

11/12 89 0082

9363

Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux
10, rue Pierre Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général-de-Gaule
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

MU
JP

LA TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE
CHEZ LES PETITS RUMINANTS :
OPPORTUNITES DE SON DEVELOPPEMENT

par

René QUIRIN



SOMMAIRE

Introduction	Page: 1
1. Technique du transfert embryonnaire c/o petits ruminants	2
1.1. Production d'embryons	2
1.1.1. La superovulation	2
1.1.1.1. Protocoles utilisant FSH	2
1.1.1.2. Protocoles utilisant d'autres hormones	5
1.1.1.3. Variations suivant l'hormone utilisée et son origine	5
1.1.2. La fécondation	6
1.1.3. La collecte	7
1.1.4. Qualité des embryons	9
1.2. Conservation des embryons	9
1.2.1. Conservation de courte durée	9
1.2.2. Conservation de longue durée	10
1.3. Transfert embryonnaire	11
1.4. Résultats globaux obtenus	12
2. Aspects sanitaires de la T.E.	14
3. Intérêts de la T.E.	15
3.1. T.E. et génétique	15
3.2. Intérêts économiques de la T.E.	18
3.3. Coût de la T.E.	19
Conclusion	20
Références bibliographiques	21

INTRODUCTION

Le transfert d'embryons est une méthode de reproduction artificielle qui consiste à prélever, après fécondation, le ou les embryons dans l'appareil génital d'une femelle, dite donneuse, pour les transplanter dans l'appareil génital d'une ou de plusieurs femelles dites receveuses, dans lequel le ou les embryons vont se développer jusqu'à leur naissance. Si la donneuse est une femelle superovulée, cette méthode permet d'augmenter sa descendance par nourrice interposée; on pourrait obtenir un résultat équivalent en prélevant à chaque cycle sexuel le ou les embryons d'une donneuse non superovulée (Nibart M. et Bouyssou B.).

IL est actuellement utilisé dans de nombreuses espèces animales avec un développement important chez les bovins. L'application de la technique aux petits ruminants nécessite certaines adaptations qui tiennent compte de leurs particularités anatomiques et physiologiques.

Le transfert d'embryons présente par ailleurs un risque sanitaire qu'il est nécessaire d'évaluer et de contrôler.

L'engouement actuel pour cette technique de reproduction provient de l'intérêt qu'elle offre non seulement du point de vue génétique mais également commercial et c'est sans doute ce dernier aspect qui explique l'ampleur qu'elle prend chez les petits ruminants dans certains pays et/ou dans certaines races.

1. TECHNIQUE DU TRANSFERT D'EMBRYONS CHEZ LES PETITS RUMINANTS

La transplantation embryonnaire se subdivise en trois phases qui se succèdent chronologiquement. La parfaite maîtrise de chacune d'elles est nécessaire pour obtenir un taux de réussite convenable.

1.1. Production d'embryons

La production d'embryons de bonne qualité est le principal facteur limitant de la technique. Cette phase se subdivise elle même en quatre opérations successives.

1.1.1. La superovulation

Différents protocoles de superovulation ont été proposés.

1.1.1.1. Protocoles utilisant la FSH

* Chez la brebis:

Torrès et al (60) (61) préconisent une synchronisation des cycles des brebis donneuses selon la technique de Robinson (1966) (cité par l'auteur) à l'aide d'éponges vaginales imprégnées de 40 mg d'acétate de fluorogestone (FGA: Intervet S.A. Angers, France) laissées en place pendant une durée de 14 jours. La dose employée passe à 30 mg et la durée à 12 jours lorsque l'opération est tentée pendant la période d'anoestrus saisonnier.

La stimulation de la maturation folliculaire est provoquée par l'administration de FSH (Folliculin Stimulating Hormon: extrait d'hypophyse d'origine porcine contenant également LH: Luteinizing Hormon en des proportions variables selon son origine) symbolisée par FSH-P. Deux protocoles de 4 injections intramusculaires de 16 mg ont été étudiés (18) (60) (61), l'un de quatre doses égales (4 x4 mg) et l'autre de quatre doses décroissantes (6,5,3 et 2 mg). La première injection est réalisée 24 heures avant le retrait de l'éponge puis les trois autres sont échelonnées toutes les 12 hrs (en raison de la faible durée de demi vie de la FSH).

Le schéma suivant représente le protocole du traitement de superovulation pratiqué sur les brebis.

D0 représente le jour de pose des éponges: (D0: day 0)

D14 est le jour du retrait des éponges des donneuses.

D13: début du traitement de superovulation.

D0	D13		* D14			
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+						
heures:	-24	-12	0	+12		
FSH-P en mg:	6	5	3	2	↑↑↑	
					J0	J6
					oestrus	collecte

J0: début de l'oestrus: jour"0"

*: retrait des éponges des receveuses

Schéma 1: Protocole de superovulation -brebis-
(Torrès et al (60))

Le protocole utilisant des doses décroissantes donne des résultats satisfaisants: sur 21 brebis Romanov x Préalpes, une moyenne de 19.5 +/- 2.6 ovulations est observé par Torrès (60).

L'efficacité de la stimulation est mesuré par le nombre d'ovulations, matérialisé par la formation de corps jaune: CJ. Lorsque la dose de FSH-P employée n'est que de 12 mg, le nombre d'ovulations est significativement inférieur (6) (61). Par ailleurs, la race utilisée joue également un rôle important sur le taux d'ovulations, aussi bien chez les ovins (60) (61), que chez les caprins (6) (43).

En revanche, l'âge des animaux ne semble pas influencer ce paramètre (61); mais il influence le nombre d'embryons transférables (voir 1.4.).

Torrès et al (61) décrivent une relation de proportionnalité du nombre d'agneaux nés auquel on peut s'attendre en fonction du taux d'ovulation observé lors de la collecte. En revanche, Armstrong observe un arrêt de la corrélation à partir d'un certain nombre d'ovulations (voir § 1.1.4.).

Des protocoles de superovulation utilisant des doses supérieures de FSH-P (18 à 24 mg) sont décrits (1) (11) (10).

Enfin, une diminution de la réponse au traitement de superovulation en fonction de la répétition de celui-ci est observée dans certaines espèces ovines (59).

* Chez la chèvre:

Le protocole utilisé chez les chèvres présente quelques modifications par rapport à celui décrit précédemment chez la brebis.

Baril et al (6) synchronisent l'oestrus par administration de 100 ug de cloprostenol (analogue PGF2alpha) le neuvième jour d'un traitement progestagène d'une durée de 11 jours par éponges vaginales imprégnées de FGA (45 mg).

La superovulation est réalisée à l'aide de FSH-P à des doses de 16 à 24 mg administrées de manière décroissante toutes les 12 heures à partir du 8e ou du 9e jour du traitement progestagène. L'auteur (6) obtient une moyenne de 9.5 +/- 7.4 ovulations. Le traitement d'une durée de 4 jours et de 20 mg de FSH-P est meilleur que le traitement de 3 jours et 16 mg de FSH-P (Voir schéma 2). Il donne une

moyenne de 8.6 embryons récoltés (ce chiffre est forcément inférieur à celui du nombre d'ovulations).

L'étude des résultats obtenus par superovulation en fonction de la variation du rapport FSH/LH montrent que le nombre d'embryons transférables obtenus est significativement supérieur lorsque le rapport décroît que lorsqu'il reste constant (6) (20).

Protocole 1: 16 mg FSH-P; administration en 3 jours

J0	J8		J9	J10		J11	
+-----//-----+							
			↑	↑	↑	↑	↑
Doses FSH-P en mg:			4	4	2	2	2
			*			**	
R: ratio FSH/LH:	R=		8	8	1	1	0.4 0.4

*: dépose éponge
 **: injection cloprosténol

Résultats: moyenne du nombre d'embryons récoltés: 7.5
 moyenne du nombre d'embryons transférables: 5.2
 (70% des embryons récoltés)

Protocole 2: 20 mg FSH-P; administration en 4 jours

J0	J8		J9	J10		J11	
+-----//-----+							
			↑	↑	↑	↑	↑
Doses FSH-P:			4	4	3	2	1
				*		**	

Le ratio FSH/LH reste constant: R=1
 *: dépose éponge
 **: injection cloprosténol

Résultats: moyenne du nombre d'embryons récoltés: 8.6
 moyenne du nombre d'embryons transférables: 5.7
 (66% des embryons récoltés)

Schéma 2: Protocoles de superovulation -chèvre-
 (Baril et al (6))

Il est possible de constater dans plusieurs races caprines une diminution de la réponse aux traitements de superovulation en fonction de la répétition de ceux-ci (6) (43), mais une publication récente ne relate pas la chute de performances attendue (63).

Enfin, Baril et al (6) décrivent un effet saisonnier sur le nombre d'embryons recueillis en administrant le même traitement FSH-P.

Les protocoles décrits précédemment sont ceux qui sont utilisés en routine, en particulier par les chercheurs français. Néanmoins, d'autres protocoles utilisant des hormones différentes ont été expérimentés.

1.1.1.2. Protocoles utilisant d'autres hormones

Plusieurs protocoles utilisant comme hormone la PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) ont été expérimentés. Armstrong et al (2) ont étudié les effets comparés de PMSG et FSH-P sur la superovulation dans l'espèce caprine et concluent à la supériorité de FSH-P aussi bien en ce qui concerne le nombre d'ovulations que le nombre de produits nés suite au transfert (3).

Barry et al (7) ont étudié les effets de différents traitements superovulatoires utilisant PMSG ou FSH-P suivis de GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormon) ou de HCG (Human Chorionic Gonadotrophin) et obtiennent eux aussi des résultats inférieurs en ce qui concerne la PMSG. Ils utilisent par ailleurs un schéma différent pour la FSH-P de celui décrit précédemment et obtiennent de bons résultats.

Moore et Eppleston (40) ont décrit en 1979 un protocole utilisant l'hormone HAP (Horse Anterior Pituitary). Ce dernier semble perdre de son intérêt actuellement.

1.1.1.3. Variations d'activité suivant l'origine et l'hormone utilisée

La littérature rapporte une variation d'activité en fonction d'une part de l'origine de l'hormone et d'autre part de l'hormone utilisée.

L'extrait hypophysaire porcin utilisé dans la majorité des cas est le produit commercial: FSH Burns Biotec (Omaha, USA) mais certains chercheurs utilisent la préparation de Combarous Y.: C.Y. 1175 INRA Nouzilly. Les deux préparations semblent avoir un effet significativement différent quant à la moyenne des ovulations observées, à l'avantage de la seconde (60).

Baril et al (6) utilisent deux types différents de FSH-P (Burns Biotec, Shering ou Sanofi) et ne notent aucune différence quant à l'origine de l'hormone employée.

Les mêmes auteurs décrivent en revanche la présence follicules anovulatoires de taille supérieure à la normale dans près de 20% des cas, accompagnée d'une diminution du nombre d'ovulations suite à une superovulation réalisée à l'aide de FSH-P. La même observation a été faite en ce qui concerne la PMSG (2). Armstrong et al (2) notent par ailleurs des problèmes de régression lutéale consécutifs

à un traitement superovulatoire de PMSG. Ces phénomènes ont été relatés depuis à plusieurs reprises (14) (41) (52).

Néanmoins, Armstrong et al (4) proposent un protocole de superovulation constitué d'une administration de progestérone P4 pendant les trois jours suivant le retrait des éponges et qui semble efficace pour éviter les inconvénients posés par la régression lutéale.

Après avoir décrit les effets respectifs des différentes hormones utilisées dans les protocoles de superovulation et leurs limites, nous sommes amenés à nous intéresser à la fécondation, deuxième phase de la production d'embryons.

1.1.2. La fécondation

*L'oestrus

Dans la pratique, l'oestrus, lorsqu'il peut être détecté (90% des cas:(6)), est le témoin le plus fiable révélant la proximité de l'ovulation. Il est en général détecté au moins trois fois par jour à l'aide de mâles vasectomisés. Ces derniers sont mis en contact avec les femelles afin de déterminer avec précision ses premiers signes.

Le début des chaleurs commence entre 24 et 54 heures après la dépose des éponges (6). Les chercheurs estiment que le nombre moyen de corps jaunes comptés est significativement supérieur chez les femelles dont l'oestrus commence 24 à 30 heures après la dépose que chez celles où il commence plus tard, ceci aussi bien chez les chèvres (6) que chez les brebis (61).

*L'ovulation

La fécondation nécessite la présence dans le tractus génital femelle d'un nombre suffisant de spermatozoïdes mobiles au moment adéquat. L'ovulation est repérée par le pic de LH (19) qui se produit dans les conditions naturelles 62 heures après le retrait des éponges, délai qui se réduit à 56 heures suite à l'administration de FSH-P.

L'ovulation a lieu en moyenne 25 heures après le début de l'oestrus chez des brebis superovulées à l'aide de FSH-P (7).

Torrès et al (60) estiment que les spermatozoïdes doivent se trouver dans l'utérus 48 heures après le retrait des éponges.

*La fécondation

Deux techniques permettent d'assurer la fécondation des femelles: -la saillie naturelle
-l'insémination artificielle

La saillie naturelle est préconisée deux fois, en début et en milieu d'oestrus chez la brebis (7) et 12 heures et 24 heures après les premiers signes des chaleurs chez la chèvre (6).

L'insémination artificielle quant à elle doit être réalisée deux fois (48 et 54 heures après le retrait des éponges) ou trois fois (30, 48 et 54 heures après la dépose) chez la chèvre (6). Dans cette technique, il est recommandé de déposer 200 millions de spermatozoïdes dans l'utérus à chaque insémination.

En ce qui concerne la brebis, Torrès et al (60) introduisent 20 millions de spermatozoïdes dans chaque corne utérine à chaque insémination.

Baril et al (6) décrivent une différence du taux de fécondation obtenu selon la technique employée chez la chèvre: saillie ou insémination avec 71% et 60.2% respectivement.

Par ailleurs, l'insémination artificielle pratiquée trois fois donne des résultats significativement meilleurs en ce qui concerne les oeufs segmentés que lorsqu'elle est pratiquée deux fois: 82.1% et 56.1% respectivement (6).

La bibliographie relate cependant des perturbations de la fécondité dues au traitement progestagène: (FGA).

Brebion et al (12) démontrent la supériorité de la fertilisation obtenue sur des brebis de race lacaune en déposant la semence dans l'utérus par rapport aux résultats obtenus en insémination au niveau du col. Certains auteurs (24) (29) décrivent l'inhibition du transport des spermatozoïdes dans le tractus génital chez des brebis superovulées. Ces problèmes seraient dûs à des modifications des sécrétions cervicales (28) et des perturbations de la motricité utérine (27) et non à une baisse de la qualité des ovocytes obtenus consécutivement à une superovulation (62).

La fécondation est une technique qui ne comporte pas de facteur limitant lorsque les normes établies sont bien respectées. Elle précède la troisième phase: la collecte des embryons.

1.1.3.Collecte des embryons

La collecte des embryons est limitée chez les petits ruminants par un obstacle anatomique: l'impossibilité de passer une sonde au niveau cervical.

1.1.3.1.La technique classique de collecte est chirurgicale. Elle requiert une préparation chirurgicale classique avec l'animal en décubitus dorsal et incision sur la ligne blanche en région ante-pubienne.

L'anesthésie générale est induite par du thiopental (8 mg/kg) ou du pentobarbital (13 mg/kg) (6) et le relai est pris ensuite par une anesthésie gazeuse (halothane). Une méthode plus légère est décrite par Schiewe et al (46) La

pré-anesthésie est réalisée à l'aide de sulfate d'atropine (0.22 mg/kg i.m) puis l'anesthésie est constituée par l'administration de xylazine (Rompun: 0.22 mg/kg) suivie 5 mn plus tard de kétamine (Ketalar, Imalgène : 11 mg/kg). La collecte est réalisée du 6e jour (majorité des publications) au 10e jour (15) sachant que J0 est le jour du début des chaleurs.

Une laparotomie est réalisée sur la ligne blanche et les embryons sont récoltés selon la technique décrite par Hunter 1955 (32). Une autre technique de rétroperfusion est décrite par Fournier-Delpech et al (26); les embryons sont entraînés par une injection de 20 ml de milieu 199 (Gibco, Flobio, Courbevoie France) mélangé à 10% (61) ou 20% (15) de serum bovin foetal. Ils sont introduits ensuite dans un tampon phosphate (PBS-IMV France complété avec 10% de sérum bovin foetal (6) et conservés à une température de 25 à 27°C avant d'être examinés à la loupe binoculaire.

Chesné et al (15) utilisent le milieu B2 (Api system, La Balme Les Grottes, Montalieu-Vercieu, France) (38) sous atmosphère contrôlée: (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) jusqu'à leur utilisation.

1.1.3.2. Une nouvelle technique de collecte connaît un essor important depuis quelques années: la laparoscopie (36) (46) (61) (63).

La préparation opératoire est identique à celle de la laparotomie mais l'intervention est bien moins délabrante que cette dernière (46).

La durée d'intervention pour les deux techniques est environ identique: 20 à 30 mn (6). La laparoscopie présente un avantage certain: celui de pouvoir être répétée avec succès plusieurs fois (36) (63) sans formation d'adhérences fibreuses post-chirurgicales (59).

Lors d'une intervention par laparotomie, Torrès et Sevelec (59) observent une diminution du taux de récolte qui ne se produit pas par laparoscopie (63) . Vallet et al (63) rapportent sur des chèvres collectées quatre fois consécutivement par laparoscopie, une moyenne d'embryons de 12 +/- 6.9 correspondant à un taux de récolte de 72% (taux de récolte = rapport du nombre d'embryons récoltés au nombre d'ovulations mesuré par le nombre de CJ).

Néanmoins, le taux de récolte par laparoscopie est inférieur à celui obtenu par laparotomie (6) .

1.1.3.3. Enfin, une troisième technique commence à être explorée: la collecte par la voie cervicale (8) (21) . Cette technique impossible en théorie anatomiquement et physiologiquement (le col étant strictement fermé le 6e jour après les chaleurs), devient possible grâce à un protocole préconisant l'utilisation de substances chimiques à effet dilatatoire sur le cervix (42) (44) : la dinoprostone et la relaxine. Cette technique, si elle se concrétisait,

permettrait de simplifier considérablement la collecte et le transfert des embryons chez les petits ruminants.

Suite à la collecte des embryons vient logiquement l'évaluation de leur viabilité qui constitue l'ultime opération de la phase de production d'embryons.

1.1.4. Qualité des embryons

Après avoir laissé sédimenter les embryons dans le liquide de collecte, ceux-ci sont recherchés à la loupe binoculaire afin d'apprécier leur viabilité sur des critères morphologiques en fonction du jour de la collecte (Lawson 1977; Killen 1981, cités par Martinez et al (35)).

Baril et al (6) utilisent un classement des embryons segmentés en dégénérés ou normaux. Les embryons normaux sont classés en morula, blastocystes épanouis, blastocystes éclos). Il faut remarquer à ce niveau l'existence d'une différence du stade d'évolution des embryons récoltés à J6 selon l'espèce (ovine ou caprine). Martinez et al (35) observent une proportion de 35% de jeunes blastocystes chez la brebis à J6 alors que Baril et al (6) relatent une proportion d'embryons du même stade de 16% chez la chèvre. Il existe par ailleurs des différences intraspécifiques importantes (34), ce qui entraîne des difficultés de sélection des embryons à transférer ou à congeler.

Armstrong (1) constate une diminution du taux de morulas recueillies avec l'augmentation du taux d'ovulation alors que Torrès (60) établit une corrélation croissante entre ces deux paramètres.

L'écart dépose des éponges-oestrus fait varier lui aussi le nombre d'embryons transférables (60). Les meilleurs résultats sont obtenus pour un écart de 24 heures puis ils décroissent en fonction de l'allongement de celui-ci.

Il semble également que le nombre d'embryons transférables par rapport au nombre d'embryons recueillis, diminue avec l'âge des brebis collectées (60).

Après avoir sélectionné les embryons transférables, nous abordons la seconde phase capitale de la technique de transfert d'embryons: la conservation de ces embryons, qu'elle soit de courte durée ou prolongée.

1.2. Conservation des embryons

1.2.1. Conservation de courte durée

Les embryons sélectionnés sont conservés dans le milieu B2 décrit précédemment, sous atmosphère et température

contrôlée (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) (35). Puis il est recommandé qu'ils soient transférés dans un délai de deux heures suivant leur collecte sans toutefois dépasser quatre heures (6) .

1.2.2. Conservation de longue durée

D'importants progrès ont été effectués dans le domaine de la congélation des embryons de petits ruminants.

Cocero et al (17) reprenant des travaux de Tervit et Goold 1984 démontrent que l'éthylène-glycol (1.5 M) assure une meilleure cryoprotection pour des embryons de brebis que le glycerol (1.4 M) utilisé couramment jusqu'à présent. Le même cryoprotecteur a été étudié chez la chèvre (31) .

Le protocole consiste à mettre des embryons, préalablement conservés dans du PBS + 20% de sérum bovin foetal, au contact successivement avec trois solutions contenant de l'éthylène-glycol (A: 0.5 M, 10 mn; B: 1.0 M, 10 mn; C: 1.5 M 10 mn respectivement) ceci à température ambiante. Puis les embryons sont chargés dans des paillettes (IMV France) et soumises à un refroidissement conduisant à la congélation :

- *diminution de 1°C/mn jusqu'à -7°C
- *diminution de 0.3°C/mn jusqu'à -35°C
- *à ce stade les paillettes sont plongées directement dans l'azote liquide à -196°C

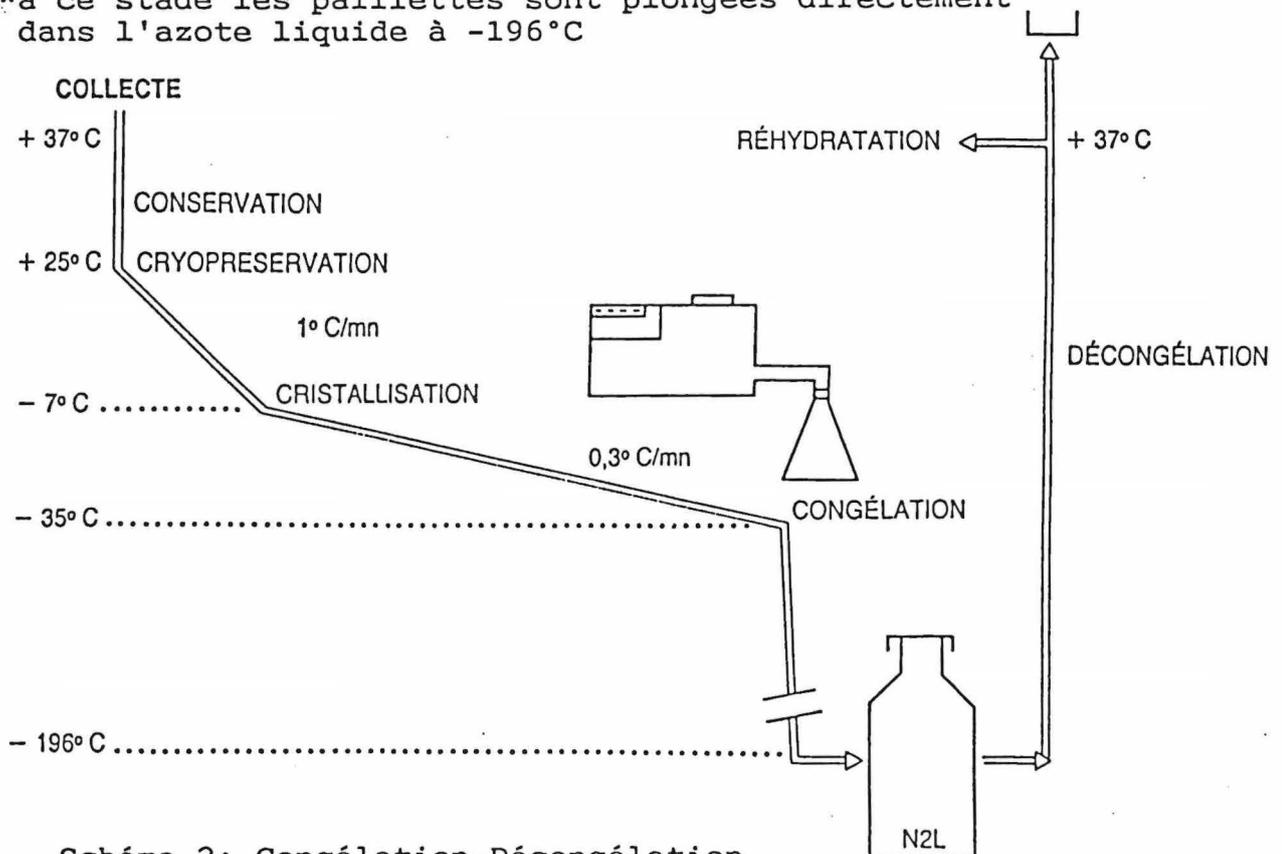


Schéma 3: Congélation-Décongélation d'après Casamitjana et Perrin (13)

La décongélation se fait en mettant les paillettes en contact avec de l'eau à 37°C. Suite à cette opération de réchauffement, il est nécessaire de chasser le cryoprotecteur en les introduisant dans une solution de PBS + 20% de sérum bovin foetal et 0.25 molaire en sucrose pendant 10 mn.

Il faut remarquer que toutes les opérations du protocole restent identiques lorsqu'on utilise le glycérol comme cryoprotecteur.

Une fois les embryons décongelés et le cryoprotecteur chassé, il est impératif de pratiquer une nouvelle évaluation en les observant à la loupe binoculaire.

Les résultats obtenus avec l'éthylène-glycol sont: 62.5% d'embryons survivants après 24 heures de culture (17) .

D'autres agents cryoprotecteurs sont utilisés (DMSO (64) , glycérol + solution de sucrose (39) (65)) mais donnent des résultats plus faibles quant au nombre d'embryons survivants.

La conservation des embryons précède l'ultime phase: le transfert proprement dit ou remise en place qui concrétise l'objectif recherché.

1.3. Transfert des embryons

Les embryons sont retirés de l'utérus de la mère pour être réintroduits dans l'utérus d'une femelle receveuse. L'oestrus de la receveuse ne doit pas être décalé de plus de 24 heures par rapport à celui de la donneuse afin que l'environnement physico-chimique diffère le moins possible (60).

La femelle donneuse est préparée comme la donneuse (progestagènes) et reçoit une injection de 500 à 600 UI de PMSG le jour du retrait des éponges. Cette dépose est décalée de 12 heures (13.5 jours) chez les brebis afin de rattraper l'avance prise par les donneuses en ce qui concerne le début des chaleurs (60). Chez les chèvres, le traitement progestagène reste identique chez les receveuses. Le traitement supplémentaire de ces dernières est constitué d'une injection de 100 ug de cloprostenol à J9 (48 heures avant la dépose) et en même temps d'une injection de 200 à 300 UI de PMSG pour les primipares, et de 400 à 500 UI de PMSG pour les autres.

Lorsque les embryons sont frais, il est recommandé de ne pas dépasser un délai de 2 heures avant leur remise en place. Lorsqu'ils ont été congelés, il faut avant leur remise en place évaluer à nouveau leur viabilité (35) .

Torrès et Sevelec (53) montrent que la position du ou des corps jaunes n'a pas d'influence sur le taux de gestation quand un embryon est placé dans chaque corne utérine.

Les embryons sont introduits dans les femelles receveuses par voie chirurgicale ou par laparoscopie selon la même méthode que la collecte.

Il faut remarquer que l'un des facteurs importants garants du succès est le bon état sanitaire des receveuses, leur permettant de surmonter le stress opératoire et de mener à bien la gestation gemellaire qui devrait s'en suivre.

Le diagnostic de gestation peut être réalisé par dosage de la progestérone le 16^e jour chez la brebis et le 21^e jour du cycle chez la chèvre ou à 45 jours par échotomographie (35) .

1.4.Résultats globaux obtenus

Nous ne décrivons plus les facteurs de variation mais seulement les résultats obtenus de manière courante par des équipes possédant une bonne maîtrise de la technique.

Torrès et al (61) établissent une courbe reliant le nombre de corps jaunes comptés et le nombre de naissances d'agneaux auquel on peut s'attendre.

Une expérimentation réalisée sur brebis lacaune donne les résultats suivants:

variables:	quantité:	moyenne:	%
*brebis superovulées:	22		
*corps jaunes comptés:	237	11.2 +/- 1.4	
*embryons récoltés:	204	9.3 +/- 1.4	86
*embryons transférables:	152	6.3 +/- 1.4	74.5
*agneaux nés/143 tranferts:	97		67.8

Ces résultats donnent une moyenne de 4.4 agneaux nés par brebis superovulée sans tenir compte du fait que tous les embryons transférables n'ont pas été utilisés.

Il faut remarquer en outre que la race Lacaune n'est pas prolifique et que les résultats obtenus sont susceptibles d'être améliorés avec une race plus prolifique.

Les techniques s'affinant peu à peu, Vallet et al (63) décrivent des récoltes d'embryons importantes par laparoscopie sans qu'il n'apparaisse de diminution du taux d'ovulation en fonction des traitements de superovulation successifs (moyenne d'embryons récoltés lors du 4^e traitement de superovulation: 12 +/- 6.9).

Après congélation, le nombre d'embryons transférables diminue: 68% (6).

Heyman et al (31) obtiennent un nombre de 42 agneaux nés sur 72 embryons congelés transférés sans évaluation de vitalité après congélation ce qui représente une moyenne de 58%.

Enfin, la technique de transfert pour la femelle receveuse influe également sur les résultats: Mc Kelvey et al (37) obtiennent un taux de réussite de 75% après laparoscopie.

Torrès et al (60) obtiennent après chirurgie un taux de gestation de 76.3% ce qui semble comparable avec la technique de laparoscopie.

Chez la chèvre, des résultats d'équipes australiennes opérant dans un but commercial permettent de faire une évaluation assez objective de l'efficacité de la technique (8),(9):

nombre de chèvres: 336
 nombre d'embryons collectés: 2785 dont 149 dégénérés
 moyenne d'embryons récoltés par animal:
 9.47 (non chirurgical, sans laparoscopie)
 7.34 (non chirurgical, avec laparoscopie)
 11.32 (chirurgical)
 moyenne de collecte / jour de collecte:
 3: 9.85 (chirurgical seulement)
 4: 9.71 (idem)
 5: 10.17
 6: 7.91
 7: 9.15

Après avoir donné les résultats de la collecte, le tableau suivant donne ceux consécutifs au transfert:

Tableau 1: Résultats de transferts d'embryons de chèvre Angora; Bessoudo et al. (9)

No.of E: p/Recip:	Tot. : Transf:	Tot.E : Transf:	Preg. : Recip. :	OFFSPRING PER PARTURITION :				% :E.SURV.
			SINGLE :	TWINS :	TRIP. :	KIDS :		
1	120	120	58	49	9	-	67	56.77
			(48.3%)	(84.4%)	(15.5%)		:[+2 *]:	
2	1371	2742	803	343	454	6	1269	46.48
			(57.8%)	(42.7%)	(56.5%)	(0.7%)	:[+6 *]:	
3	14	42	8	2	5	1	15	35.71
			(57.1%)	(25.0%)	(62.5%)	(12.5%)		
TOTAL	1505	2904	869	394	468	7	1351	46.52
			(57.8%)	(45.3%)	(53.8%)	(0.8%)	[*=Abortion]	

Voici décrites l'ensemble des techniques de transfert d'embryons qui ont pour but initialement de multiplier la descendance de certaines femelles.

N'oublions pas cependant qu'une technique très élaborée telle que la bissection d'embryons permet d'améliorer encore le nombre d'agneaux nés par brebis superovulée.

La transplantation embryonnaire comporte cependant quelques risques secondaires qui ne sont pas négligeables: le transfert avec les embryons d'agents infectieux. Il est absolument nécessaire de contrôler ces risques pour rendre ce mode de reproduction très sûr.

2. ASPECTS SANITAIRES DU TRANSFERT D'EMBRYONS

Les trois moyens de réaliser des échanges de gènes (nationaux ou internationaux) sont: l'animal vivant, le sperme et l'embryon. Ce dernier est sans aucun doute le moyen le plus simple et le plus efficace du point de vue de la génétique.

Il faut cependant le considérer comme une entité à part entière afin que l'échange de gènes réalisé soit également le plus sûr du point de vue sanitaire. En effet, son comportement vis à vis des agents infectieux est totalement différent de celui de la semence d'insémination artificielle.

L'embryon possède un certain nombre de protections envers les agents pathogènes (le corps de la mère, la cavité utérine, la zone pellucide et enfin, la membrane trophoblastique (54)). Il est soumis à deux types de risques: ceux qui se produisent avant la collecte in vivo et ceux dus au transfert et aux opérations qui l'accompagnent: in vitro (54).

Aussi, certains agents bactériens ou viraux sont susceptibles de s'introduire dans l'embryon, de s'adsorber sur sa zone pellucide ou de contaminer le milieu de culture dans lequel il baigne, ceci aussi bien dans la phase pré-collecte que dans la phase in vitro.

Certaines recommandations techniques très précises s'appuyant sur des travaux scientifiques permettent d'éliminer ces risques au point que l'embryon soit actuellement le moyen d'échange de matière vivante le plus sûr.

Chez les petits ruminants, des travaux ont déjà démontré l'absence de transmission du virus de la Blue Tongue (14) sur l'échantillon d'animaux réalisé et les auteurs concluent à un risque minimal de transmission du virus après lavage des embryons.

D'autres travaux concernant les virus CAEV (Complexe Arthrite Encéphalite Virale), Visna-Maedi, Border disease, tremblante, et la bactérie *Brucella ovis* ont été réalisés ou sont en cours. Ces travaux sont rappelés par Wrathall (66) .

Pour remédier aux risques de transmission d'agents infectieux, la réglementation française n'autorise le transfert d'embryons que si la zone pellucide, véritable barrière entre l'embryon et le monde extérieur, est intacte et sans débris cellulaires périphériques, source de contamination résiduelle. Ils doivent en outre être soumis à au moins dix lavages successifs, chacun dans un rapport de dilution égal ou supérieur à 1/100 avec une pipette stérile à chaque opération (48) (54) .

La réglementation internationale définie par le code zoosanitaire de l'O.I.E (Office International des Epizooties) s'inspire des règles de manipulation définies par la société internationale de transfert embryonnaire. Cette réglementation est clairement établie en ce qui concerne les

bovins mais nécessite d'être redéfinie point par point pour les petits ruminants (33) (55) (56) (57) .

Actuellement, les seules mesures prises et les seuls diagnostics de laboratoire effectués sont ceux qui sont dictés par le pays demandeur.

Toutes les mesures nécessaires étant prises, il apparait que le transfert d'embryons est le moyen le plus sûr d'échanges de gènes du point de vue sanitaire (51) , que ce soit d'une étable à l'autre ou d'un continent à l'autre.

Aussi, cette technique permet de contourner l'interdiction d'importation d'animaux vivants en vigueur dans de nombreux pays.

Ce paragraphe a abordé outre l'aspect sanitaire, l'intérêt économique et génétique du transfert d'embryons qui va faire l'objet de la dernière partie.

3.INTERETS DE LA TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE

3.1.Transplantation embryonnaire et génétique

*Amélioration génétique et diffusion

Le premier intérêt, évident pour tout le monde, est l'objectif même de la transplantation embryonnaire: accroître le nombre de produits nés par femelle par unité de temps ou au cours de sa carrière.

L'accroissement du nombre de produits nés est recherché lorsque la femelle considérée présente un ou plusieurs caractères exceptionnels dans sa race (variant génétique extrême d'une race donnée).

La transplantation embryonnaire fait ici le pendant de l'insémination artificielle en augmentant, bien que plus modérément la descendance d'un animal dont les qualités sont reconnues.

La technique utilisée, la superovulation, donne lors de la collecte un nombre d'embryons bien supérieur à ceux que la femelle pourrait mener jusqu'à leur terme et c'est ce qui justifie leur collecte.

La collecte des embryons libère ainsi l'utérus de la mère et permet de sous-traiter la gestation auprès d'autres femelles de qualités génétiques moindres.

Par cette seconde opération, la femelle donneuse se retrouve aussitôt en mesure d'être soumise à un nouveau traitement de superovulation.

Ce premier objectif permet de gérer et d'exploiter au mieux le stock d'ovocytes de l'animal jugé exceptionnel (13), stock qui ne se renouvelle pas au cours de sa vie contrairement aux spermatozoïdes du mâle dont la production est permanente depuis la puberté jusqu'à la mort.

Le second intérêt du transfert d'embryons est plus difficile à percevoir car beaucoup plus difficile à mesurer: l'amélioration génétique. Elle est fonction de plusieurs facteurs reliés par une équation:

- * l'intensité de la sélection (qui s'accroît avec l'augmentation du nombre de bons individus disponibles - cf superovulation - mais qui subit la loi des rendements décroissants).
- * l'exactitude de la sélection (par la définition d'objectifs et la mesure rigoureuse des paramètres retenus).
- * l'héritabilité (il est en effet illusoire de sélectionner un caractère dont l'héritabilité est proche de zéro)
- * l'intervalle entre les générations.

Smith (50) estime que la diminution de l'intervalle entre les générations est le facteur le plus important dans l'efficacité du progrès génétique. Il obtient un taux de changement génétique ou progrès génétique annuel chez les moutons de 2.1% (en % de la moyenne pour le caractère choisi) en reproduction normale (avec sélection) et de 3.4% en utilisant la superovulation et le transfert d'embryons.

Tableau 2: Taux de progrès génétique annuel (en % de la moyenne) possible par la sélection avec reproduction normale ou transfert d'embryons; (Smith (49)).

	CATTLE	SHEEP	PIGS	POULTRY
<u>Growth-efficiency traits</u>				
Normal reproduction	1.4	1.4	2.7	3.2
Embryo transfer	2.6	2.4		
<u>Carcass Lean Percent</u>				
Normal reproduction	0.5	0.9	1.6	2.2
Embryo transfer	1.0	1.6		
<u>Sex-limited Traits</u>				
	Milk Yield	Litter Size	Litter Size	Egg Number
Normal reproduction	1.5	2.1	3.0	2.1
Embryo transfer	2.0	3.4		

Les mêmes expériences ont été faites en ce qui concerne les bovins et semblent encore bien plus probantes.

Smith (61) a défini les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'amélioration génétique chez les moutons. Des taux élevés de récolte d'embryons sur des agnelles de 6 à 8 mois sont requis pour augmenter le progrès génétique.

L'intervalle génétique minimal dépend du caractère considéré et il s'avère qu'il est toujours plus faible en ce qui concerne la transplantation embryonnaire par rapport à la reproduction normale ou au testage de la descendance des mâles.

Elsen et al (23) décrivent l'apport relatif de différentes techniques modernes de reproduction, dont le transfert d'embryons pour l'amélioration génétique. L'apport est en effet intéressant mais le facteur limitant en France semble être avant tout le coût.

*Conservation

Un autre intérêt de la transplantation embryonnaire est la possibilité de la conservation d'une race dont l'effectif diminue, d'une espèce en voie de disparition ou d'une population menacée (16) .

Chicoteau (16) démontre la nécessité de création de banques de sperme et d'embryons de races bovines trypanotolérantes, lesquelles sont peu à peu croisées avec des zébus pour augmenter leur format mais dont les produits en F1 perdent en grande partie la résistance aux infections à trypanosomes.

*Echanges

L'intérêt pratique qui vient à l'esprit en premier lieu est la facilité déconcertante du transport d'un nombre considérable d'embryons d'un continent à l'autre à la vitesse des transports aériens et sans précautions particulières si ce n'est la vérification du niveau d'azote liquide dans le récipient thermostatique avant le départ.

De plus, la transplantation embryonnaire est un moyen d'échange de gènes du point de vue international et le symposium de Montréal de l'I.E.T.S. (International Embryo Transfer Society) fait largement état des échanges mondiaux d'embryons. Aux Etats-Unis, 300 embryons de chèvres et brebis ont été transférés en 1986 (D.C. Kraemer dans le rapport du congrès de l'I.E.T.S., Montreal, 1987). Shelton (47) rapporte les chiffres suivants en ce qui concerne l'Australie: moins de 2000 embryons de brebis par an et de 5000 à 10000 embryons de chèvre.

Il faut remarquer à ce titre qu'elle permet l'introduction (sous forme d'embryons) et la création de l'élevage d'une race pure dans un pays sans qu'aucun adulte de cette race n'y soit présent (9) (47) .

Conjointement à cette introduction, il existe un autre intérêt pratique: l'adaptation des jeunes aux conditions du

milieu dès leur naissance, qui ne serait pas réalisée avec des adultes.

*Recherche

Enfin, la transplantation embryonnaire permet de réaliser des études de génétique pure concernant l'influence du milieu en plaçant des jumeaux obtenus par bissection et transfert dans des conditions différentes. Des transferts interspécifiques peuvent également être réalisés.

Il ressort de l'énumération de ces différents points que la transplantation embryonnaire peut avoir un impact important sur le progrès génétique si elle est pratiquée à grande échelle ou dans des cas particuliers (embryons de race améliorée dans receveuse de race locale). Son impact diminue si elle est utilisée dans un schéma de sélection classique car le progrès génétique observé subit la loi des rendements décroissants.

Néanmoins et dans tous les cas, elle ne peut s'appliquer que dans le cadre d'un programme d'amélioration bien géré avec des objectifs bien définis et suivi d'un contrôle des performances (5) (23) (45) .

3.2. Intérêts économiques de la T.E.

La transplantation embryonnaire présente chez les petits ruminants aussi bien que chez les bovins des intérêts économiques et pratiques importants.

Economiquement, l'importation d'une grande quantité d'animaux serait évidemment beaucoup plus coûteuse et plus longue à réaliser que l'importation d'embryons par voie aérienne (la voie maritime étant le plus souvent employée) ceci sans compter les risques sanitaires encourus.

Outre la facilité et la diminution du coût du transport, le prix de revient de l'embryon est tout à fait concurrentiel par rapport à celui du reproducteur vivant (16) (voir 3.3).

La transplantation embryonnaire assure par ailleurs une telle sécurité du point de vue sanitaire que certains pays ayant jusqu'à présent des attitudes très restrictives vis à vis de l'importation d'animaux vivants (l'Australie) (47) vont sans doute être amenés à modifier leur réglementation et faciliter les échanges. Shelton (47) décrit la situation australienne face aux échanges d'embryons et la volonté de faciliter ce mode d'échange qui n'est réalisé actuellement que pour certaines races ovines (mouton à large queue de Chypre) et caprines (Angora, Cashemere).

Du point de vue des pays détenteurs de races intéressantes, la T.E. pourrait permettre de valoriser leurs produits et surtout d'exporter des animaux sans risques sanitaires. C'est le cas pour de nombreux pays africains où sévissent différentes infections virales empêchant toute

exportation d'animaux vivants. Aussi certaines races ovines ou caprines (chèvre de Maradi, Angora, mouton à large queue, mouton D'man ...) pourraient connaître un nouvel essor et engendrer des relations Sud-Nord comme elles commencent timidement à apparaître (47) (Zimbabwe-Australie; Chypre-Australie).

Aucune publication actuelle ne fait état d'échanges internationaux Sud-Sud en ce qui concerne des embryons.

3.3.Coût de la T.E.

La transplantation embryonnaire est une technique qui nécessite des moyens élaborés et du matériel coûteux. C'est son principal facteur limitant dans l'espèce bovine et plus encore chez les petits ruminants où le recours à la chirurgie ou la possession d'un endoscope s'impose.

Casamitjana et Perrin (13) donnent des coûts estimés pour l'espèce caprine pour la France sans préciser la part relative au matériel consommable, au matériel fixe et à la main d'oeuvre.

Le coût de la technique oscille entre 650 à 950 francs hors taxe par petit né lorsque l'éleveur possède les donneuses. Quand ce dernier doit acheter les embryons, le prix de revient augmente de 800 à 2000 francs selon leur valeur.

Chicoteau (16) exprime en dollars les coûts obtenus dans un pays sous-développé pour l'espèce bovine. Ils seraient évidemment différents pour des petits ruminants mais donnent un ordre de grandeur: 1500 à 2000 \$ US par veau né.

Ce coût paraît excessivement élevé et l'objectif recherché doit justifier une telle dépense.

Thibier (communication personnelle) estime que cette technique n'est pas encore suffisamment éprouvée pour qu'elle puisse être vulgarisée dans les pays en voie de développement tels que les états africains.

Néanmoins, dans certains pays en voie de développement possédant une infrastructure technique et scientifique, il serait intéressant de calculer l'économie réalisée du point de vue financier et le gain de temps de l'amélioration génétique, en vulgarisant la transplantation embryonnaire.

CONCLUSION

Le transfert d'embryons chez les petits ruminants est une technique de reproduction qui n'est encore accessible pour l'instant qu'à des techniciens hautement qualifiés.

Des travaux poursuivis actuellement vont peut-être permettre de simplifier dans le futur sa réalisation en effectuant la collecte par voie cervicale.

En attendant, le principal facteur limitant à son développement (les problèmes techniques étant résolus) reste son prix de revient élevé. Cependant, dans le cadre de grands projets d'amélioration génétique par introduction de races exotiques, elle trouve sa place pour la rapidité du progrès génétique qu'elle procure.

La T.E. est promise à un développement important dans les échanges entre pays développés qui d'une part désirent ne plus prendre aucun risque sanitaire et d'autre part cherchent à diminuer les coûts d'échanges de gènes. Dans cette optique, plusieurs techniques sont explorées afin d'améliorer encore le nombre de produits nés par femelle ou pouvoir choisir leur sexe: bissection d'embryons, sexage des embryons ou du sperme, fécondation in vitro...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ARMSTRONG (D.T.) and EVANS (G.) . Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats . *Theriogenology* , 1983 (19),31-42.
2. ARMSTRONG (D.T.), PFITZNER (A.P.),WARNES (G.M.), and SEAMARK (R.F.). Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *J. Reprod. Fert.*, 1983,(67):403-410.
3. ARMSTRONG (D.T.) PFITZNER (A.P.), WARNES (G.M.), RALPH (M.M), SEAMARK (R.F.).Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *J. Reprod. Fertil.*, 1983,(67):395-401.
4. ARMSTRONG (D.T.), KIEHM (D.J.), WARNES (G.M.) and SEAMARK (R.F.). Corpus Luteum (CL) failure and embryonic loss in superovulated goats. *Theriogenology* 1987, 27, (1): 207.
5. AUREJAC (R.), BIBE (B.), BLANCHEMAIN (A.), BOSCH (G.), CAILLETE (J.), FOUCAULT (Y.), PERRET (G.).Les éléments de réussite d'un schéma d'amélioration génétique en races rustiques ovines. *Journées Rech. ovine et caprine* 1985, (10e): 231-251.
6. BARIL (G.), CASAMITJANA (P.), PERRIN (J.) and VALLET (J.C.) Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats, 4e colloque scientifique de l'Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Lyon, 9-10 septembre 1988, (FRANCE), 67-93.
7. BARRY (D.M.), VAN NICKERK (C.H.), COETZER (W.A.) and ROBERTSON (M.S.). Superovulatory response and time of ovulation in sheep treated with FSH-P or PMSG followed by GnRH or HCG. *Theriogenology*, 1988,29,(1):217.(abstract)
8. BESSOUDO (E.), DAVIES (L.), COONROD (S.), GOMEZ (J.) and KRAEMER (D.C). Non-surgical collection of caprine embryos under commercial quarantine conditions. *Theriogenology*, 1988, 29, (1), 221.
9. BESSOUDO (E.), DAVIES (L.), COONROD (S.) and KRAEMER (D.C.).Commercial embryo transfer in Australian angora goats. *Theriogenology*, 1988, 29, (1): 222.
10. BETTERIDGE (K.J.) and MOORE (N.W.). Superovulation. In:Betteridge K.J., ed. *Embryo transfer in farm animals*. Ottawa: Agriculture Canada, 1977;Monograph,16:37-38.

11. BON DURANT (R.H.). Embryo transfer in sheep and goats. In: Morrow DA, ed. Current Therapy in Theriogenology II. Philadelphia: WB Saunders co, 1986: 63-66.
12. BREBION (P.), LAJOUS (N.), PROCUREUR (R.), and VALLET (J.C) Intrauterine insemination increases fertilization rate and embryo quality in superovulated Lacaune ewes. 4e reunion A.E.T.E. - Lyon , 9-10 septembre 1988: 95.
13. CASAMITJANA (P.), and PERRIN (J.). La transplantation dans l'espèce caprine. Journée de l'A.E.R.A. Paris, 26.01.1989.
14. CHEMINEAU (P.), PROCUREUR (R.), COGNIE (Y.), LEFEVRE (P.C.), LOCATELLI (A.) and CHUPIN (D.). Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue infected goat herd without bluetongue transmission. Theriogenology, 1986, 26 (3), 279-289.
15. CHESNE (P.), COLAS (G.), COGNIE (Y.), GUERIN (Y.) and SEVELLEC (C.). Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. Theriogenology, 1987, 27, (5): 751-757.
16. CHICOTEAU (P.). Current status, advantages and potential applications of embryo transfer in relation to animal production and or species preservation in Africa. Proceedings of the International Embryo Movement Symposium, Montreal, 1987, 41-53.
17. COCERO (M.J.), PROCUREUR (R.), DE LA FUENTE (J.) and CHUPIN (D.). Glycerol or ethylene-glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos .Theriogenology, 1988, 29, (1) 238.
18. COGNIE (Y.) CHUPIN (D.), SAUMANDE (J.). Comparison of 2 FSH treatment schedules to induce superovulation in ewes. Congress Int. Embryo Transfer Society, Montreal, January 1985
19. COGNIE (Y.), MARIANA (J.C), THIMONNIER (J.). Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non à une injection de PMSG Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys, 1970, 10, 15-24.
20. COGNIE (Y.), CHUPIN (D.), and SAUMANDE (J.). The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. Theriogenology, 1986, 25, (1), 148.
21. COONROD (S.A.), BAUEN (M.J.), KRAEMER (D.C.). Nonsurgical Collection of ovine embryos. Proc. 5TH. annu. Conv. Am. Embryo trans. Assoc. Fortworth, Texas 1986: 83-37.
22. DUPLAN (J.M.). Journée de A.E.R.A. Paris; 26 janvier 1986.

23. ELSEN (J.M.), BODIN (L.), BIBE (B.), POIVEY (J.P.), TCHAMITCHIAN (L.). Utilisation des techniques modernes de reproduction pour l'amélioration génétique. Journées rech. ovine et caprine, 1984, (9e) 361-398.
24. EVANS (G.) and ARMSTRONG (D.T.). Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. J. Reprod. Fert. 1984, 70, 47-53.
25. FOURNIER-DELPECH (S.), COLAS (G.), COUROT (M.), ORTAVANT (R.) BRICE (G.). Epididymal sperm maturation in the ram; motility fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys, 1979, 19, 597-605.
26. FOURNIER-DELPECH (S.), COLAS (G.) and COUROT (M.). Observations sur les premiers clivages des oeufs intra-tubaires de brebis après fécondation avec des spermatozoïdes épидидymaires ou éjaculés. C.R. Acad. Sci. Paris, 1981, 292:(Série III, 515-517).
27. HAWK (H.W.), CONLEY (H.H.). Altered motility of myometrium from estrous ewes after the regulation of estrus with prostaglandin. Theriogenology, 1974, 2, 27.
28. HAWK (H.W.), COOPER (B.S.), PURSEL (V.G.). Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestagen. J. Anim. Sci. 1981, 52, 601-610.
29. HAWK (H.W.) COOPER (B.S.) and CONLEY (H.H.). Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. Theriogenology, 1987, 28, (2): 139-153.
30. HEPBURN (J.). Successful embryo transfer in angora goats 3^e colloque scientifique de l'Association Européenne de Transfert embryonnaire, Lyon (FRANCE) 4, 5 Septembre 1987
31. HEYMAN (Y.), VINCENT (C.), GARNIER (V.), COGNIE (Y.). Transfer of frozen - thawed embryos in sheep. Veterinary Record (1987) 120, 83-85.
32. HUNTER (G.L.), ADAMS (C.E.) ROWSON (L.E.A.). Interbreed ovum transfer in sheep. J. Agric. Sci. 1955, 46, 143-149.
33. JANSSEN (J.). Weighing the scientific evidence for the health status of embryos against the safety of national herds when formulating health certificate requirements for embryos for international movement. Proceedings of the International Embryo Movement. Symposium Montreal 1987, 164-170.

34. JIANG (S.), ZHU (Y.), ZHU (C.). Morphology of 6-, 7- and 8-DAY embryos from superovulated sheep. *Theriogenology*, 1988, 29, (1):306.
35. MARTINEZ (A.L.), NIBART (M.), HUMBLLOT (P.) et THIBIER (M.) Production et congélation d'embryons chez la brebis. *Elevage et insémination*, 1985, 208, 7-16.
36. McKELVEY (W.A.C.) ROBINSON (J.J.) AITKEN (R.P.) and ROBERTSON (I.S.). Recovery of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*, 1986, 25, (6):855-864.
37. McKELVEY (W.A.C.), ROBINSON (J.J.) and AITKEN (R.P.). A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy. *Veterinary record*, 1985, 9, 492-494.
38. MENEZO (Y.). Milieu synthétique pour la survie et la maturation des gamètes et pour la culture de l'oeuf fécondé. *C.R. Acad. Sci.*, Paris 1976, 282: 1967-1970.
39. MERRY (D.A.), BONDIOLI (K.R.), ALLEN (R.L.), WRIGTH (R.W) One-step sucrose dilution of frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology*, 1984, 22, (4):433.
40. MOORE (N.W.) and EPPLESTON (J.). Embryo transfer in the angora goat. Department of animal husbandry, University of Sydney, Camden, N.S.W. 2570, 1979, 30.
41. MOORE (N.W.). Technique and advances in the recovery, storage and transfer of embryo in the goat. *Proceed. IVTH. Intern. Conf. on goats. Brasilia, march 9-13, (BRASIL) 1987, 1:587-589.*
42. NEMEC (L.A.), LOSKUTOFF (N.M.), LASLEY (B.L.), FIELDS (M.J), BOWEN (M.J.), and KRAEMER (D.C.). The influence of relaxin, with steroid pretreatment, on cervical dilatation in ovariectomized ewes. *Theriogenology*, 1986, 29, (1):282.
43. NUTI (L.C.), MINHAS (B.S.), BAKER (W.C.), CAPEHART (J.S.) and MARRACK (P.). Superovulation and recovery of zygotes from Nubian and Alpine dairy goats. *Theriogenology*, 1987, 28, (4):481-488.
44. RICKORDS (L.F.) and WHITE (K.L.). Dinoprostone induced cervical dilatation in the ewe. *Theriogenology*, 1988, 29, (1): 296.
45. RICORDEAU (G.), BOUILLON (J.), SANCHEZ (F.), MOCQUOT (J.C.) et LAJOUS (A.). Amélioration génétique des caprins: facteurs favorisant ou limitant le progrès génétique. *Journées Rech. Ovine et Caprine (5e)*, 1979, 403-426.
46. SCHIEWE (M.C.), BUSH (M.), STUART (L.S.) and WILDT (D.E.) Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a prelimi-

- nary study. *Theriogenology*, 1984, 22, (6): 675-682.
47. SHELTON (J.N.). Current status, advantages and potential applications of embryo transfer in relation to animal production and or species preservation in Australia. Proceedings of the International Embryo Movement. Symposium, Montreal, 1987: 41-53.
 48. SINGH (E.L.). Maximizing the health status of embryos for international movement. Proceedings of the International Embryo Movement. Symposium, Montreal, 1987:134-141.
 49. SMITH (C.). Use of embryo transfer in genetic improvement of sheep. *Anim. Prod.*, 1986, 42: 81-88.
 50. SMITH (C.). Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 1988, 29,(1): 203-211.
 51. STRINGFELLOW (D.A.) and WRIGHT (J.C.). Viewing the scientific evidence for international movement. Proceedings of the International Embryo Movement. Symposium, Montreal, 1987: 134-141.
 52. TERVIT (H.R.), GOOLD (P.G.), MC KENZIE (R.D.) and CLARKSON (D.), Techniques and success of embryo transfer in angora goats. *N.Z.J.*, 1983:31-67.
 53. TORRES (S.) and SEVELLEC (C.). The development of sheep when two are transferred into only one uterine horn or into each uterine horn. *Reprod. Nutr. Dévelop.* , 1987,27, (5):941-944.
 54. THIBIER (M.). Journée de l' A.E.R.A. Paris,26 janvier 1989
 55. THIBIER (M.). Embryo transfer in farm animals. Comprehensive report to the 13th conference of the O.I.E. Regional commission for Europe. Madrid, 27-30 sept. 1988, 3-36. O.I.E. (Paris).
 56. THIBIER (M.). Artificial insemination and embryo transfer: health control of breeding animals. *Bull. Elevage Français* 1988, supp.22:1-17.
 57. THIBIER (M.) and NIBART (M.). Health surveillance of imported embryos transfer in France . *Rev.Sci.techn. of. Intern. Epiz.*, 1985, 4: 895-905.
 58. THIBIER (M.) and NIBART (M.). Disease control and embryo importations . *Theriogenology*, 1987,27,(1):37-47.
 59. TORRES (S.) and SEVELLEC (C.). Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod. Nutr. Develop.* 1987,27: 859-863.

60. TORRES (S.), COGNIE (Y.), COLAS (G.). Transfert des embryons chez les ovins. Journée Rech. Ovine et Caprine (9e) 1984: 215-239.
61. TORRES (S.), COGNIE (Y.), COLAS (G.). Transfer of super-ovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. Theriogenology, 1987, 27: 407-419.
62. TROUNSON (A.O.) and MOORE (N.W.). Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination Aust. J. Biol. Sci. 1974, 27: 301-4
63. VALLET (J.C.), BARIL (G.), ROUGER (F.), CHUPIN (D.) PROCUREUR (R.) CORTEEL (J.M.). Feasability and repeatability of embryos recoveries from dairy goats under laparoscopy. 3e colloque A.E.T.E., Lyon, sept. 1987:425.
64. WILLADSEN (S.M.) POLGE (C.), ROWSON (L.E.A.), and MOOR (R.M.). Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert. 1976, 46: 151-154.
65. WARE (C.B.) and BOLAND (M.P.). Effect of varying glycerol and sucrose concentration combinations on embryo survival rate in a one-step cryoprotection removal from frozen-thawed ovine embryos. Theriogenology, 1987, 27:5.
66. WRATHALL (A.E.). Research on pathogens of importance in sheep and goats. Proceedings of the International Embryo Movement. Symposium, Montreal, 1987:123-125.