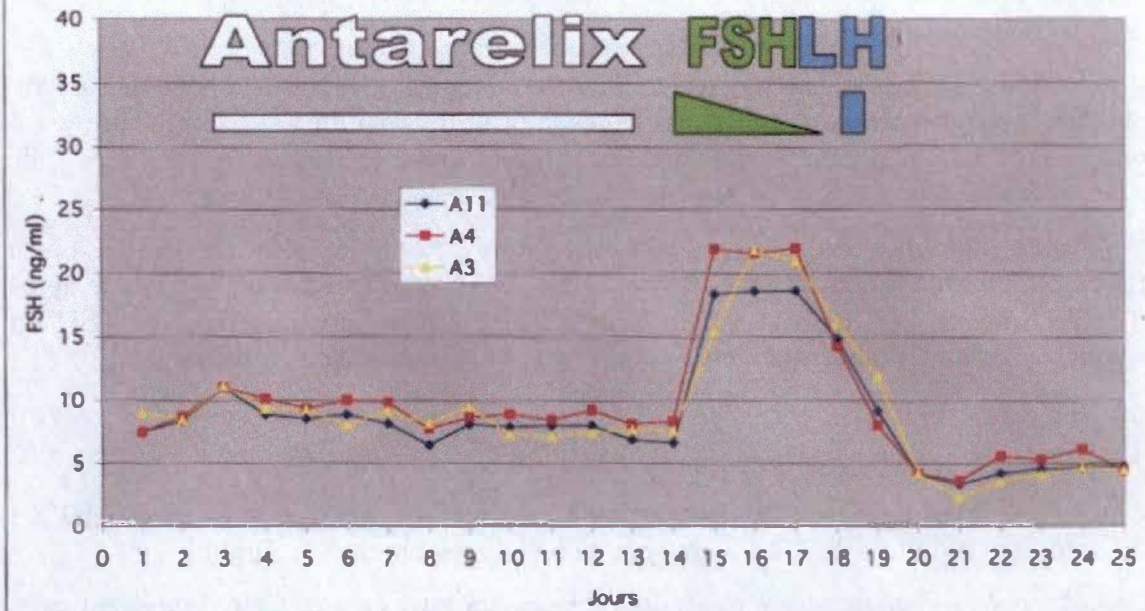
Pendant la période qui précède la stimulation ovarienne, le taux de LH reste toujours proche de 5ng/ml chez toutes les brebis.

L'effet de l'Antarelix a été analysé par régression des valeurs entre le jour 3 (la prise de sang a été réalisée juste avant l'injection d'Antarelix) et le jour 13 (qui correspond à la dernière injection). Les valeurs sont présentées dans le tableau 24.

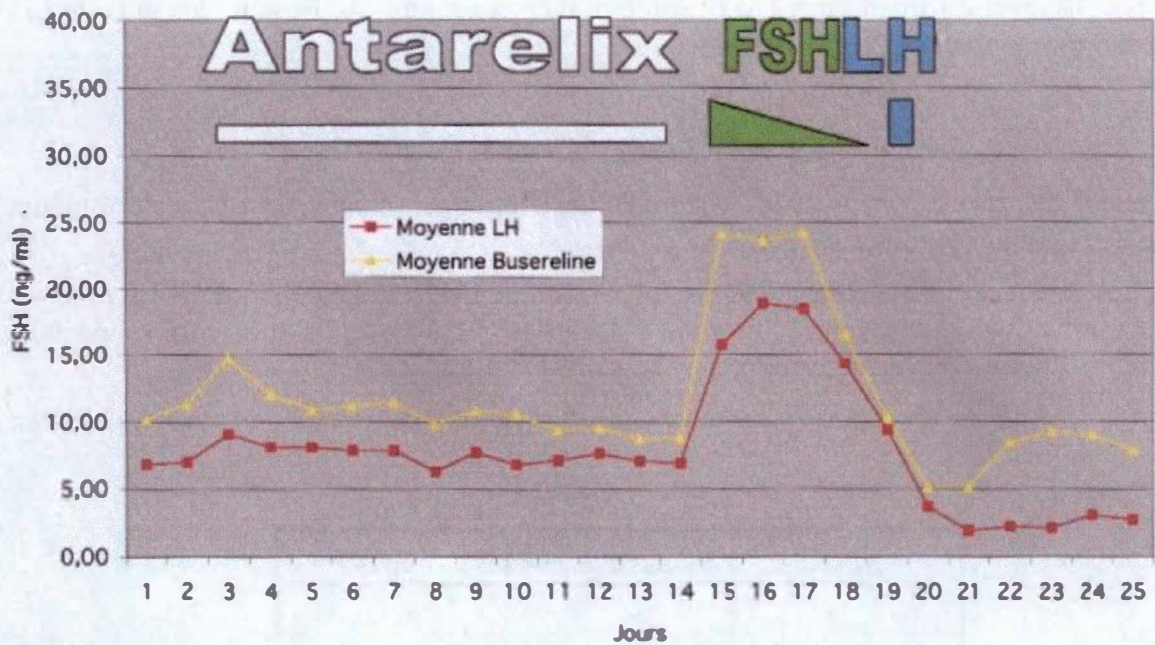
Tableau 24 : Valeurs d'origine et pentes des droites de régression calculées sur les valeurs du jour 3 au jour 13.

	Valeurs d'origine	Pentes
A11	6,5	-0,12
A4	6,5	-0,16
A3	5,1	-0,05

Comparaison des traitements Antarelix



Comparaison LH - Busereline



La valeur d'origine de la droite de régression est environ 6,5 pour les traitements comportant 11 ou 4 injections d'Antarelix tandis qu'elle est égale à 5,1 pour celui qui en comporte 3.

1.4.1.2. Analyse des jours 15 à 25 : effets des traitements FSH-LH/Busereline

Au jour 18, la concentration de LH suit une augmentation parfois assez importante selon les individus.

Au jour 20, certaines brebis présentent un pic de LH tandis que d'autres pas. Le graphe qui illustre l'évolution de la LH plasmatique pour les brebis ayant reçu de la LH ou de la Busereline met en évidence la présence d'un pic pour le traitement LH et l'absence de ce pic pour le traitement Busereline. Ce phénomène a été confirmé par les tests statistiques qui révèlent une différence significative entre les deux types de traitements en faveur de la LH.

Ces résultats sont difficilement interprétables sur la base d'une seule prise de sang quotidienne et sont le reflet d'une cinétique de modification des taux hormonaux. Ils ont suscité la planification d'une seconde expérience avec un suivi plus rapproché de la période pré-ovulatoire.

1.4.2. Dosage de la FSH (voir graphes ci-contre)

Dans les trois cas, les profils des moyennes sont très semblables et oscillent entre 5 et 10 ng/ml.

Les brebis qui présentaient des concentrations plasmatiques en FSH élevées avant le 3^{ème} jour voient ces valeurs revenir à des taux de base lors de l'administration de la 1^{ère} dose d'Antarelix.

La brebis 7165 ne réagit pas à l'Antarelix : le taux plasmatique de FSH chez cette brebis reste élevé durant toute l'expérience. Cette évolution est tout à fait aberrante car les valeurs sont beaucoup trop importantes et restent largement supérieures à celles observées normalement au cours du cycle. Comme lors du dosage précédent, une moyenne a été réalisée en omettant les résultats obtenus pour cette brebis.

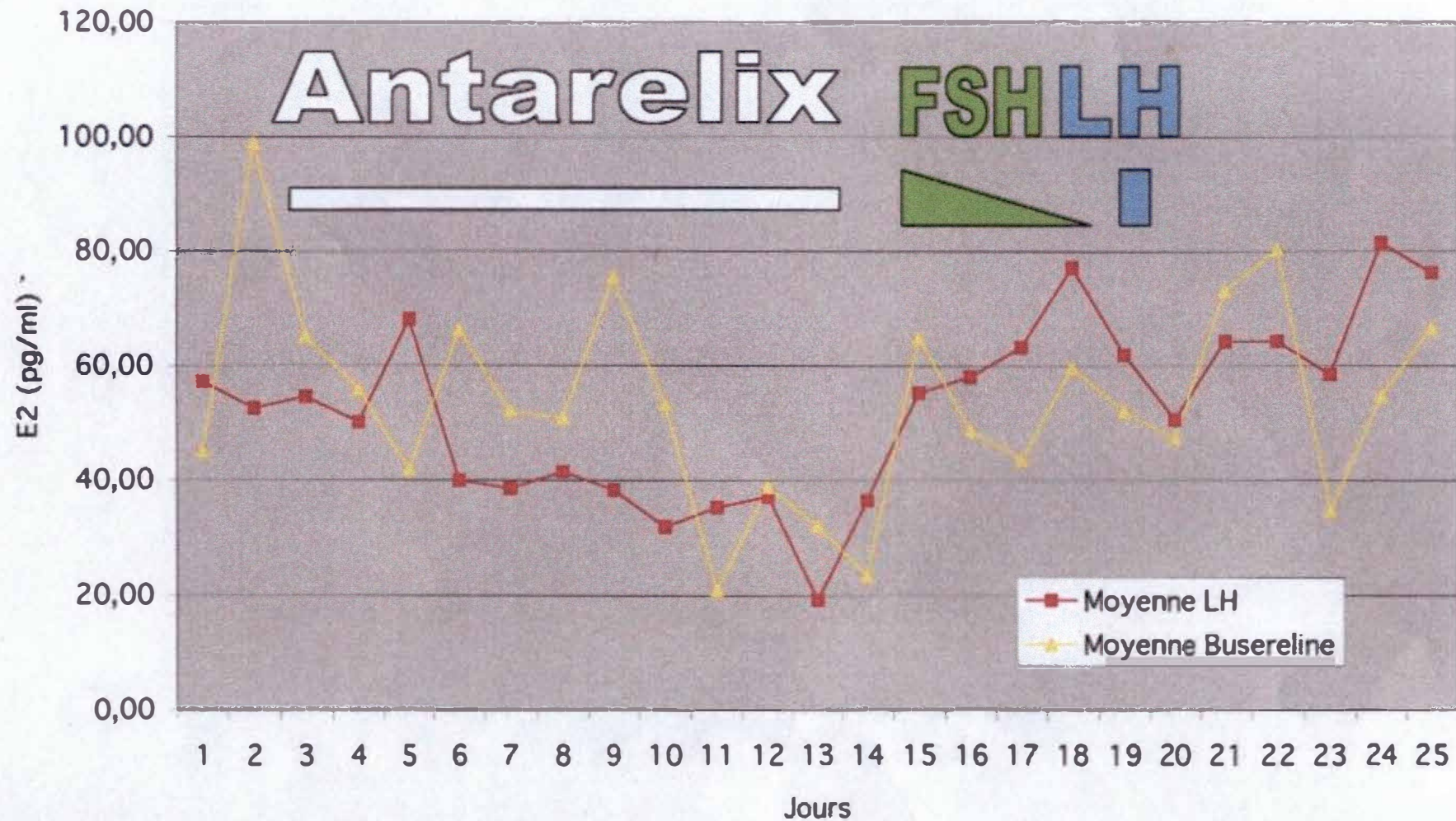
La brebis 4044 présente également un profil qui suit des valeurs élevées mais elle semble réagir au traitement de blocage hypophysaire car, le 3^{ème} jour, lors de l'administration d'Antarelix, ses valeurs sont fortement diminuées.

Lors de l'injection de FSH exogène (jour 15-jour 18), les taux de FSH atteignent chez toutes les brebis des taux 3 à 4 fois plus élevés que le taux de base précédent, restent élevés durant 3 jours et redescendent vers des valeurs basales.

1.4.2.1. Analyse des jours 0 à 15 : effet de l'Antarelix

Les valeurs restent proches de 10ng jusqu'au 15^{ème} jour où le taux plasmatique de FSH augmente.

Comparaison LH-Busereline



1.4.2.2. Analyse des jours 15 à 25 : effets des traitements FSH-LH/Busereline

Les valeurs atteintes sont proches de 20ng/ml. Dans le cas de A11 comme dans celui de A4, les valeurs se stabilisent et suivent un plateau durant 3 jours. Chez les animaux qui ont reçu 3 injections, l'augmentation est plus lente, mais les valeurs atteintes sont identiques.

La comparaison des effets de la LH ou de la Busereline sur l'évolution de la FSH pendant la période préovulatoire met en évidence une évolution assez semblable au cours du temps dans les 2 cas.

Le 21^{ème} jour, on observe que les taux plasmatiques de FSH de la brebis 7165 redescendent et rejoignent des valeurs normales.

1.4.3. Dosage de l'oestradiol (voir graphe ci-contre)

A nouveau, une moyenne a été réalisée sans tenir compte des résultats de la brebis 7165.

Cette fois, le profil suivi par la moyenne dans les traitements A11 et A4 est plus ou moins semblable tandis que la moyenne de l'évolution des taux d'oestradiol chez les brebis qui ont reçu 3 injections d'Antarelix est différente. Pour ce traitement, la moyenne reste stable à environ 50ng/ml.

Pour A11 et A4, les profils individuels montrent en général une légère diminution au cours des 13 premiers jours avant de rejoindre des valeurs plus élevées.

Pour A3, des pics surviennent souvent mais sans suivre une quelconque diminution durant la première partie du traitement ni une augmentation plus tard.

1.4.3.1. Analyse des jours 0 à 15 : effet de l'Antarelix

Les taux plasmatiques d'oestradiol sont très variables et sont, théoriquement, le reflet de la croissance des follicules antraux à la surface de l'ovaire.

Les variations se maintiennent chez toutes les brebis et la croissance folliculaire ne paraît pas inhibée par le traitement Antarelix quel qu'il soit. Néanmoins, une analyse de la régression des valeurs moyennes en oestradiol du jour 3 au jour 13 montre une diminution significative dans les 2 groupes recevant le plus grand nombre d'injections d'Antarelix (11 et 4)

1.4.3.2. Analyse des jours 15 à 25 : effets des traitements FSH-LH/Busereline

Dès la 1^{ère} injection de FSH, la tendance suivie par la concentration plasmatique en oestradiol s'inverse et on assiste dans les groupes A11 et A4 à une augmentation des taux qui atteignent des valeurs à peu près doubles de ce qu'elles étaient à la fin du traitement à l'Antarelix.

Ce profil n'est pas observé dans le groupe A3.

1.5. Discussion partielle de la première expérience

Le but premier de l'expérience étant de rendre le traitement de superovulation optimal afin d'améliorer le transfert d'embryons, il est important d'analyser les résultats en fonction de l'efficacité de nos traitements.

Pour 18 brebis ayant reçu un traitement d'ovulation, le total des T.O. est de 174, ce qui correspond à un T.O. moyen de 9,7. Si les brebis 2 (parasitée), 5349 et 7252 (supposées parasitées) ne sont pas prises en compte, le T.O. moyen est de 11,6.

Selon Bari et al (2001), le T.O. moyen varie entre 8 et 14 pour des brebis superovulées. Dans les deux cas (si tous les résultats sont pris en compte ou non), les résultats obtenus se trouvent dans l'intervalle cité par les auteurs.

La valeur moyenne d'embryons récupérés est 2,7. Or, selon Bari 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.

L'étude des profils hormonaux montre qu'avant les injections d'hormones exogènes, les taux mesurés sont normaux. Le tableau 25 représente les valeurs physiologiques pour chaque hormone et celles observées au cours de l'expérience.

Tableau 25 : Valeurs physiologiques et expérimentales de la LH, la FSH et l'oestradiol

	Valeurs physiologiques (Bister et al, 1999).	Valeurs expérimentales (moyenne)
LH	Base entre 2 et 5ng/ml Pic de 50 à 150ng/ml	Base : +/- 5ng/ml Pic : 37ng/ml 13ng/ml
FSH	Vagues entre 2 et 10ng/ml	Vagues de 7 à 15ng/ml Pic : 18ng/ml 23ng/ml
Oestradiol	Vagues de 10 à 100pg/ml	Vagues de 20 à 100pg/ml

Avant les injections d'hormones exogènes, c'est-à-dire du jour 1 au jour 15, les taux hormonaux sont identiques à ceux observés sans traitement de blocage hypophysaire (voir graphes en annexe), dès lors, l'effet de l'Antarelix n'est pas démontré.

L'Antarelix provoque normalement une diminution du taux d'hormones gonadotropes jusque des niveaux proches de zéro, et cela dans les 4 heures. Sur les graphes, seule une légère diminution progressive est visible lors de cette première partie du traitement.

Dès lors, on peut penser que l'Antarelix n'a eu aucun effet sur les taux d'hormones gonadotropes. Les diminutions progressives seraient seulement induites par l'action des éponges de progestagènes utilisées lors du blocage hypophysaire.

L'évolution du taux d'oestradiol suit des vagues telles que celles observées lors du cycle normal. Au cours du cycle, la sécrétion de cette hormone dépend de la taille des follicules. L'Antarelix doit normalement réduire le taux d'hormones gonadotropes à un niveau de base afin d'empêcher la croissance et la maturation folliculaire. Le taux d'oestradiol devrait rester bas durant les 15 premiers jours. Comme ce n'est pas le cas, l'absence d'effet de l'Antarelix sur les hormones gonadotropes est confirmée.

Lors de l'ajout de FSH, l'augmentation de FSH est importante. Ces résultats sont obtenus bien que la FSH injectée soit de la FSH porcine et notre antisérum produit contre la FSH ovine, ce qui risquait d'entraîner une non-reconnaissance ou une diminution des valeurs estimées par le RIA

Une augmentation de LH survient également pour toutes les brebis à la fin de l'administration de FSH exogène. La FSH va agir sur les follicules qui vont sécréter de l'oestradiol. Le taux plasmatique de cette hormone augmente, ce qui induit un feed-back positif sur l'hypothalamus. Il en résulte une décharge de LH endogène.

Il se produit également une augmentation d'oestradiol, excepté chez les brebis 7255 et 5349. Le T.O. de ces brebis était respectivement de 4 et 0 ; une corrélation entre le taux d'ovulation et le taux d'oestrogènes pourrait exister. Un test de corrélation a été réalisé afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse. Au jour 17, il existe une corrélation entre le T.O. et le taux plasmatique d'oestradiol ($F=1,56$ pour une valeur critique de $F=0,23$). Cette corrélation est encore plus importante si l'on omet la brebis 5305 dont le T.O. est de 28 ($F=9,48$ pour une valeur critique de $F=0,008$).

Lors de l'injection de LH exogène, un pic de LH est observé. Si de la Busereline remplace la LH, ce pic est absent. Cependant, le pic de LH que l'on devrait observer suite à l'injection de Busereline s'étend sur environ 5 heures. Il est donc possible que la prise de sang ait été effectuée en dehors de ce pic de LH qui aurait réellement existé. Suite à ces résultats, une seconde expérience a été planifiée afin de suivre les évolutions de LH et de FSH lorsque les brebis reçoivent de la LH ou de la Busereline lors de la période pré-ovulatoire. La corrélation entre le TO et la quantité de LH plasmatique est très significative. Les brebis dont la concentration plasmatique en LH est faible présentent un faible taux d'ovulation.

Le taux de FSH ne subit pas de variation lors de l'injection de LH (ce qui est normal). Par contre la Busereline devrait induire un pic de FSH et, à nouveau, ce pic est absent. Après l'injection de LH, les valeurs de FSH restent plus basses qu'au départ tandis qu'après l'injection de Busereline, les valeurs de FSH rejoignent les taux du début de l'expérience. Il n'existe aucune corrélation entre le TO et la FSH plasmatique.

En ce qui concerne l'oestradiol, les taux qui avaient augmenté lors de l'injection de FSH restent élevés durant les 5 derniers jours pour les deux types de traitement.

2. Seconde expérience

Pour rappel, cette seconde expérience a été mise sur pied afin de comparer les effets de la LH et de la Busereline administrées lors de traitements superovulatoires.

Quatre des 8 brebis n'ont pas reçu d'Antarelix tandis que les 4 autres brebis en ont reçu 3 injections : 1 injection de 1 mg juste après la pose de l'éponge et la prise de sang, 1 injection de 1mg lors du changement de l'éponge et 2 jours après la seconde prise de sang, et 1 injection de 0,5mg 2 jours avant la 1^{ère} injection de FSH et juste après la 4^{ème} prise de sang.

La FSH a été administrée en doses décroissantes du jour 14 au jour 17. La LH ou la Busereline a été injectée le soir du jour 18 pour mimer ou induire la décharge ovulatoire après qu'une faible dose de LH (0,06 et 0,09mg) ait été additionnée aux injections de FSH du dernier jour pour stimuler la stéroïdogénèse et préparer la maturation des follicules.

Le jour 18, des prises de sang sont effectuées une demi-heure avant et une demi-heure après chaque injection de LH. Le jour 19, les prises de sang sont réalisées toutes les heures à partir de 15 heures et ce, jusque 5 heures du matin.

2.1. Taux d'ovulation

Le tableau 26 présente les résultats de cette expérience.

Tableau 26 : Résultats obtenus lors de la seconde expérience.

Brebis	Traitement	Corps jaunes
1	A0-LH	3
8	A0-Buse	8
9	A0-Buse	11
15	A0-LH	4
3	A3-LH	5
4	A3-LH	6
6	A3-Buse	7
13	A3-Buse	8

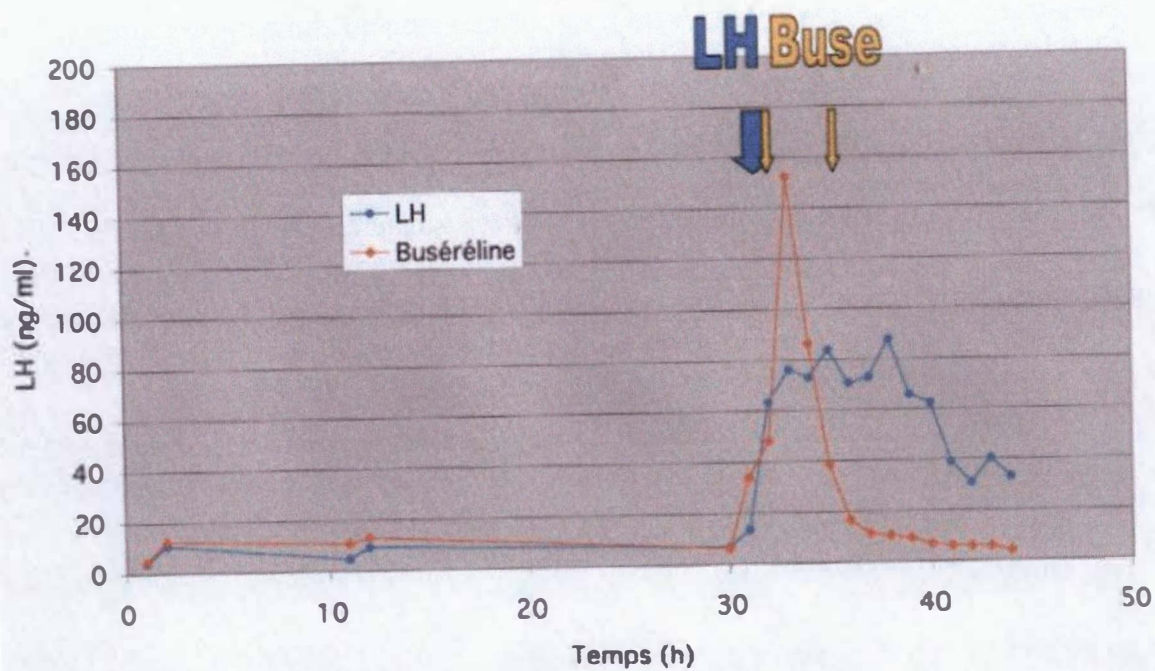
Lors de cette expérience, toutes les brebis présentent des corps jaunes.

Le nombre moyen de corps jaunes obtenus dans le cas des traitements à la Busereline est de 8,5. Il est égal à 4,5 pour les traitements comportant de la LH.

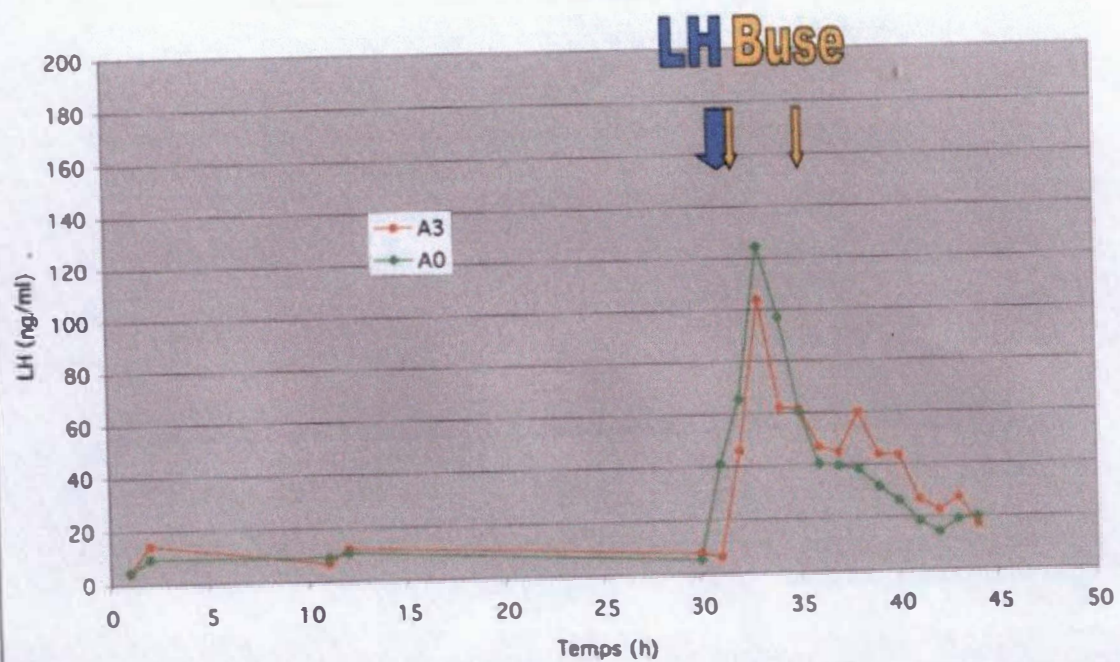
Si l'on compare les moyennes des TO pour les différents schémas d'administration de l'Antarelix, la valeur est de 6,5 aussi bien pour A0 que pour A3.

Le TO1 moyen est de 9,7 tandis que le TO2 moyen est de 6,5. Une diminution du taux d'ovulation est donc observée entre les 2 essais.

Pic LH



Pic LH



2.2. Evolution des hormones dans le sang

Les graphes en annexe présentent l'évolution des concentrations plasmatiques en LH et FSH au cours du traitement superovulatoire.

2.2.1. Dosage de la LH (voir graphes ci-contre)

Les profils individuels de l'évolution de la concentration plasmatique en LH au cours des 30 premières heures est analogue pour toutes les brebis et oscille entre 5 et 15ng/ml.

Deux heures après la 1^{ère} injection, on voit apparaître un pic de LH chez les individus traités à la Busereline.

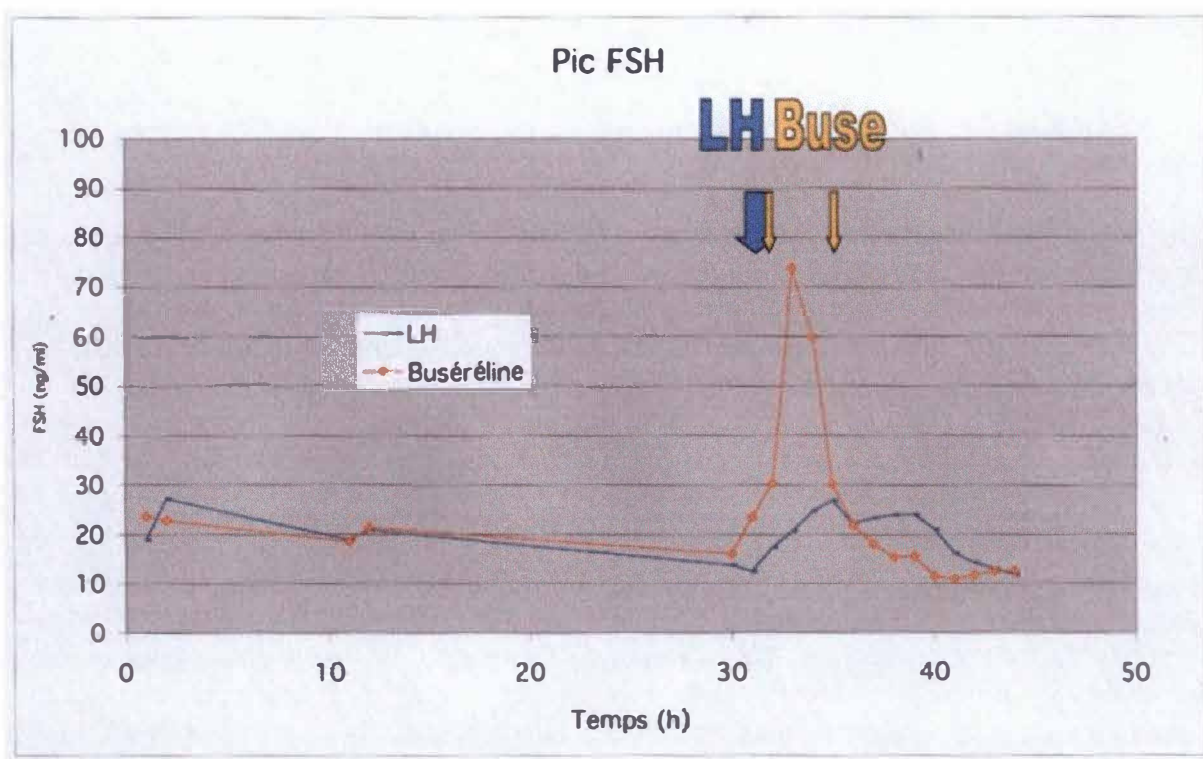
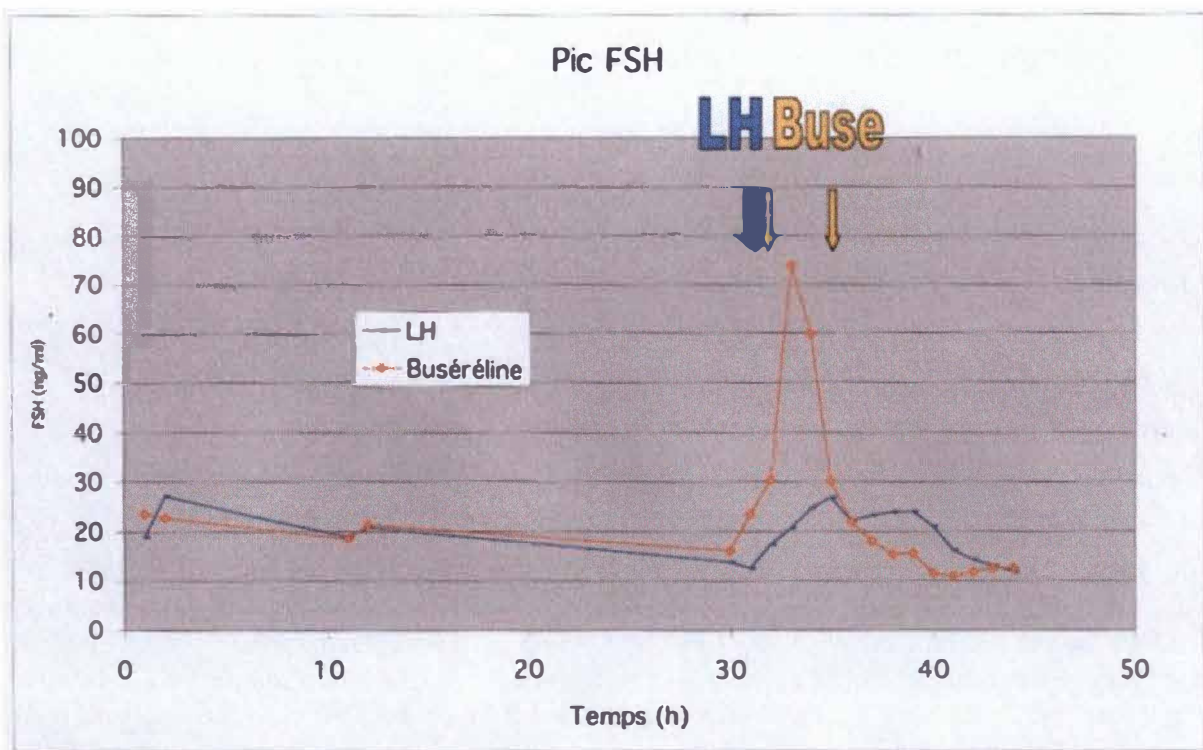
Le graphe qui compare les moyennes pour le traitement à la LH et pour celui à la Busereline montre que lors des 30 premières heures l'évolution est semblable dans les deux cas. Deux heures après l'injection de LH ou après la première injection de Busereline, la concentration plasmatique en LH augmente dans les deux cas. Cependant, le pic de LH atteint des niveaux plus élevés si les individus sont traités à la Busereline. La durée du pic est beaucoup moins importante dans le cas de la Busereline. Enfin, après le pic, la valeur de la concentration plasmatique en LH revient au même niveau que celui observé avant le pic. Ce n'est pas le cas pour la LH car, à la 43^{ème} heure, les valeurs sont toujours plus élevées que celles observées au départ.

Enfin, un 3^{ème} graphe illustre les moyennes des 4 traitements. Dans le cas d'un traitement à la LH, l'évolution est presque semblable que la brebis reçoive de l'Antarelix ou non. Pour le traitement comportant de la Busereline, le chemin suivi est identique mais le pic atteint des valeurs plus faibles dans le cas où la brebis a reçu de l'Antarelix.

2.2.2. Dosage de FSH (voir graphes au verso de cette feuille)

Les valeurs individuelles se situent entre 12 et 39ng/ml à la 1^{ère} heure et des valeurs se trouvant entre 5 et 27ng/ml à l'heure 30. Au cours de ces 30 premières heures, la concentration plasmatique en FSH diminue progressivement chez tous les individus excepté chez la brebis 4033 pour qui, après une diminution abrupte, la concentration hormonale réaugmente progressivement. Deux heures après la 1^{ère} injection de LH ou après l'injection de Busereline, la concentration plasmatique en FSH suit un pic chez les individus traités à la Busereline tandis que l'augmentation de la FSH chez les autres individus survient plus tard et atteint des valeurs moins importantes. Aucun pic n'apparaît chez la brebis 7145 traitée à la LH.

Le graphe qui compare les moyennes LH-Busereline présente une diminution progressive de la concentration plasmatique en FSH au cours des 30 premières heures dans les deux traitements. Deux heures après la 1^{ère} injection de Busereline, un pic apparaît pour ensuite redescendre au niveau de départ. Les brebis traitées à la LH montrent une légère augmentation de la concentration plasmatique de l'hormone deux heures après l'injection de la LH exogène, mais les valeurs maximales atteintes sont faibles et redescendent ensuite à des niveaux inférieurs à ce qui est observé auparavant.



Le dernier graphe compare l'évolution de la concentration plasmatique de la FSH pour chacun des 4 traitements. L'évolution est semblable dans tous les cas au cours des 30 premières heures. Ensuite, les individus qui ont reçu de la LH présentent des vagues de la concentration plasmatique en FSH tandis que ceux qui ont reçu de la Busereline montrent un pic de FSH. Le pic atteint des valeurs plus importantes pour les brebis dont le traitement ne comporte pas d'Antarelix.

2.3. Discussion partielle de la seconde expérience

Le but de cette seconde expérience était donc de mettre en évidence l'efficacité de l'Antarelix et de comparer les effets de la LH et de la Busereline.

Toutes les brebis présentent des corps jaunes. Selon Bari et al (2001), le TO moyen doit varier entre 8 et 14 chez des brebis superovulées. Le TO moyen pour les brebis traitées à la Busereline est de 8,5. Bien que compris dans l'intervalle défini par les auteurs, ce TO est néanmoins faible. Le TO moyen pour celles qui ont reçu de la LH est de 4,5, ce qui est nettement inférieur à ce qui devrait normalement être observé.

Les résultats obtenus lors de cette expérience sont donc en contradiction avec ceux de la 1^{ère} expérience : la LH donnait de meilleurs résultats alors qu'ici, la Busereline en donne de meilleurs. Cette constatation a été confirmée par la corrélation négative entre TO1 et TO2 : plus le TO1 est important, plus le TO2 est faible et inversement.

Cependant, il n'y a aucune différence dans les TO en fonction que l'on administre de l'Antarelix ou non. En effet les TO moyens sont les mêmes dans les 2 cas.

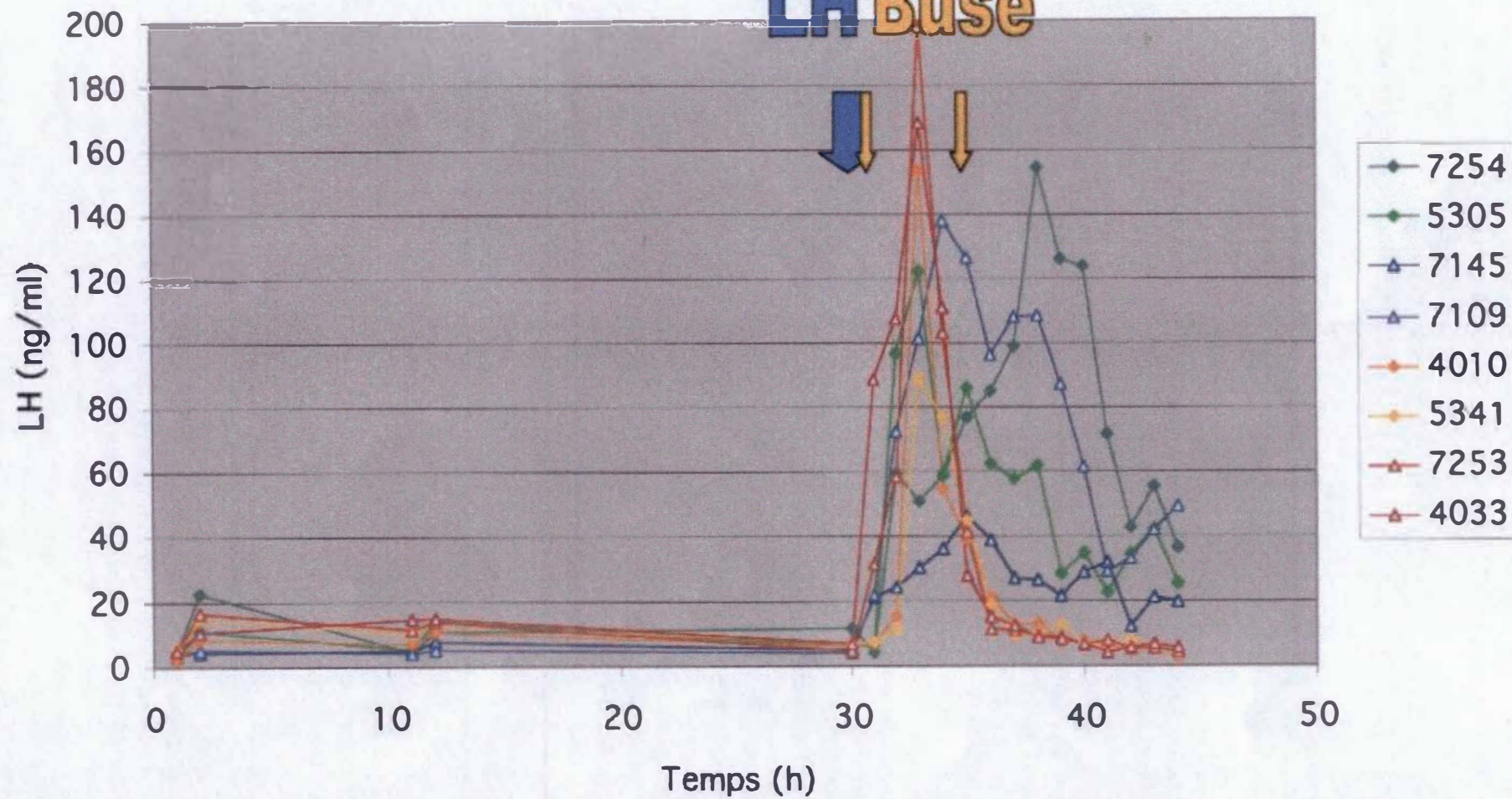
Le tableau 27 représente les valeurs physiologiques pour chaque hormone et celles observées au cours de l'expérience.

	Valeurs physiologiques	Valeurs expérimentales (moyennes)
LH	Base entre 2 et 5ng/ml	Base entre 5 et 15ng/ml
	Pic de 50 à 150ng/ml	Pic entre 60 et 182ng/ml
FSH	Vagues entre 2 et 10ng/ml	Vagues de 12 à 30ng/ml Valeurs maximales entre 55 et 92ng/ml

Les valeurs observées au cours des 30 premières heures ne sont pas inférieures à celles observées en conditions physiologiques, ce qui confirme l'absence partielle d'effet de l'Antarelix sur les concentrations hormonales plasmatiques.

Pic LH

LH Buse



Lors de l'ajout de la Busereline, l'augmentation de la concentration en hormones gonadotropes est au moins égal à ce qui se passe en conditions physiologiques. Cela confirme l'hypothèse du dosage hétérologue.

Cet ajout entraîne l'apparition d'un pic de LH et d'un pic de FSH. L'effet de la Busereline est donc manifeste dans cette expérience.

L'ajout de LH entraîne l'apparition d'un pic de LH qui est néanmoins inférieur à ce qui est observé en conditions physiologiques. Les vagues de FSH observées sont des vagues qui apparaissent lors d'un cycle normal.

Pour cette expérience, nous disposons de données précises concernant les teneurs plasmatiques en FSH et en LH ainsi que leurs évolutions dans le temps. Pour chaque brebis, et pour la FSH comme pour la LH, la durée, la hauteur maximale et la surface de la décharge pré-ovulatoire résultant soit de l'injection d'hormones, soit de son induction par la Busereline ont été mesurées (exemple : voir graphe ci-contre).

Une corrélation a été calculée entre ces différents paramètres et le taux d'ovulation (tableau 28).

Tableau 28 : Mise en corrélation du taux d'ovulation de la seconde expérience (TO2) avec divers paramètres (S=significatif ; NS=non significatif).

Corrélation du TO2 avec...	R ²	Signification
TO1	0,282	S
Hauteur pic LH	0,777	S
Durée pic LH	0,655	S
Surface pic LH	0,061	NS
Hauteur pic FSH	0,692	S
Durée pic FSH	0,094	NS
Surface pic FSH	0,751	S

Le taux d'ovulation de la seconde expérience n'est en corrélation ni avec la surface du pic de LH, ni avec la durée du pic de FSH.

La pente est négative pour la corrélation entre le TO2 et le TO1, ce qui implique que plus le TO est important lors de la 1^{ère} expérience, plus il sera faible lors de la 2^{nde} et inversement.

La pente est également négative en ce qui concerne la relation entre TO2 et la durée du pic de LH, donc, plus la durée du pic de LH est importante, plus le TO est faible et inversement.

Les autres corrélations montrent une pente positive

Quatrième partie :

Discussion, conclusions et perspectives

3. Discussion générale et conclusions

3.1. Test de la technique

La technique de superovulation fonctionne bien car le taux d'ovulation obtenu est acceptable (*Bari et al, 2001*). Il est cependant difficile d'expliquer la corrélation négative obtenue entre TO1 et TO2 car pourquoi une brebis dont le TO est faible lors du 1^{er} essai présenterait-elle un TO important lors du second ?

Les expériences ont mis en évidence l'absence d'effet de l'Antarelix sur le niveau des hormones gonadotropes. En effet, la diminution est progressive et les valeurs sont proches de celles observées en conditions physiologiques. De plus, la comparaison des traitements qui comportent de l'Antarelix et de ceux qui n'en comportent pas montre que le TO est le même dans les 2 cas. Le blocage hypophysaire est donc uniquement assuré par la pose d'éponges de progestagènes.

Cette absence d'effet de l'Antarelix 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*) et donc, en empêchant l'action de cette hormone. L'Antarelix ne se serait donc pas fixé sur les récepteurs à GnRH.

Donc, malgré l'absence d'effet de l'Antarelix, le traitement engendre l'apparition d'un grand nombre de corps jaunes à la surface des ovaires ; il est donc efficace.

Le nombre d'embryons récoltés est faible par rapport à d'autres études déjà menées (*Bari et al, 2001*). Le taux d'embryons récoltés est en corrélation positive avec le taux d'ovulation.

Il est possible que tous les ovocytes n'aient pas été fécondés mais cette hypothèse est peu probable car, généralement, l'insémination artificielle intra-utérine donne de bons résultats (*Baril et al, 1993*).

La technique utilisée est assez traumatisante mais il s'agit de la technique la plus efficiente ; il est donc assez difficile de mettre la technique en cause .

Il est également possible que des embryons n'aient pas été entraînés par le liquide de rinçage.

Ce faible taux de récupération peut simplement être engendré par l'absence d'embryons.

Notre inexpérience dans le domaine peut avoir occasionné la perte d'embryons au cours des manipulations.

Enfin, lors de la recherche sous binoculaire, il se peut que des embryons (sains, mal formés ou éclatés) n'aient pas été détectés.

Les transferts d'embryons n'ont engendré aucune gestation. Deux embryons apparemment en bon état ont pourtant été transférés chez chacune des brebis receveuses. Cependant, vu les problèmes techniques rencontrés, la plupart des embryons ont été transférés après congélation. Or, notre inexpérience dans le domaine de la congélation ainsi que l'éclatement de certaines paillettes ont pu causer des dommages aux embryons.

3.2. Etude physiologique

Aucun effet de l'Antarelix n'a été démontré au cours de ces expériences ; les diminutions brusques des taux plasmatiques de FSH et de LH attendues ne sont pas observées.

Les diminutions des taux plasmatiques d'hormones gonadotropes sont donc simplement causées par la pose des éponges de progestagènes.

Les injections de FSH selon le modèle proposé entraînent un maintien des teneurs à des niveaux stables et élevés durant 3 jours, c'est-à-dire jusqu'à l'injection de LH ou de Busereline.

L'injection unique de LH induit des taux plasmatiques importants en LH pendant plus de 12 heures. Cette injection semble également donner une petite augmentation de la teneur en FSH (cet effet est observé lors du second essai).

Lors de la première expérience, la Busereline semblait inefficace car aucun pic de LH n'est détecté. La seconde expérience a permis de démontrer que ces pics s'étalant sur une durée de 5 heures ne peuvent avoir été enregistrés sur la base de prises de sang quotidiennes. C'est pourquoi des prises de sang beaucoup plus fréquentes ont été réalisées au cours de cet essai.

Dans la seconde expérience, l'injection double de Busereline crée un pic de LH très élevé et de courte durée ; la deuxième injection n'ayant pas d'effet. Cela pourrait être dû à un épuisement de l'hypophyse, à l'injection de quantités trop importantes de Busereline...

Il existe des corrélations entre le taux d'ovulation et divers paramètres. Parmi ces paramètres se trouvent la hauteur du pic de LH, la durée du pic de FSH, le taux d'oestradiol avant l'injection de LH ou de Busereline.

Ces renseignements correspondent à ce qui était attendu car il est par exemple normal d'avoir de grandes quantités de LH qui vont engendrer des taux d'ovulation importants.

La surface importante du pic de FSH correspond à de grandes quantités de FSH libérées au cours d'une longue période, ce qui entraîne la croissance d'un grand nombre de follicules qui pourront ovuler.

Le taux d'oestradiol étant le reflet du nombre de follicules présents en surface de l'ovaire, il est également normal d'observer une corrélation entre ces paramètres.

Perspectives

De nouvelles expériences seraient nécessaires afin de confirmer l'efficacité de l'apport d'hormones exogènes. Au cours de ces expériences il serait intéressant de modifier les quantités d'hormones injectées afin de tester la sensibilité de l'animal au produit, des prises de sang très fréquentes devraient être réalisées.

Il serait également intéressant de tenter de comprendre l'absence d'effet de l'Antarelix.

Les techniques de récolte devraient être améliorées afin de recueillir un nombre d'embryons en accord avec le nombre de corps jaunes observés.

Les étapes chirurgicales pourraient être réduites au maximum car il est possible qu'elles occasionnent un stress chez les brebis donneuses et receveuses.

Il serait intéressant de réaliser l'expérience en pleine saison de reproduction afin de savoir si la saison joue un rôle important dans ce processus.

Il serait encore intéressant de recommencer les transferts, mais, cette fois, avec un maximum d'embryons frais.

La technique de conservation des embryons pourrait être améliorée en utilisant des paillettes qui résisteraient à la congélation dans l'azote liquide.

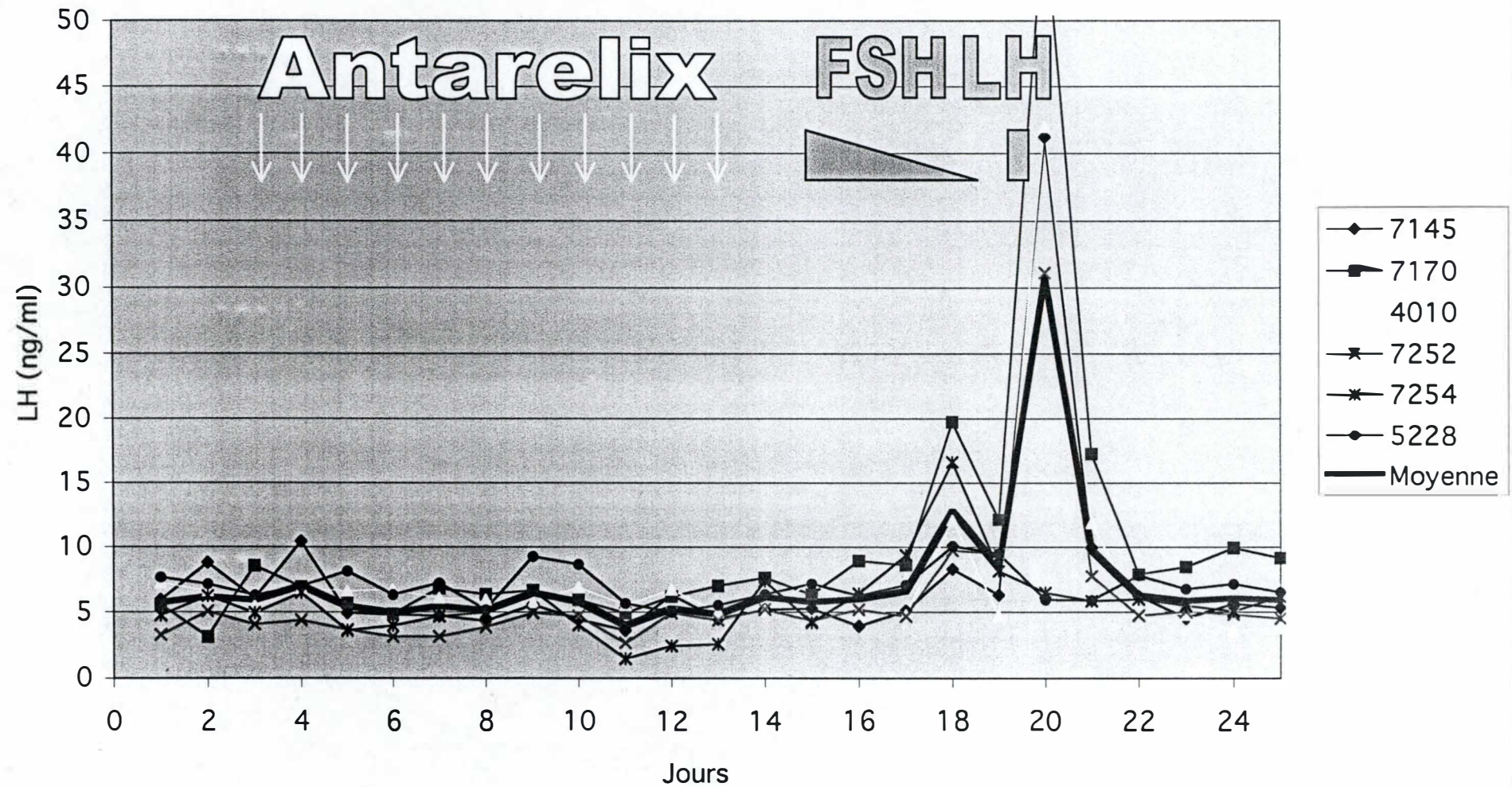
Le contrôle physiologique de la superovulation devrait être suivi de plus près, notamment en ce qui concerne la croissance folliculaire, le contrôle du blocage de la croissance folliculaire...

Une recherche des raisons ayant entraîné l'absence d'effet de l'Antarelix serait intéressante.

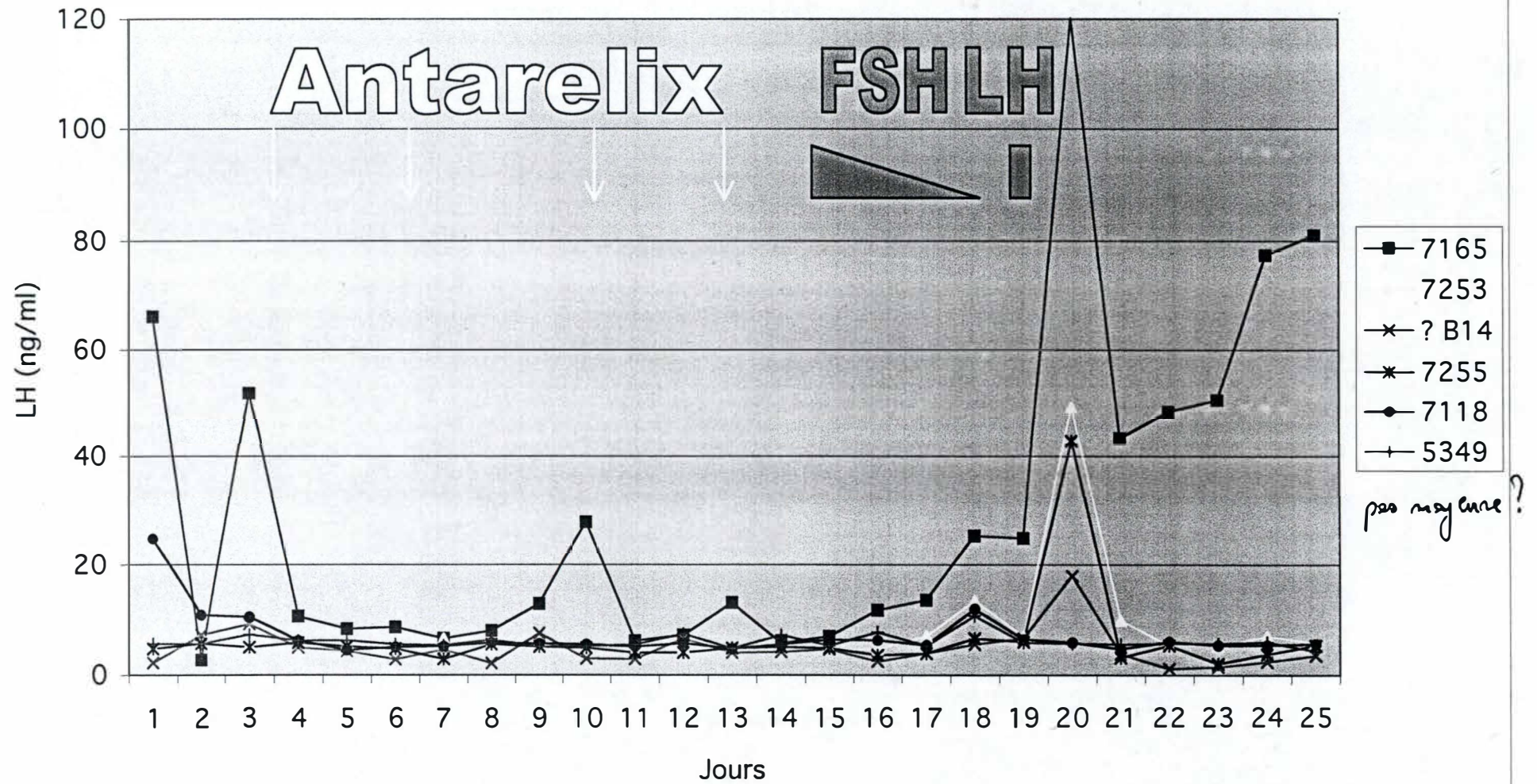
Enfin, il serait encore intéressant de tenter de mettre au point la stimulation optimale à l'aide de Busereline.

Les graphes ci-joints représentent l'évolution de la LH, de la FSH et de l'oestradiol dans le sang des brebis au cours de la première expérience. Les résultats individuels sont représentés.

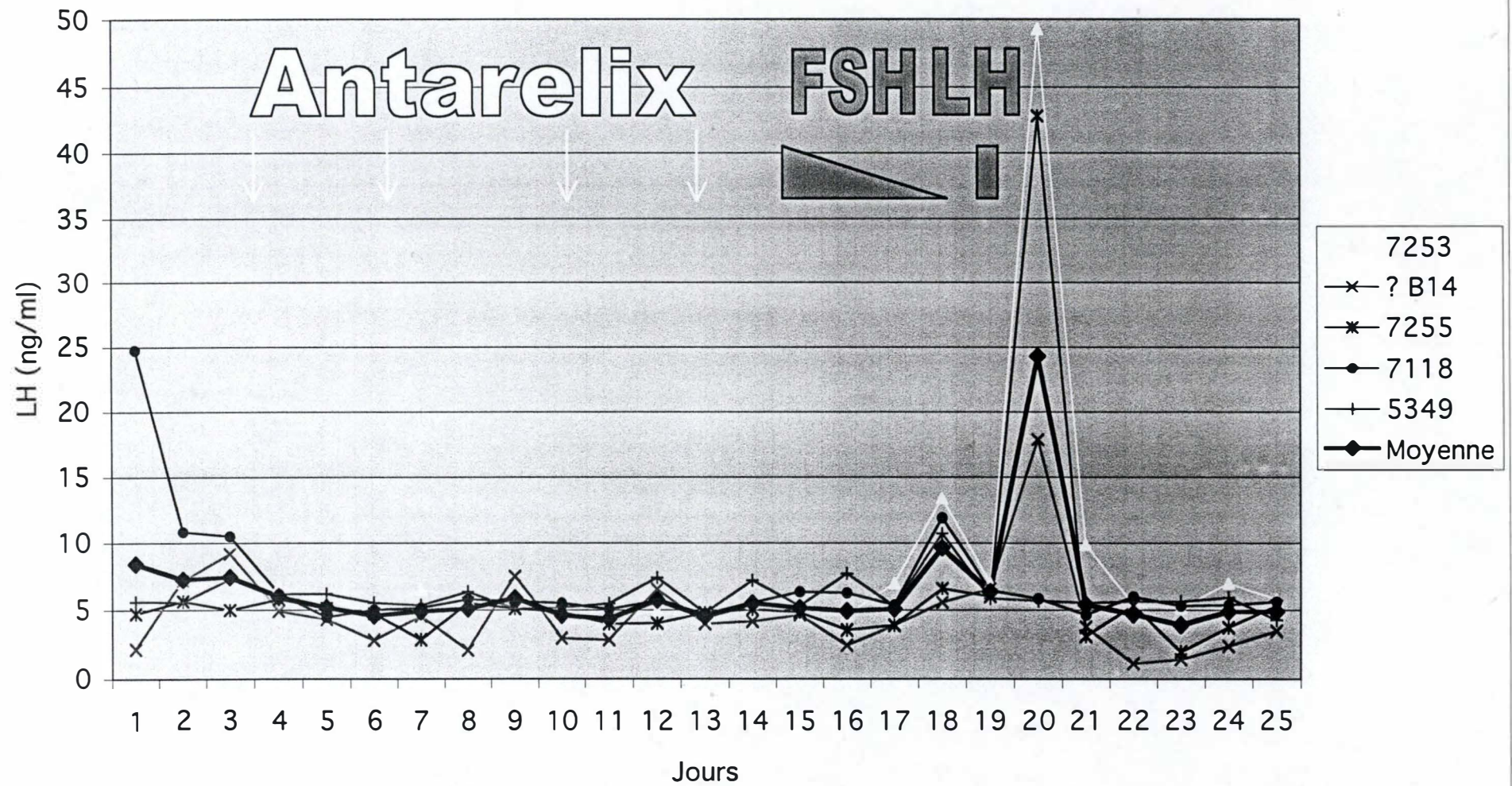
A11



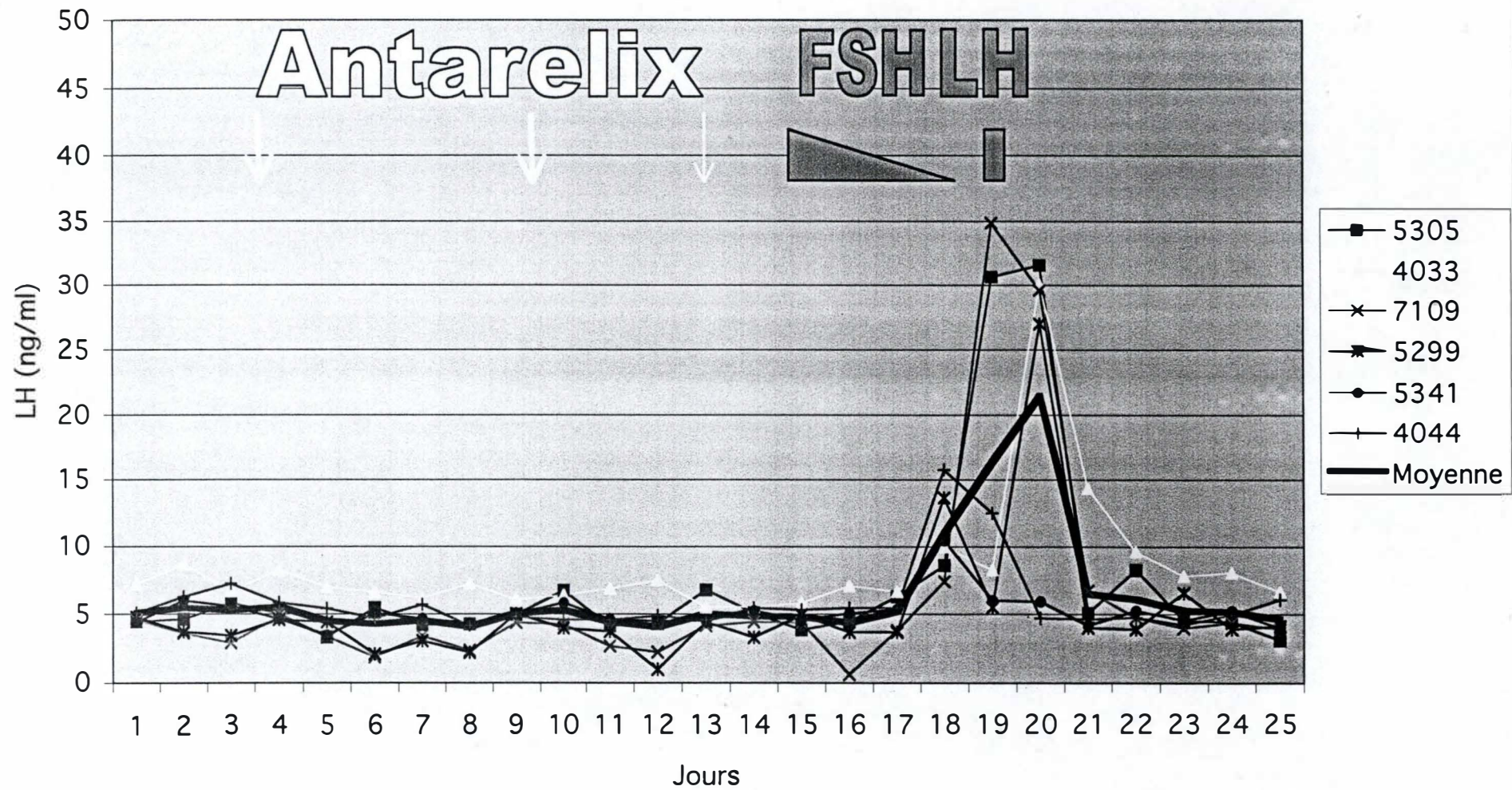
A4



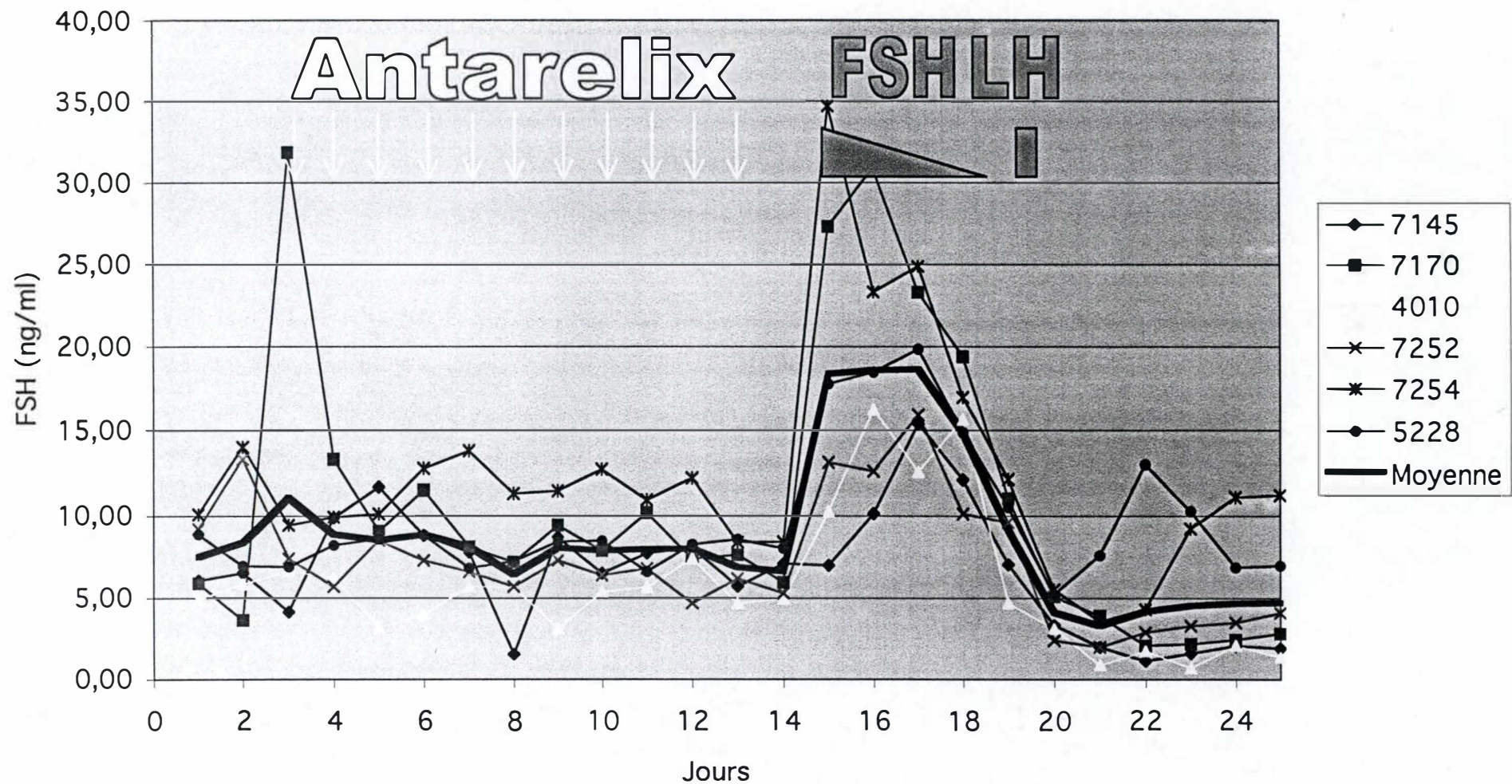
A4 (-7165)



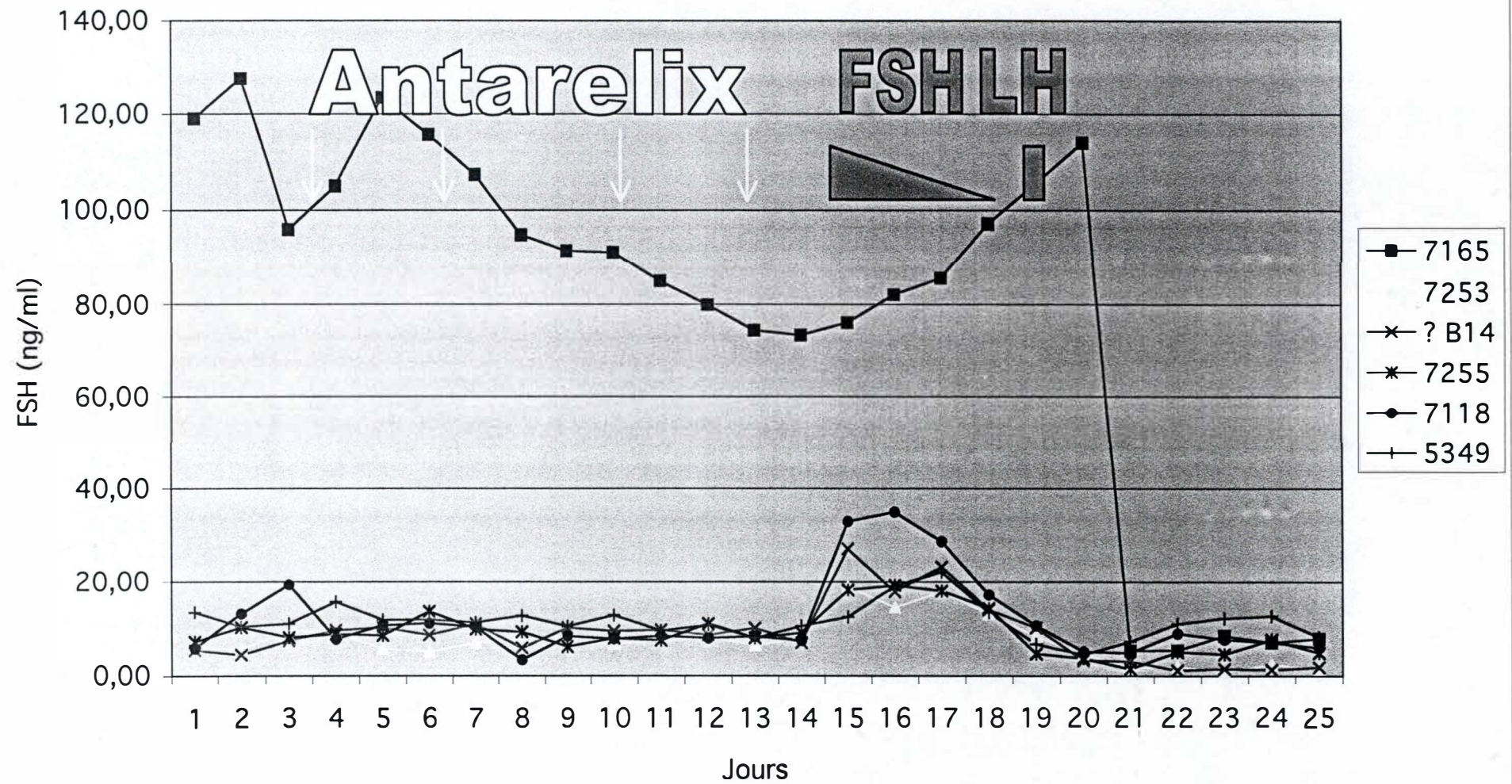
A3



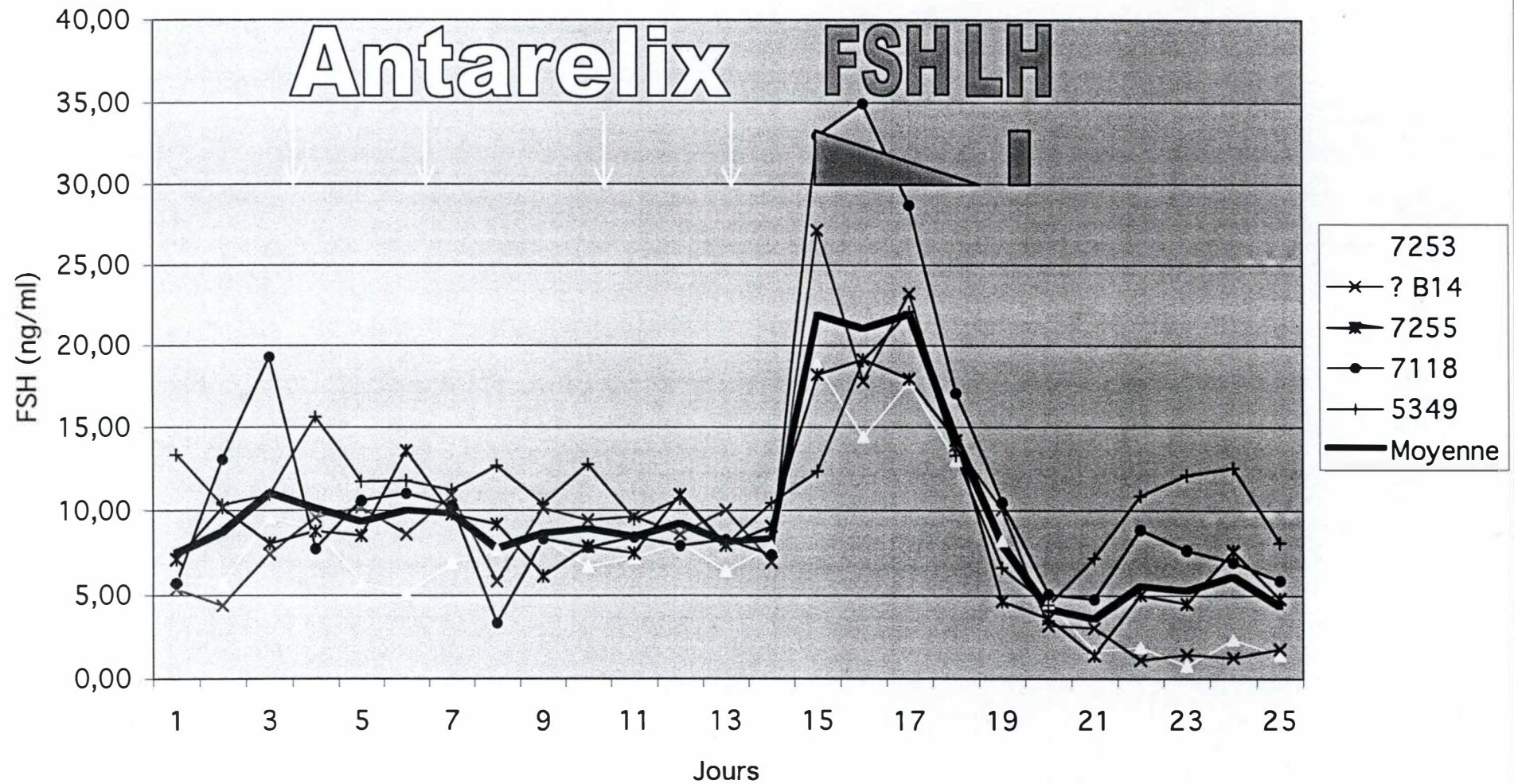
A11



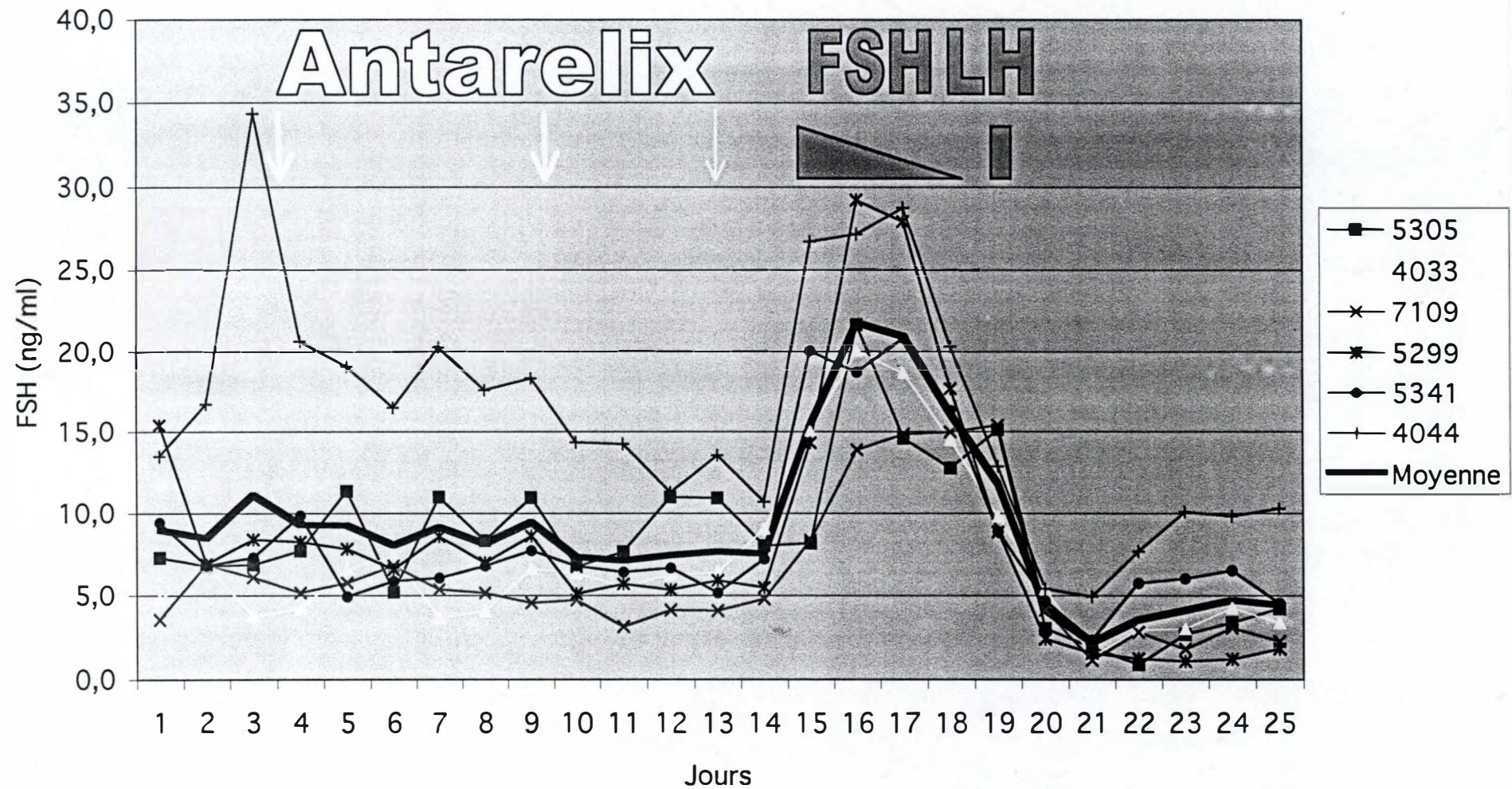
A4



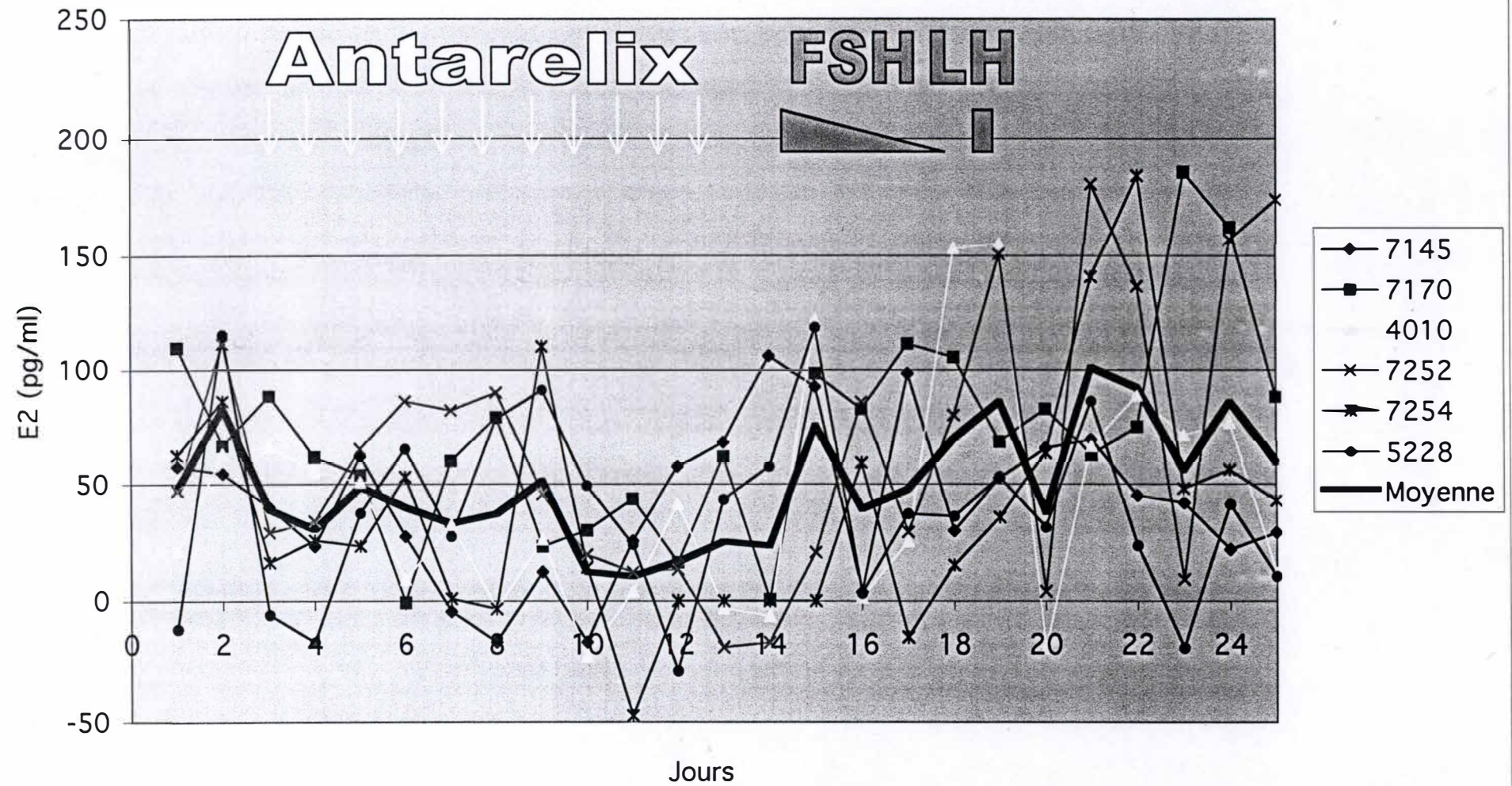
A4 (-7165)



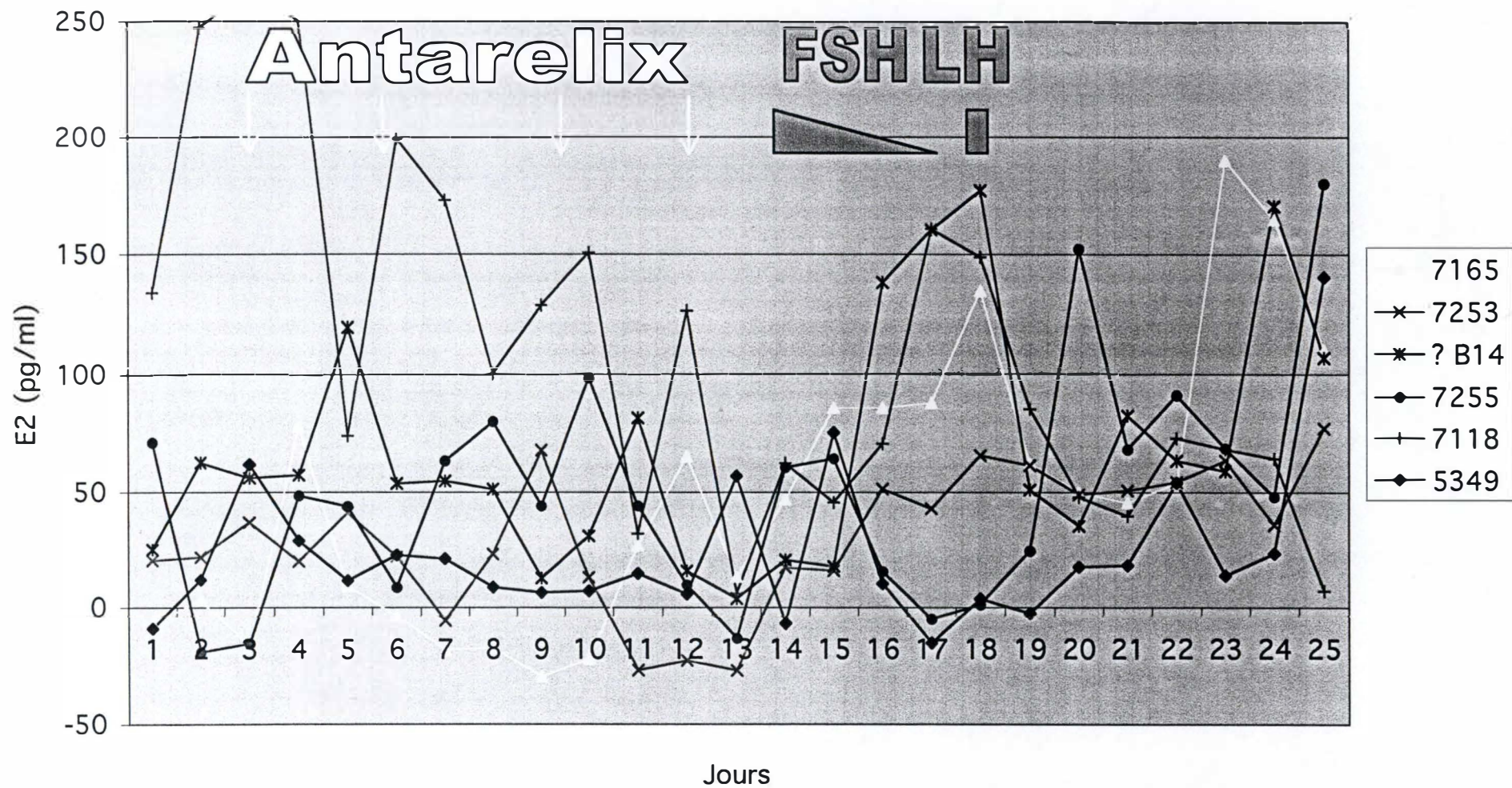
A3



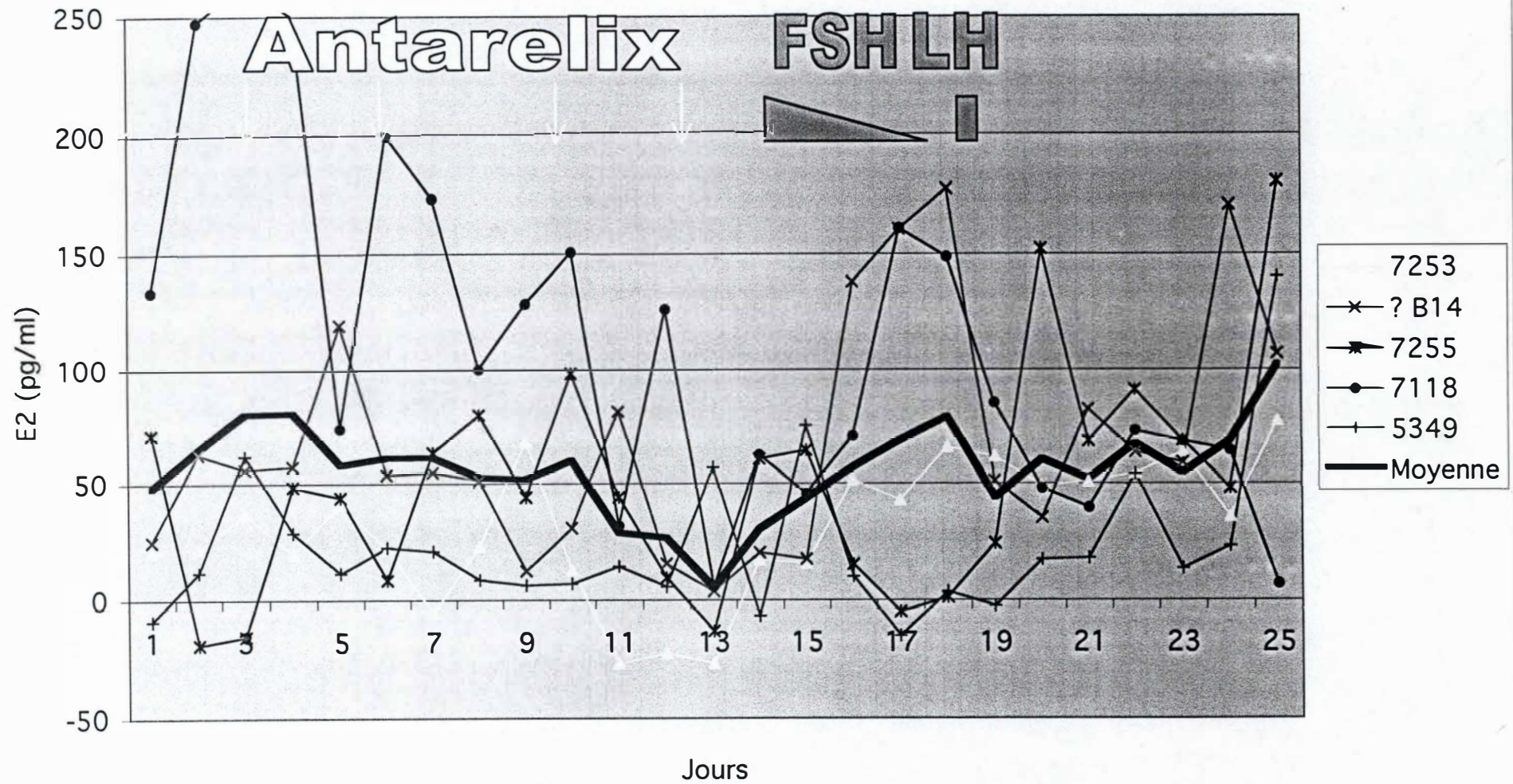
A11



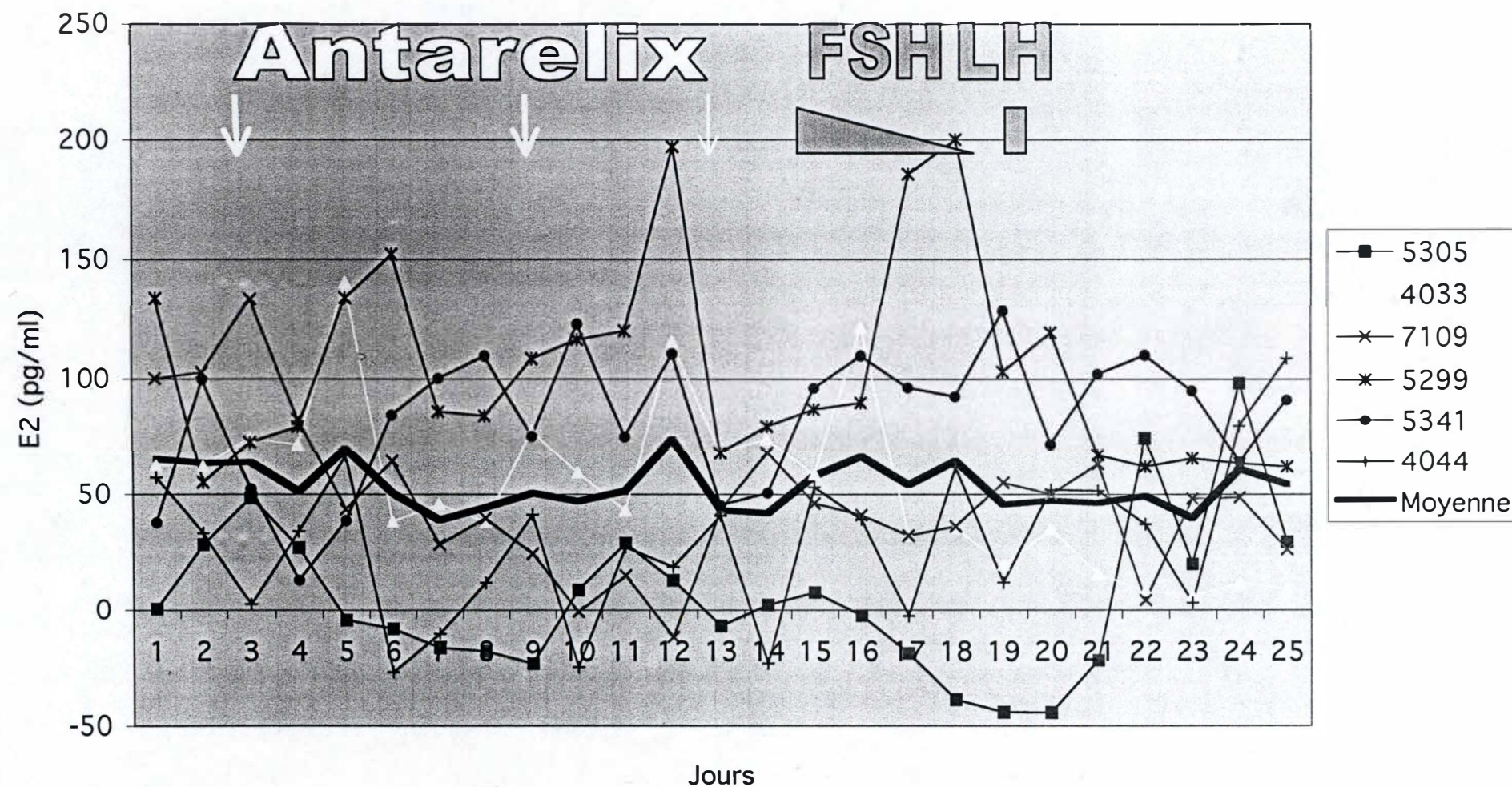
A4



A4 (-7165)



A3



Références bibliographiques

Références

- 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.
- Anderson G.B., (1978), **Advances in Large Mammal Embryo Culture**, *Methods in mammalian reproduction (Joseph C.D.Jr)*, Academic press London, ISBN: 0-12-201850-8, p.273-283.
- Armstrong D.T., Evans G., (1983), **Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats**, *Theriogenology*, 19 n°1, p.31-42.
- Barak Y., Amit A., Lessing J.B., Paz G., Homonnai Z.T., Yogev L., (1992), **Improved fertilization rate in an in vitro fertilization program by egg- yolk- treated sperm**, *Fertility and sterility*, 58 n°1, p.197-198.
- Bari F., Khalid M., Wolf B., Haresign W., Murray A., Merrell B., (2001), **The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep**, *Theriogenology*, 56 n°1, p.147-155.
- Baril G., Brebion P., Chesné P., (1993), *Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre*.
- Baril G., Chemineau P., Cognié Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P., Vallet J-C., (1993), *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*, INRA France, ISBN: 92-5-202808-0.
- Baril G., Pougnaud J.L., Freitas V.J.F., Leboeuf B.,Saumande J., (1996), **A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats**, *Theriogenology*, 45 n°3, p.697- 706.
- 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.
- Barrier-Battut I., Le Poutre N., Trocherie E., Hechet S., Grandchamp des Raux A., Nicaise J.L., Vérin X., Bertrand J., Fiéni F., Hoier R., Renault A., Egrou L., Tainturier D., Bruyas J.F., (2001), **Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare**, *Theriogenology*, 55 n°8, p.1679-1695.
- Bister J.L., (2001), *Reproduction assistée chez les mammifères*, p.7-27, 51-95.
- 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., Collignon J.L., Paquay R., (1986), **Hormonal ovarian and behavioural modifications induced by « ram teasing » at the beginning of the breeding season in texel ewe**, *British journal of pharmacology*, p.105.
- Bister J.L., Derycke G., Jacques E., Paquay R., (1988), **Effects of immunisation against androstenedione on the ovarian follicular dynamics and ovulation rate in ewes**, *Fund. Clin.Pharmacol.*, 1.

- Bister J.L., Derycke G., Meersschaert A., Paquay R., (1989), **Reports about intra-uterine insemination with laparoscopy in Texel and Suffolk sheep**, *Quadras Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal e Insemination Artificial*, León (Espana).
- Bister J.L., Derycke G., Paquay R., (1987), **PMSG and fertility of the Texel ewe in the anoestrus season**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 95 (3), p.61.
- Bister J.L., Heindrichs M., Paquay R., (1986), **Twin pregnancy diagnosis by progesterone measurement in the ewes**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 94, p.71.
- Bister J.L., Heins T., Paquay R., (1987), **PMSG and fertility of the Texel ewe**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 95 (2), p.27-28.
- Bister J.L., Jacques E., Paquay R., (1983), **Follicular growth during the sexual cycle of the ewe**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 91, p.106-107.
- Bister J.L., Jacques E., Titeca E., Trinteler M.F., Paquay R., (1988), **Reproductive physiological modifications induced by immunisation against androstenedione in texel ewes**, *3rd world congress on sheep and beef cattle breeding*, p.650-660.
- Bister J.L., Noël B., Perrard B., Mandiki S.N.M., Mbayahaga J., Paquay R., (1999), **Control of ovarian follicles activity in the ewe**, *Domestic Animal Endocrinology*, 17 n°2, p.315-328.
- Bister J.L., Paquay R., (1982), **La sécrétion tonique de LH et de FSH au cours de l'anoestrus de la brebis Texel**, *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, 90 n°5, p.101-102.
- Bister J.L., Paquay R., (1983), **Fluctuations in the p^lasma levels of follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anoestrus, gestation and lactation in the ewe : Evidence for an endogenous rhythm of FSH release**, *Theriogenology*, 4, p.565-582.
- 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., Cognié Y., Vallet J.C., (1992), **Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins**, *Ann zootech*, 41, p.331- 339.
- Brice G., Jardon C., Vallet A., (1995), **La conduite de la reproduction chez les ovins**, *Le point sur*, p.61.
- Brown R.E., (1994), *An introduction to neuroendocrinology*, p .37.
- Brugère-Picoux J., (1994), *Maladies des moutons*, Editions France Agricole, ISBN :2-85557-011-5, p.121.
- Cognié Y., Crozet N., Guérin Y., Poulin N., Bézard J., Duchamp G., Magistrini M., Palmer E., (1992), **Fécondation in vitro chez les ovins, caprins et équins**, *Ann Zootech*, 41, p.353-359.
- Cole H.H., (1975), **Studies on reproduction with emphasis on gonadotropins, antigonadotropins and progonadotropins**, *Biology of reproduction*, 12, p.194-211.
- Crighton D.B., Haynes N.B., Foxcroft G.R., Lamming G.E., (1978), **Ovulation control in sheep**, *Control of ovulation (Haresign W.)*, Buterworths London, ISBN: 0-408-70924-3, p.435.

- Cross J.C., (2001), **Genes regulating embryonic and fetal survival**, *Theriogenology*, 55 n°1, p.193-207.
- Crowe M.A., Padmanabhan V., Hynes N., Sunderland S.J., Enright W.J., Beitins I.Z., Roche J.F., (1997), **Validation of a sensitive radioimmunoassay to measure serum follicle-stimulating hormone in cattle : correlation with biological activity**, *Animal reproduction science*, 48 n°2-4, p.123-136.
- Deghenghi R., Boutignon F., Wüthrich P., Lenaerts V., (1993), **Antarelix (EP24332) a novel water soluble LHRH antagonist**, *Biomedicine and pharmacotherapy = biomédecine et pharmacothérapie*, 47 n°2-3, p.107-110.
- Derycke G., Bister J.L., Jacques E., Paquay R., (1988), **Effects of immunisation against androstenedione on hormonal levels in ewe**, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 1.
- Derycke G., Bister J.L., Paquay R., (1987), **Comparison between FGA and MAP impregnated sponges on the fertility and fecundity of the Texel ewe in the breeding season**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 95 (2), p.62.
- Derycke G., Bister J.L., Paquay R., (1990), **Reproductive capacity in rams: effect of season and breed**, *41st Annual Meeting of E.A.A.P.*, 2, p.242-243.
- 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.
- Derivaux J., Ectors F., (1986), *Reproduction chez les animaux domestiques*, 3^{ième} édition revue.
- Dhali A., Manik R.S., Das S.K., Singla S.K., Palta P., (2000), **Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes : effect of ethylene glycol concentration and exposure time**, *Animal reproduction science*, 63 n°3-4, p.159-165.
- Dufour J.J., Cognié Y., Marmillod P., Mariana J.C., Romain R.F., (2000), **Effects of the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist**, *Journal of reproduction and fertility*, 118 n°1, p.85- 94.
- Dukelow W.R., (1978), **Laparoscopic Research Techniques in Mammalian Embryology**, *Methods in mammalian reproduction (Joseph C.D.Jr)*, Academic Press London, ISBN: 0-12-201850-8, p.437-460.
- Dziuk P., (1973), **Occurrence, control and induction of ovulation in pigs, sheep and cows**, *Handbook of physiology, Endocrinology (section 7)*, 2 (female reproductive system, part I), p.145-147.
- 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.
- 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.

- Heins T., Bister J.L., Artoisenet P., Paquay R., (1986), **Influence d'une dose élevée de PMSG sur la fécondité des brebis Texel en saison naturelle de lutte**, *Revue de l'agriculture*, 39, p.301-304.
- Hodgen G.D., Schenken R.S., Goodman A.L., Kenigsberg D., Littman B.A., (1984), **Perioovulatory events in the primate ovarian menstrual cycle**, *Période péri-ovulatoire*, Masson Paris, ISBN: 2-225-80221-1, p.13-19.
- Holt W.V., (2000), **Basic aspects of frozen storage of semen**, *Animal reproduction science*, 62 n°1-3, p.3-22.
- Hunter R.H.F., Greve T., (1997), **Are lower fertility bulls necessarily less fertile? Proposals concerning insemination procedures**, *Animal reproduction science*, 48 n°2-4, p.113-121.
- Jacques E., Bister J.L., Paquay R., (1986), **Follicular events during the cycle in ewes with low ovulation rate**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 94(5), p.69-70.
- Kafi M., McGowan M.R., (1997), **Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle**, *Animal reproduction science*, 48 n°2-4, p.137-157.
- Kaulfuss K.H., Brabant S., Blume K., May J., (1995), **Optimization of embryo transfer programs in ewes by transrectal ultrasonographic ovary diagnosis (B- made) in superovulated donors**, *DTW, Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 102 n°5, p.208-212.
- Kuo Y.L., Tzeng W.L., Li P.C., Tang T.S., Young S.T., (2000), **Autostage sperm tracing system for semen evaluation**, *Archives of andrology*, 44 n°1, p.29-39.
- Leibo S.P., Mazur P., (1978), **Methods for the Preservation of Mammalian Embryos by Freezing**, *Methods in mammalian reproduction (Daniel J.C.Jr)*, Academic Press London, ISBN: 0-12-201850-8, p.179-201.
- Loumaye E., de Cooman S., Psalti I., Schrurs B., Adam T., Depreester S., Thomas K., (1988), **The beneficial effects of short- term administration of a LHRH agonist (buserelin) in in vitro fertilization**, *Journal de la gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, 17 n°8, p.1081-1087.
- Lymberopoulos A.G., Amiridis G.S., Kühholzer B., Besenfelder U., Christodoulou V., Vainas E., Brem G., (2001), **Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewe after laparoscopic intrauterine insemination**, *Theriogenology*, 55 n°9, p.1855-1862.
- Mandiki S.N.M., Derycke G., Bister J.L., Paquay R., (1998), **Influence of season and age on sexual maturation parameters in rams of the Texel, Suffolk and Ile de France breeds. 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity**, *Small Ruminant Research*, 28, p.67-79.
- Mandiki S.N.M., Noel 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.
- Marot M.P., Bister J.L., (1990), **Applications de l'échographie en reproduction ovine, L'échoscopie en reproduction caprine, bovine et ovine**, Ulg, p.4.

- Marrow C.J., Asher G.W., Berg D.K., Tervit H.R., Pugh P.A., McMillan W.H., Beaumont S., Hall D.R.H. Bell A.C.S., (1994), **Embryo transfer in fallow deer: superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos**, *Theriogenology*, 42, p.579-590.
- Martinez A.G., Furnus C.C., Matkovic M., de Matos D.G., (1997), **Lambing from transfer of in vivo and in vitro produced fresh or vitrified ovine embryos**, *Theriogenology*, 47 n°1, p.351.
- Mathieu C., Guérin J.F., Gille Y., Pinatel M.C., Lornage J., Boulieu D., (1988), **Separation of spermatozoa using Percoll gradients : value for in vitro fertilization**, *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, 17 n°2, p.237-241.
- Mbayahaga J., Mandiki S.N.M., Bister J.L., Paquay R., (1997), **Ovarian activity and fertilisation possibilities in local Burundian ewes and goats**, *Journal of reproduction and fertility*, 19, p.174.
- McMillan W.H., Hall D.R.H., (1994), **Laparoscopic transfer of ovine and cervine embryos using the transpic technique**, *Theriogenology*, 42, p.137-146.
- Mermillod P., Traldi A.S., Guérin Y., Poulin N., Massip A., Cognié Y., (1997), **Successful vitrification of in vitro produced ovine embryos**, *13th AETE meeting*, Lyon.
- Mizumachi M., Volgmayr J.K., Washington D.W., Chen C.L., Bardin C.W., (1990), **Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin alpha-subunit associated with increased pré- and post- ovulatory follicle- stimulating hormone levels**, *Endocrinology*, 126 n°2, p.1058-1063.
- Moor R.M., Osborn J.C., Crosby I.M., (1985), **Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation**, *Journal of reproduction and fertility*, 74 n°1, p.167- 172.
- Morgan F.J., Birken S., Canfield R.E., (1974), **Chemistry of human chorionic gonadotropin**, *Gonadotropins and gonadal function (Moudgal N.R.)*, Academic Press London, ISBN: 0-12-508850-7, p.79-92.
- Mortimer D., (1994), **Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity**, *Reproduction, fertility and development*, 6 n°1, p.25-31.
- Müller E.E., Nisticò G., (1989), *Brain Messengers and the Pituitary*, Academic Press LTD UK, ISBN: 0-12-510310-7, p.29-87.
- 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.
- Naitana S., Ledda S., Loi P., Leoni G., Bogliolo L., Dattena M., Cappai P., (1997), **Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development**, *Animal reproduction science*, 48 n°2-4, p.247-256.
- Newcombe J.R., Martinez T.A., Peters A.R., (2001), **The effect of the gonadotropin-releasing hormone analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares**, *Theriogenology*, 55 n°8, p.1619-1631.
- Noel B., Bister J.L., Paquay R., (1991), **Follicular events during the cycle in Suffolk ewes**, *The control of animal reproduction*, 6.

- Noel B., Bister J.L., Paquay R., (1991), **The control of fertility ion ewe: ovarian responses to Progestagen-PMSG treatment at different periods of the year**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 99, p.39.
- Noel B., Bister J.L., Paquay R., (1993), **Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year**, *Journal of reproduction and fertility*, 99, p.695-700.
- Noel B., Bister J.L., Pierquin B., Mandiki S.N.M., Paquay R., (1992), **The effect of a progestagen-PMSG treatment on the follicular growth in Suffolk ewes**, *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, 100 (5), p.38.
- Noel B., Mandiki S.N.M., Perrard B., Bister J.L., Paquay R., (1999), **Terminal follicular growth, ovulation rate and hormonal secretion after melatonin pretreatment prior to FGA-PMSG synchronisation in Suffolk ewes at the onset of the breeding season**, *Small ruminant Research*, 1755, p.1-9.
- Noel 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**, *Proceedings of the 13th Int. Congress on animal reproduction (Stone G.M. et Evans G.)*, 7, p.20.
- Norman W.A., Litwack G., (1987), *Hormones*, Academic Press LTD UK, ISBN: 0-12-521440-5, p.173-200 et 532-549.
- Pástorová B., (1998), **The influence of superovulation preparations on the levels of catecholamines in eminentia mediana, the pituitary and pineal gland of the sheep**, *Physiological research/ Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 47 n°6, p.471- 475.
- Pástorova B., Várady J., (1996), **The effect of hormonal superovulatory preparation FSH on the levels of catecholamines in the blood plasma of sheep**, *Physiological research/ Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 45 n°2, p.125- 129.
- Paz G., Hauser R., Yogev L., Yavetz H., Lessing J.B., Amit A., Homonnai T.Z., (1993), **New methods for predicting sperm fertilizing ability**, *Harefuah*, 125 n°1-2, p.7-10 et 64.
- Peris S., Solanes D., Pena A., Enric-Rodriguez-Gil J., Pigau T., (2000), **Ion-mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa : the role of amiloride and ouabaïn**, *Theriogenology*, 54 n°9, p.1453-1467.
- Perrard B., Lagache F., Noel B., Bister J.L., Paquay R., (1995), **Modification of the ovarian follicular populations by exogenous Growth Hormone in ewes at different periods of the year**, *Pflügers arch. Eur. J. Physiol.*, 430, p.8-20.
- Perrard B., Noel B., Lagache F., Bister J.L., Paquay R., (1996), **Effects of growth hormone administration on ovarian activity and hormonal secretions during the ovine estrous cycle**, *Eur. J. Physiol.*, 431.
- Racadot J., Peillon F., Da Lage C., (1972), **Hormones hypothalamo-hypophysaires, Glandes endocrines (3^{ième} édition)**, p.33.
- Ryan J.P., Hunton J.R., Maxwell W.M., (1991), **Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone**, *Reproduction, fertility and development*, 3 n°5, p.551-560.
- Salamon S., Maxwell W.M.C., (2000), **Storage of ram semen**, *Animal reproduction science*, 62 n°1-3, p.77-111.

- Schwartz N.B., (1973), **Mechanisms controlling ovulation in small mammals**, *Handbook of physiology, Endocrinology (section 7), 2 (female reproductive system, part I)*, Washington D.C., n°60-4587, p.145-147.
- Schwartz N.B., Ely C.A., (1974), **Role of gonadotropins in ovulation**, *Gonadotropins and gonadal function (Moudgal N.R.)*, Academic Press London, ISBN: 0-12-508850-7, p.237-252.
- Stevens A., Lowe J., (1997), *Histologie humaine*, ISBN: 2-8041-2574-2, p.340-341
- Tarès S., Sevellec C., (1987), **Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe**, *Reproduction, nutrition, development*, 27 n°4, p.859-863.
- Webb R., Gauld I.K., (1984), **Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe**, (*Salat-Baroux et Thibaut Ch.*), Masson Paris, ISBN: 2-225-80221-1, p.21-31.
- Westhusin M.E., Long C.R., Shin T., Hill J.R., Looney C.R., Pryor J.H., Piedrahita J.A., (2001), **Cloning to reproduce desired genotypes**, *Theriogenology*, 55 n°1, p.35-49.
- Wintenberger Torres S., Sevellec C., (1987), *Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins*, INRA Paris, ISBN: 2-85340-947-3, p.31.
- Yoshinaga K., (1973), **Gonadotrophin-induced hormone secretion and structural changes in the ovary during the nonpregnant reproductive cycle**, *Handbook of physiology section 7 endocrinology, 2Female reproductive system n°1*, Washington D.C., n°60-4587, p.363-388.
- Zhu Y.F., Struthers R.S., Patrick J., Connors Jr, Yinghong G., Gross T.D., Saunders J., Wilcoxon K., Reinhart G.J., Ling N., Chen C., (2002), **Initial structure-activity relationship studies of a novel series of Pyrrolo [1,2- α] pyrimidin-7-ones as GnRH receptor antagonists**, *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 12 n°3, p.403-406.
- Zoli A.P., Beckers J.F., Benitez Ortiz W., Ectors F., (1993), **Isolement et caractérisation d'une glycoprotéine placentaire bovine: mise au point d'un dosage radioimmunologique sensible et spécifique**, *Actualité scientifique: Maîtrise de la reproduction et amélioration génétique des ruminants*, May 1993, p.235-247