

**SESSION BIOTECHNOLOGIE -
AMELIORATION GENETIQUE**

AMELIORATION GENETIQUE : BILAN ET PERSPECTIVES DANS LES PAYS DU SUD

TAWAH C.L. ET D.A. MBAH

Instituts de Recherches Zootechniques, Wakwa, B.P. 65, Ngaoundéré, Cameroun

1. INTRODUCTION

Les pays du Sud disposent de 70% du cheptel bovin et de buffles du monde mais ne produisent que 29% de la viande et 23% du lait (Jahnke, 1988). Ils ont également 64% du cheptel ovin et caprin mais ne produisent qu'en moyenne 54% de viande (Hoste, 1987 cité par Jahnke, 1988). Bien que le bétail joue un rôle primordial dans l'économie agricole de la plupart des pays africains comme source de protéines et de capitaux et fait partie intégrante de leur vie socio-culturelle (Adu et Lakpini, 1989), sa productivité en viande bovine et de petits ruminants est estimée à 15 et 4,6 kg/tête/an par rapport à 79 à 6,5 kg/tête/an, respectivement, pour les pays du Nord (Hoste, 1987 cité par Jahnke, 1988). La productivité laitière est beaucoup plus faible dans les pays du Sud et est estimée à environ 90 litres/tête/an par rapport à 900 litres/tête/an dans les pays du nord (Tacher, 1982 cité par Jahnke, 1988). D'où l'importation massive des produits laitiers en Afrique (Mbogoh, 1984 ; Seyoum, 1989) pour combler le déficit entre la forte demande et l'offre.

Cette faible productivité laitière et bouchure en Afrique tropicale malgré son cheptel pléthorique est attribuable aux faibles taux de fécondité des femelles (44-66%), aux mortalités accentuées des jeunes (10-40%) et à l'âge trop avancé de la première mise-bas (4-5 ans) des races locales (Lhoste, 1968 ; Carew et al. 1986; IRZ/GTZ, 1989 ; Tawah et Mbah, 1989). En raison de sa diversité écologique, l'Afrique tropicale présente de nombreuses races bovines, ovines et caprines indigènes (Brumby et Trail, 1986) dans des systèmes de production variables dont la productivité ne semble pas en rapport direct avec la croissance démographique galopante et la demande toujours croissante en protéines animales de la région (Ademosun, 1980). Cette situation est accentuée par la dégradation poussée de la zone de pâture (IRZ/GTZ, 1989 ; Seyoum, 1989) et l'infestation persistante de cette zone par la mouche tsé-tsé (IRZ/GTZ, 1989).

L'objectif majeur est de dégager le bilan des efforts d'amélioration génétique du bétail dans la région de l'Afrique tropicale comme un cas de pays du sud et de proposer des stratégies appropriées à mettre en place à l'avenir.

2. L'ENVIRONNEMENT

Le phénotype (la performance) d'un animal étant fonction de son génotype et de son environnement, un schéma de la situation de l'environnement en Afrique tropicale est indispensable, ce milieu écologique étant très variable. L'Afrique tropicale est caractérisée par des zones arides, des hauts plateaux tempérés, des savanes aux grandes herbes et des forêts humides. Cette diversité écologique se reflète au niveau des nombreuses races bovines, ovines et caprines et de la répartition de leurs effectifs (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1 : DISTRIBUTION DES POPULATIONS HUMAINES ET ANIMALES EN AFRIQUE SUBSAHARIENNE SELON LES ZONES ECOLOGIQUES (en millions)

Zone écologique	Superficie (km ²)	Humains	Bovins	Ovins	Caprins
Aride	8,3	24,8	31,6	37,1	48,3
Semi-aride	4,0	65,7	45,4	23,2	33,2
Subhumide	4,8	59,4	32,7	14,2	20,3
Humide	4,1	50,3	8,8	8,2	11,6
Hauts plateaux	1,0	38,0	29,0	24,4	11,9

Source : Jahnke (1987, Cité par Brumby et Trail, 1986)

Tableau 2 : DISTRIBUTION DE BETAIL EN FONCTION DE LA REGION ET DE LA SUPERFICIE

Région d'Afrique	Superficie (km ²)	Bovins ('000)	Ovins ('000)	Caprins ('000)
Afrique du Nord	5,718,710	5,718,3	4,324,6	1,216,0
Afrique de l'Ouest	6,394,342	22,468,6	3,889,0	5,309,6
Afrique Centrale	6,611,256	10,796,8	542,7	903,4
Afrique de l'Est	7,582,439	67,050,9	6,863,7	7,246,5
Afrique Australe	3,830,210	15,124,2	3,515,6	1,130,6
TOTAL	30,129,957	121,158,8	19,135,6	15,806,1
% Total		77,26	12,26	10,12

Source : Adeniji (1989)

La zone aride a une très longue saison sèche, une température estivale dépassant le plus souvent 40°C et une forte variation journalière et saisonnière. Les contraintes majeures pour l'élevage sont donc la chaleur, la distribution et la quantité annuelles d'eau irrégulière et la quasi-absence de pâturage en saison sèche. Les espèces principales rencontrées ici sont les zébus (bovins), les sahéliens (ovins) et les Soudano-désertiques (caprins). La savane a, quant à elle, un pâturage très abondant en saison des pluies mais de faible valeur nutritive en saison sèche (Ingawa et al., 1989 ; Ndikum Moffor et al., 1990). En plus des tiques et des maladies transmises par elles, la dermatose de même que les parasites internes provoquent des pertes énormes dans cet élevage qui est en grande partie traditionnel. Il y a aussi recrudescence des glossines qui

transmettent la trypanosomose dans cette zone s'opposant donc à l'élevage du bétail non-trypanotolérant lorsque leur densité devient forte.

La zone forestière humide présente en permanence les fourrages grossiers et de médiocre qualité. Son atmosphère humide et chaude sans grande variation joue un rôle limitant pour les animaux déjà livrés à une intense agression parasitaire interne et externe. La présence dans cette zone de poches de galeries forestières et des forêts denses favorise l'apparition de la mouche tsé-tsé (glossine), vecteur des trypanosomes. D'où l'existence des taurins de petite taille tels les N'Dama et les bovins à courtes cornes (West African Shorthorn).

3. LES SYSTEMES DE PRODUCTION

L'élevage en Afrique est surtout pratiqué à l'échelle de la petite production de subsistance à prédominance lait dans des exploitations mixtes ou des troupeaux pastoraux. De ce fait, deux mondes principaux d'élevage sont pratiqués en Afrique : un système d'exploitation traditionnel et un système d'exploitation moderne. Le système d'exploitation traditionnel comprend le pastoralisme et l'agro-pastoralisme (Ademosun, 1980 ; IRZ/GTZ, 1989) alors que le ranching fait partie du système d'exploitation dit moderne (tableau 3). Le Tableau 4 montre la prépondérance de l'agro-pastoralisme suivi par le système mixte. Le Tableau 5 indique quelques paramètres de production des systèmes traditionnels et de ranching dans quelques pays de la sous-région. Ceci montre que le système de ranching, quand il est suivi et bien organisé, est supérieur au système traditionnel.

Alors que dans l'agro-pastoralisme le bétail constitue un moyen indirect de production agricole (culture attelée, fumure), se nourrissant des résidus de récolte et demeurant comme garantie de revenus en cas de mauvaises récoltes, le revenu des pastoralistes vient essentiellement de l'exploitation du bétail, des ventes ou des échanges (Adu et Lakpini, 1989). Peters et Thorpe (1989) estiment que la traction animale représente environ 40% de la valeur de la production alimentaire et non-alimentaire brute des bovins devant la viande (35%), le lait (20%) et le fumier (5%). Les systèmes traditionnels de production en Afrique sont généralement caractérisés par une mobilité élevée, un investissement faible (faibles intrants d'élevage), une libre pâture dans des pâturages communaux, une quasi-absence de complémentation en saison sèche, une détérioration poussée des pâturages (effets des feux de brousse et de surpâturage), une mortalité élevée des veaux (17%), un faible taux de vêlage (44%) et des troupeaux de petite taille (62 têtes) (IRZ/GTZ, 1989). La faiblesse de productivité de la plupart des systèmes de production peut être attribuée à la quasi-absence de techniques modernes de gestion, de stocks améliorateurs et d'aliments de bétail, et à l'absence d'institution pour le transfert efficace des technologies nouvelles et d'une éducation informelle adéquate (IRZ/GTZ, 1989).

Tableau 3 : CLASSIFICATION DES SYSTEMES DE PRODUCTION EN AFRIQUE SUBSAHARIENNE

Système	Sous-Système	Type de système	Facteurs de production	Source alimentaire
Traditionnel	Pastoral	Nomadique/semi-sédentaire	Terrain	Pâturage
	Agro-pastoral	Transhumant/sédentaire	Terrain Main-d'oeuvre	Pâturage Résidu de récolte
	Agricole	Sédentaire	Main-d'oeuvre Terrain	Résidu de récolte Résidu Ménager Pâturage
	Urbain	Sédentaire	Main-d'oeuvre	Résidu Ménager Aliments
Moderne	Ranching	Sédentaire	Terrain Capitaux	Pâturage Fourrage
	Feedlot	Sédentaire	Capitaux Main-d'oeuvre	Aliments Fourrage
	Station	Sédentaire	Terrain Main-d'oeuvre Capitaux	Pâturage Fourrage Aliments

Source : Wilson (1986, Cité par Osinowo et Abubakar, 1989).

Tableau 4 : DISTRIBUTION DU BETAIL EN FONCTION DES SYSTEMES DE PRODUCTION

Système de production	Unité de bétail (x 106)	Pourcentage
Ranching	8	6
pastoralisme	29	20
Agro-pastoralisme	74	51
Système mixte	32	23

Source : Brumby et Trail (1986)

Tableau 5 : ETUDE COMPARATIVE DES PARAMETRES DE PRODUCTION DES DEUX SYSTEMES DE PRODUCTION DANS QUELQUES PAYS AFRICAINS

Pays	Race Système	Taux de vèlage (%)	Poids (kg)			
			Naissance	Sevrage	2 ans	4 ans
Mali	Zébu peul soudanais Traditionnel	54	17	55	125	200
	Ranching	77	21	79	220	280
Nigéria	White Fulani Traditionnel	46	20	55	140	240
	Ranching	89	24	96	245	350
Ethiopie	Boran Traditionnel	55	20	55	150	260
	Ranching	78	25	180	265	420
Botswana	Tswana Traditionnel	46	26	120	260	300
	Ranching	74	31	180	360	400

Source : Brumby et Trail (1986)

Pourtant, les races indigènes produisent suffisamment de lait pour nourrir leurs jeunes, sont aptes à parcourir de longues distances à la recherche de l'herbe verte et de l'eau et ont acquis un certain degré de tolérance (résistance) aux facteurs climatiques et aux maladies (Ngere, 1982 ; Mbah, 1982a,b ; Mbah, 1984). Selon de Leeuw et al. (1984), les stratégies de production, en dépit d'efforts de développement destinés à ouvrir le monde pastoral à l'économie marchande, demeurent essentiellement axées sur la satisfaction des besoins de subsistance. par conséquent, les taux d'écoulement continuent à être relativement faibles (ventes d'animaux = 9,3 kg/ha/an, abattage de subsistance = 1,8 kg/ha/an, lait de subsistance = 14,8 kg/ha/an et accroissement du troupeau = 17,6 kg/ha/an). Le Tableau 5 montre quelques paramètres de production animale dans certains systèmes de production de la région. Les résultats montrent une variabilité considérable dans les paramètres de production de certains systèmes de production. Selon Peters et Thrope (1989) les petits exploitants et les pasteurs visent à maximiser le rendement par unité de surface de la terre plutôt que la productivité par tête de bétail. Une solution à court terme devra donc être une meilleure gestion (management) avec une meilleure couverture sanitaire et une meilleure alimentation, alors que les stratégies d'amélioration génétique seront de long haleine en raison de la lenteur de ce processus (Ngere, 1982 ; Mbah, 1989).

Tableau 6 : PARAMETRES COMPARATIFS DE PRODUCTION ANIMALE DANS CERTAINS SYSTEMES DE PRODUCTION

Région/Système	Taux de vêlage (%)	Morta-lités des veaux (%)	Pourcentage de femelles dans les troupeaux		Biomasse animale totale (kg PV/ha)
			Adulte	Total	
Borana (pastoral)	75	10-23	42	66	64-73
Masaï (pastoral)	76	8-10	33-45	68-73	36-89
Mali (transhumant)	56	28	41-42	65-68	-
Adamaoua (pastoral)	43	21	-	-	-
Adamaoua (agropastoral)	42	14	-	-	-
Adamaoua (ranch)	49	12	-	-	-
ranch laikipia (parcours)	52-83	5-24	38	62	63-125
Ranch Abemossa, Ethiopie	70-78	5	38	73	140
Ranch Alice Springs	72-77	5-10	37	59	16*
Ranch Barkley, Tablelands	57	5-10	42	66	13*

^a Calculs fondés sur la superficie pâturée.

Source : Cossins (1985) IRZ/GTZ (1989).

Environ 75% du bétail africain appartient aux petits exploitants qui vivent essentiellement de leurs récoltes et tirent de l'élevage le plus gros de leurs revenus, alors que les 25% restants sont aux pasteurs pour qui l'élevage assure à la fois la subsistance et la source de revenus (Brumby et Gryseels, 1984). Les petits exploitants et les pasteurs ont comme objectif majeur la satisfaction des besoins familiaux (IRZ/GTZ, 1989). La petite exploitation traditionnelle continuera donc à prédominer en Asie comme en Afrique, surtout que les paysans et les pasteurs élèvent leurs animaux pour de multiples raisons : production de lait, de viande et de fumier, force de traction et épargne monétaire (Brumby et Gryseels, 1984). Les principales sources de l'énergie nécessaire pour la production de lait dans le système de gestion traditionnel des pays africains restent les pâturages naturels, les parcours et les prairies, les résidus des cultures et les herbes poussant le long des galeries forestières (Brumby et Gryseels, 1984). En effet, environ 70 à 90% de la population de ruminants en Afrique sont en pâturage et le lait est leur principal produit. Par conséquent, les petits producteurs auront tendance à se regrouper au sein d'associations à caractère coopératif (Brumby et Gryseels, 1984 ; IRZ/GTZ, 1989) comme c'est le cas dans le cadre du projet laitier Camerouno-Canadien à Ngaoundéré et de la coopérative laitière de Bamenda (Bamenda Dairy Cooperative) au Cameroun.

4. QUELQUES RACES EN AFRIQUE

Le principal bétail africain reste les bovins à prédominance de zébus suivi par les ovins et les caprins (Ademosun, 1980 ; Adeniji, 1989 ; IRZ/GTZ, 1989). Les bovins africains fournissent la majeure partie de la viande consommée en Afrique

(Chabeuf, 1967). Les plus importantes races bovines sont classées en trois groupes principaux (Mason et Maule, 1960 et Epstein 1971 cité par Brumby et Trail, 1986) suivants : (a) Les zébus à bosse tels que le zébu Gobra du Sénégal, le zébu Maure de Mauritanie et du Mali, le zébu peul blanc du Niger et du Nigéria, le zébu Bororo du Nigéria, du Cameroun, du Tchad et de la République Centre Africaine (RCA), le zébu Foulbé du Cameroun, du Nigéria et de la RCA, le zébu sahélien du Tchad et du Niger, le zébu malgache, le petit zébu d'Afrique de l'Est, etc. ; (b) les taurins sans bosse des zones à tsé-tsé tels que les bovins hamitiques à longues cornes (Hamitic Longhorn) représentés par la race N'Dama et le bétail à courtes cornes (West African Shortorn) représentés par les races Baoulé, Lagune, Somba, Muturu, Bakosi, Logone, Toupouri (Kouri), Borgou, Namchi (Daoyo) et Kapsiki de l'Afrique de l'Ouest et de l'Afrique Centrale ; et (c) les petits Sanga à bosse cervico-thoracique des savanes du Sud et de l'Est.

En plus, les bovins de races exotiques introduites en Afrique se répartissent en trois grands groupes (Brumby et Trail, 1986) suivants: (1) les zébus d'Asie (Sahiwal, Brahman, Sindhi, etc.) ; (2) les races laitières et bouchères européennes (Montbéliarde, Holstein, etc.) ; et (3) les hybrides zébus-exotiques (zébu, taurin) représentés par les Bonsmara, Santa Gertudis, Wakwa, Rénitelo, etc.

De nombreuses races bovines améliorées ont déjà été introduites en Afrique et à Madagascar (Chabeuf, 1967) comme : (1) les races Tarentaise, Charolaise, Normande et Pie Rouge de l'Est importées en Afrique Occidentale Francophone avant 1958 ; (2) les races Jersey et Rouge des steppes de Yougoslavie introduites au Mali ; (3) les races Alentejana, Salamanquina, Mirandesa, Charolaise, Ayrshire, Jersey, Durham, Schwytz et Hereford introduites dans l'île de Sao Tomé ; (4) les races Frisonne, Normande, Schwytz, Tarentaise, Bretonne, Limousine et Afrikander introduites à Madagascar ; et (5) les races Tarentaise, Charolaise, Limousine, Salers, Angus, Normande, Montbéliarde, Frisonne et Jersey introduites au Cameroun.

L'Afrique compte plus de 22% des petits ruminants répartis dans toutes les zones écologiques (tableau 2). Les races ovines et caprines sont présentées au tableau 7. Ces petits ruminants font partie vitale du système pastoral et agricole en Afrique, car ils sont utilisés pour satisfaire la plupart de besoins familiaux bien qu'ils jouent un rôle secondaire par rapport à l'élevage bovin (IRZ/GTZ, 1989). Les petits ruminants se retrouvent le plus souvent dans des zones exclues de boeuf à cause la présence des parasites tels les glossines. Par conséquent, ils sont soupçonnés d'être trypanotolérants. A cause de leur petite taille, de leur courte période entre génération, de leur potentialité d'utiliser toute qualité d'aliments (résidus agricoles, résidus managers, etc.), de leur faible investissement, les petits ruminants sont bien adaptés pour l'élevage à petite échelle. Malheureusement, la recherche et le développement ont jusqu'à l'heure actuelle abandonné les petits ruminants à eux-mêmes. Les principaux problèmes qui se posent donc à la production de petits ruminants comprennent le faible niveau d'exploitation des troupeaux, le taux de mortalité élevé des chevreaux et des agneaux dû aux programmes sanitaires inappropriés, les services inadéquats

de vulgarisation de l'élevage, et le peu de priorité accordé aux petits ruminants dans les programmes nationaux de recherche et de développement (Adeniji, 1989). Ces obstacles pourront être éliminés progressivement grâce aux programmes de développement national élaborés par les divers gouvernements et les organismes non-gouvernementaux.

Tableau 7 : LES RACES OVINES ET CAPRINES DE L'AFRIQUE

RACES OVINES	ZONES ECOLOGIQUES	RACES CAPRINES	ZONES ECOLOGIQUES
Djallonké	Humide et Sub-Humide	Djallonké	Humide et Sub-humide
Yankassa	Sub-Humide	Maradi (Sokoto Rouge)	Sémi-aride
Ouda	Sub-Humide et Sémi-aride	Sahélien	Aride et Sémi-aride
Balami	Sémi-aride	Nubien	Riveraine
Soudano-désertique	Sémi-aride et Aride		
Macina	Aride et sémi-aride		
Maure noir/blanc	Aride		
Sahélien	Sémi-aride		
Touareg	Sémi-aride et aride		
Torouke	Sémi-aride		
Sardi, Timahdite	Méditerranéenne		
Beni-Guil et Diman	Méditerranéenne		
Maasi-rouge	Sémi-aride		
Mouton à queue grasse de l'Afrique de l'Est	Sémi-aride		
Dorper	Sémi-aride		
Blackhead Persian	Sémi-aride		

Source : Osinowo et Abubakar (1989) Lahlou-Kassi (1985) Kiwuwa (1985)

Des efforts timides au niveau de collecte, d'identification et de caractérisation des races de ruminants en Afrique sont en cours dans certains pays de la région (Ngere, 1985a,b ; Mbah et al. 1988a,b ; Osinowo et Abubakar, 1989 ; Tawah et Mbah, 1989). Apparemment, il existe de grosses lacunes dans les données disponibles sur l'aptitude de la plupart des races locales (Osinowo et Abubakar, 1989). Ces lacunes posent de problèmes sérieux sur le choix des races à améliorer (Buvanendran et Johnson, 1982 ; Mbah, 1989b). Il conviendra donc de faire des études comparatives sur les potentiels génétiques et l'adaptabilité de la plupart des races locales (Vercoe et Frisch, 1982) pour faciliter la prise des décisions appropriées en vue d'amélioration de l'élevage. En plus, l'évaluation des races locales est nécessaire pour la conservation des races (Ansell, 1985) mais cette évaluation doit avoir lieu dans les milieux où ces produits vont évoluer (Tewolde, 1986 ; Mbah, 1989a) pour garantir une amélioration soutenable. Actuellement, l'évaluation des races locales se fait largement aux stations de recherches sous des conditions contrôlables et diverses (Vallerand et Branckaert, 1975 ; Ngere, 1985a,b,c ; Bosch, 1985 ; Deciry, 1986 ; Mbah et al. 1988 a,b ; Tawah et Mbah, 1989).

5. ETAT ACTUEL DE L'AMELIORATION GENETIQUE DU BETAIL EN AFRIQUE

Cette amélioration génétique peut se faire de deux manières :

- répartition dans le troupeau des caractères favorables de certains de ces animaux par la méthode de sélection,
- apport extérieur de caractères favorables par des animaux issus d'autres troupeaux ou des animaux améliorateurs en utilisant la méthode de croisement.

La **SÉLECTION**. En fait, la sélection est pratiquée par les pasteurs (IRZ/GTZ, 1989) mais selon des méthodes qui n'ont rien à envier aux techniques modernes de sélection (Chabeuf, 1967). La sélection est une méthode d'améliorateur génétique plus lente mais en exploitant les animaux déjà adaptés à leur milieu, elle peut permettre un accroissement de productivité à la limite de l'amélioration des conditions de production (pâturage naturel, ressources d'eau, situation sanitaire et technique d'élevage). On peut avoir recours aux croisements lorsque les conditions de production sont améliorées et la sélection a atteint ses limites. Selon McDowell (1980), le progrès génétique de la sélection est très lent, de l'ordre de 0 à 0,25% par an dans des conditions de production animale en Afrique. Même dans des meilleures conditions de production, le progrès génétique est estimé autour de 0,7 à 1,0% par an. la sélection ne peut donc se faire que dans des conditions de production améliorées (Mbah, 1989a). Parce que le progrès génétique diminue en fonction du nombre des caractères impliqués à la sélection ($1/n^u$) (Hazel et Lush, 1942), la recherche devra apporter des éclaircissements sur les poids relatifs aux critères de sélection (traction animale, viande et lait), surtout, comme l'éleveur en Afrique a des objectifs multiples.

La castration de mauvais mâles est une pratique de sélection des mâles jugés aptes à multiplier ses progénitures dans le troupeau. Pour encourager la sélection massale au sein des troupeaux des pasteurs en Afrique, Chabeuf (1967) propose les activités suivantes : (1) la prime aux éleveurs des animaux du type recherché au cours des concours, foires, expositions, etc., comme c'est le cas en Europe et en Amérique du Nord ; (2) le surpaiement temporaire des mauvais produits pour favoriser leur élimination vers la boucherie, car il a été constaté la présence, pendant une enquête de l'élevage en Adamaoua, Cameroun (IRZ/GTZ, 1989), de beaucoup de vieilles vaches dans la quasi-totalité des troupeaux ; et (3) la sélection dans des établissements spécialisés mais dans des conditions du milieu pas différentes des conditions normales de la région. La sélection se fait à présent en station dans certains pays comme le Sénégal pour le Zébu Gobra, le Mali pour le N'dama, le Madagascar pour le zébu malgache et le Cameroun pour le zébu Foulbé.

Selon Timon (1987), la sélection devra être basée sur une définition claire et précise des objectifs, une connaissance des valeurs génétiques (héritabilité, répétabilité, corrélation génétique, etc.) des animaux à sélectionner, une répétition chaque année et chaque génération de la sélection (sélection annuelle) et une exploitation de jeunes animaux afin de maintenir la taille de troupeau, réduire l'intervalle entre générations et maximiser/optimiser le progrès génétique.

le progrès génétique est fonction de l'héritabilité, de la différentielle de sélection et de l'intervalle entre générations.

La détermination des valeurs génétiques sus-mentionnées est contrecarrée par le manque des infrastructures adéquates et des services d'appui efficaces et fonctionnels nécessaires à la collecte et l'analyse des données et la diffusion étendue de technologies nouvelles, et l'absence d'informations sur la généalogie des animaux dans la gestion traditionnelle. En plus, la grande variation phénotypique (30-60%) dans les races locales (Sands et McDowell, 1978, cité par Timon, 1987) demande un troupeau de très grande taille (Peters, 1989) pour une détermination des paramètres génétiques réels. Par exemple, selon Timon (1987), il faut au moins un troupeau de 700 à 1.000 têtes pour avoir une différence significative de l'ordre de 5% (pouvoir de test d'un seul côté étant 80% et variation phénotypique de 35 à 40%).

Le **CROISEMENT**. Le croisement exploite à la fois l'avantage de l'hétérosis chez les produits de croisement et la complémentarité des races impliquées, visant l'amélioration de la performance, soit de la production laitière, soit de la production bouchère, soit les deux à la fois, de troupeau fondateur et par conséquent l'augmentation de revenu des producteurs. Le croisement est une méthode d'amélioration plus rapide que la sélection (McDowell, 1980) mais chère et donc maintenant un planning méticuleux en s'assurant que l'environnement peut supporter les nouveaux génotypes. En Afrique, de très nombreuses races bovines améliorées ont été importées (Chabeuf, 1967 ; Ngere, 1985b) mais ces importations n'avaient pas pris en compte une caractérisation et une sélection préalable des races bovines locales comme c'était le cas au Cameroun (Chabeuf, 1967). Au Nigéria, Ngere (1985b) a constaté que les produits de croisement (F1) entre les "White Fulani" et soit les Frisonnes, soit les Charolaises, soit les Santa Gertrudis avaient un gain moyen quotidien plus élevé et étaient les meilleurs transformateurs. Selon les données disponibles, les métis sont supérieurs aux races indigènes en ce qui concerne le poids à la naissance, le poids au sevrage, le taux de croissance, le rendement carcasse et la performance de reproduction (Lhoste, 1968 ; Bauer, 1973 ; Salazar, 1973 ; Plasse, 1973 ; Ngere, 1985b ; Olayiwole et Adu, 1989, Tawah et Mbah, 1989 ; Tawah et al., 1990), alors que les races locales les emportent sur la performance de l'adaptabilité avec un taux réduit de mortalité et de morbidité dues aux conditions de milieu (Bauer, 1973 ; Salazar, 1973 ; Plasse, 1973 ; Ngere, 1985b ; de Vaccaro, 1990).

Les données sur la production laitière des croisés zébus africains (White Fulani, Red Fulani, Zébu Foulbé) et taurines exotiques (Frisonne, Jersey, Montbéliarde) n'ont pas révélé la présence de l'hétérosis (Ngere, 1985b, Mbah et al., 1988b). Néanmoins, la production laitière augmente progressivement au niveau du sang exotique dans les métis jusqu'à 75% de sang. (Ngere, 1985b : Madalena, 1981). L'augmentation de sang exotique est suivie par une augmentation de taux de mortalité et la diminution de la productivité si la gestion n'est pas intense (Ngere, 1985b ; Mbah et al., 1988b ; Tawah et Mbah, 1989 ; Tawah et al., 1989a).

Dans une revue des rapports sur les croisés laitiers dans les tropiques, Syrstad (1989) a constaté une détérioration dans la performance des métis F1 aux métis F2 et autres produits secondaires dans tous les caractères étudiés. Il a constaté que l'âge au premier vêlage et l'intervalle entre vêlages ont augmenté par 2,3 mois (7%) et 26 j (6%), alors que la production laitière et la durée de lactation ont diminué de 452 kg (24%) et de 12 j (4%), respectivement. Ces pertes ont été attribuées soit à la réduction de l'hétérozygote de 50%, soit à la démolition des effets épistatiques. Par conséquent, les métis laitiers F1 pourront être les meilleurs dans les conditions de production moyennes. Il est impératif qu'une utilisation de croisement tient d'abord compte de la sélection entre des races locales disponibles. Une évaluation préalable des races locales sur la base de la performance et de l'adaptabilité s'impose en même temps qu'un choix des taureaux exotiques sur la base des critères objectifs de production et des conditions socio-économiques et techniques du milieu.

Les résultats de croisement pour la production de viande au Brésil, Costa Rica et au Venezuela (Plasse, 1973), en Argentine (Joandet, 1973), en Bolivie (Bauer, 1973), en Colombie (Salazar, 1973) et au Cameroun (Lhoste, 1968, 1980; Tawah et al. 1991) montrent clairement l'avantage indiscutable des croisés, *Bos indicus* x *Bos taurus*, sur les purs sangs dans les conditions tropicales de l'Amérique Latine et de l'Afrique. Alors que l'hétérosis était plus élevé chez les paramètres de production avant sevrage aux Etats-unis, c'était le cas plutôt après le sevrage chez les métis F1 au Venezuela et en Costa Rica (Plasse, 1973). Un système de production jugé par Plasse (1973) comme n'est pas utile dans les conditions de l'Amérique Latine. L'avantage hétérotique de l'ordre de 12 à 13% chez les Crillo x Néllore (Bauer, 1973) et de 18 à 28% chez les métis Brahman, et de 5 à 41% chez les métis mixtes (Salazar, 1973) a été contesté dans les conditions tropicales. En conclusion, le croisement systématique a tendance à augmenter la production de viande.

Le problème de croisement en Afrique à présent est l'avenir de croisé F1 et le coût de la production et de maintien des produits de croisement. A ce problème, Madalena (1981) propose trois alternances qui sont : (1) : la production des femelles F1 par métissage continu entre les races locales (femelles) et exotiques (taureaux), (2) le croisement rotatif entre les races locales et exotiques et (3) la synthétisation des races nouvelles de troupeau fondateur des croisés. Pour Ansell (1985), utilisation des taureaux F1 paraît être la meilleure alternative pour les petits exploitants.

6. CARACTERISTIQUES ZOOTECHNIQUES DE QUELQUES RACES LOCALES

6.1. Performances des races bovines locales

REPRODUCTION. Les bovins africains ont un faible taux de reproduction car, la plupart atteignent la maturité sexuelle très tard (âge tardif au premier vêlage) et ont un faible taux de vêlage (fécondité) et un long intervalle entre

vêlages (tableaux 8 et 9). Une bonne gestion (management) et alimentation (Kimenye, 1985) et même le croisement entre des races locales et exotiques améliorées (Carew et al., 1986 ; Mbah et al., 1988b ; Tawah et Mbah, 1989) peuvent réduire l'âge au premier vêlage, l'intervalle entre vêlages, la durée de gestation et augmenter la fécondité. Bien que son héritabilité soit faible (Mahadevan, 1966; Olawuni, 1975), la sélection massale peut aussi apporter une amélioration aux paramètres de la reproduction (Tawah et Mbah, 1989).

CROISSANCE ET RENDEMENT CARCASSE. Les zébus locaux ont un poids à la naissance plus lourd que celui des taurins indigènes (tableaux 8 et 9). Les animaux africains ont une croissance plus lente que ceux de l'Europe ou de l'Amérique du Nord. La sélection et le croisement améliorateur entre des races locales et exotiques ont apporté une amélioration considérable à la croissance des races locales (Lhoste, 1968, 1980 ; Tawah et Al., 1991 ; Abassa et al., 1991). L'amélioration des conditions de production a aussi conduit à une augmentation de la croissance de bétail africain (Wheat et Broadhurst, 1968 ; Tawah et Mbah, 1989). Le rendement carcasse de ces animaux, variant entre 52 et 58%, est aussi faible.

PRODUCTION LAITIÈRE. Les bovins africains ont une faible potentialité laitière (tableaux 8 et 9). La production laitière chez ces bovins ne peut être améliorée que par le croisement avec des exotiques laitiers (Olaloku, 1974 ; Olayiwole, 1974 ; Touchberry, 1974 ; Mbah et al., 1988b ; Tawah et Mbah, 1989) car la sélection n'a pas réussi à apporter des gènes favorables à la production de lait dans cette population (Mahadevan, 1965, Olaloku, 1974).

Tableau 8 : LES CARACTERISTIQUES ZOOTECHNIQUES DES PRINCIPALES RACES BOVINES TRYPANOTOLERANTES (taurines)

RACES	N'Dama	Baoulé	Lagune	Muturu	Somba	Borgou	Ketekun	Kouri	Kapaiki
CARACTERES									
REPRODUCTION									
Age au premier vêlage/mois	36	26	24-48	36	36	-	38-47	40	28-50
Fécondité/%	85	85	35-66	66	66	55-87	-	-	84
Intervalle entre vêlages]	363-420	420	365-730	350-540	540	-	578	445	440
PRODUCTION LAITIÈRE									
Production/lactation/kg	600	310	-	-	-	-	-	1250	-
Durée de lactation (j)	206	120	-	-	-	-	-	290	-
CROISSANCE									
Poids à la naissance (kg)	17-48	12	10-11	-	-	-	18-17	24	-
Poids à 12 mois (kg)	121-130	93-96	-	-	-	-	-	-	-
Poids à 24 mois (kg)	191-227	145-162	-	-	-	-	-	-	-
Poids à 36 mois (kg)	260-311	166-213	-	-	-	-	-	-	-
QUALITES BOUCHERES (après engraissement)									
Age (ans)	3-4	- 3	-	-	-	-	-	-	-
Poids carcasses (kg)	>200	- 135	-	-	-	-	-	-	-
Rendement carcasses/(%)	55-58	- 65	-	-	-	-	-	-	-
Trypanotolérance	bonne	bonne	bonne	bonne	bonne	Atténuée	-	-	-

Sources : Adeniji, 1985 ; Coulomb, 1980 ; Tawah et Mbah 1989.

Tableau 9 : LES CARACTERISTIQUES ZOOTECHNIQUES DES PRINCIPALES RACES BOVINES ZEBUS

RACES	Goudali	Wakwa*	Akou (White Fulani)	Djafoun (Red Fulani)	Kenana	Boran	Twana	Butana
CARACTERES								
REPRODUCTION								
Age au premier vêlage (mois)	48-63	-	24-48	36	36	-	36-47	40
Fécondité (%)	54-67	58	36-66	66	66	55-57	-	-
Intervalle entre vêlages (j)	511-636	-	365-730	350-540	540	-	578	445
Durée de gestation (j)	290-299	293	-	-	-	-	-	-
Taux de sevrage (%)	49	48	-	-	-	-	-	-
QUALITE LAITIERE								
production/lactation (kg)	344-1629	-	627-1034	341	1381-1726	866-1088	127	1408
Durée de lactation (j)	140	-	176-246	114	244-273	199-234	210	283
CROISSANCE								
Poids à la naissance (kg)	24	26	23	24	23	23-26	32	24
Poids à 6 mois (kg)	140	151	-	-	-	-	-	-

* Race synthétique entre le zébu Foulbé et le zébu Brahman Américain

Sources : Tawah et Mbah, 1989 ; Lethola, 1985 ; Ngere, 1985a, b ; Kimenyi, 1985 ; Osman, 1985.

6.2 Performance de races ovines et caprines locales

Les petits ruminants ont longtemps été abandonnés à eux-même par les institutions de recherches et de développement. par conséquent, les informations sont vagues sur beaucoup de leurs paramètres zootechniques

REPRODUCTION. Les paramètres de reproduction (âge à la première mise-bas, taux de mise-bas, taille de portée, taux de sevrage, intervalle entre les mise-bas, etc) sont présentés aux tableaux 10 et 11. Ces paramètres montrent que le taux de reproduction chez les petits ruminants africains sont faibles (âge tardif à la première mise-bas, une faible taille de portée, un long intervalle entre mises-bas). Néanmoins, certains ovins africains comme le Djallonké, le Kirdi (Massa) et le Peul sahélien du Nord Cameroun ont une fécondité comparable aux races européennes (Deciry, 1986).

CROISSANCE ET RENDEMENT CARCASSE. Ces paramètres de production sont présentés aux tableaux 10 et 11 pour les ovins et caprins africains. Ces animaux ont une croissance faible par rapport aux petits ruminants exotiques. Ceci est peut-être dû au fait que la plupart des petits ruminants sont élevés traditionnellement (Ademosun, 1989). Selon Mbah (1989b), très peu d'études ont été faites sur la croissance de plus d'une race. Mbah (1989b) précise aussi que l'héritabilité et la répétabilité des poids vifs à divers âges et des corrélations génétiques entre les poids à la naissance et à 4 mois, et entre les poids à 4 et à 6 mois sont moyens mais associées à d'énormes erreurs-types. L'auteur propose la poursuite des études sur les facteurs génétiques et non-génétiques affectant la croissance et l'évaluation des paramètres génétiques nécessaire pour l'amélioration génétique.

PRODUCTION LAITIERE. Très peu d'informations sont disponibles sur ces caractères (tableaux 10 et 11). Néanmoins, les données sur la production

laitière des petits ruminants montrent la faiblesse des petits ruminants africains vis-à-vis de la production de lait. La plupart de ces animaux ne sont pas des laitiers. Par conséquent, l'élevage de petits ruminants laitiers devra aussi passer par le croisement entre les races locales et exotiques.

En conclusion, ce bref aperçu sur les caractéristiques zootechniques du bétail africain montre effectivement que d'énormes lacunes existent sur la disponibilité d'informations fiables sur les paramètres zootechniques. Ceci implique la nécessité d'études approfondies sur les facteurs génétiques et non-génétiques influant sur ces paramètres zootechniques en station et en milieu réel et l'évaluation des paramètres génétiques (héritabilité, répétabilité, corrélations génétiques, etc.). Ces informations sont nécessaires pour la programmation de stratégies appropriées d'amélioration génétique. Des études comparatives d'au moins deux races dans les mêmes conditions sont nécessaires pour faciliter le choix de(s) race(s) à promouvoir.

Tableau 10 : PERFORMANCES DES QUELQUES RACES OVINES DE L'AFRIQUE TROPICALE

PARAMETRES	RACES OVINES							
	Djallonké	Korh	Sabéïou	Yankasa	Ouda	Balami	Sudano-désertique	Marna
REPRODUCTION								
Age à la première mise-bas (j)	366-638	338	360-540	-	390	-	606	600
Taux de mise-bas (%)	65-89	-	-	96-110	106	129	73-88	-
Taille de portée	1,01-1,50	-	-	1,23-1,46	1,27-1,31	1,22	1,12-1,19	1,08-1,35
Taux de coverage (%)	66-89	-	-	63-79	68	63	66-61	-
Intervalle entre mises-bas (j)	180-322	207	180-270	196-278	270-300	279	264	215
Prolificté (%)	117-227	147	126-161	-	106-110	-	-	-
Fecundité (%)	329	294	166-230	-	-	-	-	-
Fertilité (%)	96-97	95	100-132	-	-	-	-	-
Durée de gestation (j)	147-157	-	-	151	-	-	150	-
CROISSANCE								
Poids à la naissance (kg)	1,0-2,2	1,9	2,8-3,1	2,6-3,1	3,1-3,2	3,1-3,6	3,4-3,6	2,7
Poids à 3 mois (kg)	6,4-9,9	-	-	8,6-10,9	16,9	20,1	-	-
Poids à 1 an (kg)	18,0-19,7	-	-	27,9	29,9	29,9	-	-
Rendement carcasse	42,5-46,8	-	49,7	45,1-47,9	49,9	47,7	42	-
PRODUCTION LAITIERE								
Production/lactation (kg)	30-86,4	-	-	29,3	-	-	-	-
Durée de lactation (j)	70-112	-	-	84	-	-	-	-

Sources : Deciry (1986) ; Mbah et al. (1988a) ; Bosch (1985) ; Osinowo et Abubakar (1989) ; Vallerand et Branckaert (1975) ; Olayiwole et Adu (1989) ; Ngere (1985c) ; Dawa et al. (1989)

Tableau 11 : PERFORMANCES DES QUELQUES RACES CAPRINES DE L'AFRIQUE TROPICALE

PARAMETRES	RACES CAPRINES			
	Djallonké	Maradi	Sahélien	Nubian
REPRODUCTION				
Age à la première mise-bas (j)	456-549	416-435	-	-
Taille de portée	0,9-1,83	1,28-1,45	1,57	1,4
Taux de sevrage (%)	61-75	-	-	-
Intervalle entre mises-bas (j)	193-283	222	238	228
CROISSANCE				
Poids à la naissance (kg)	1,1-1,6	1,5-1,6	-	2,2
Poids à 3 mois (kg)	4,1-8,4	6,0	-	9,0
Poids à 1 an (kg)	9,5-14,3	-	-	-
Rendement carcasse	34-66	-	45,8	-
PRODUCTION LAITIERE				
production/lactation (kg)	35	45,8-75	-	65-74
Durée de lactation (j)	126	84-100	-	141

Sources : Osinowo et Abubakar (1989) ; Dawa et al. (1989) ; Ngere (1985c).

6.3 Perspectives d'avenir

L'améliorateur génétique doit être axée sur les caractères de reproduction, de croissance et de production laitière, car les races locales sont déjà bien adaptées aux conditions de production. Une amélioration génétique requiert une amélioration simultanée des conditions de production (pâturage naturel, circuit de commercialisation, système de vulgarisation, technique d'élevage, situation sanitaire, ressources d'eau, etc.). Cette amélioration doit être faite selon les systèmes et les conditions technico-socio-économiques de production.

Des études sur les races locales doivent se faire en station et en milieu réel à base d'un schéma multidisciplinaire (l'approche des systèmes pastoraux) pour permettre : (1) une caractérisation des races locales ; (2) une estimation des tendances et paramètres génétiques indispensables à l'amélioration génétique ; (3) une recherche des programmes d'amélioration génétique optimaux et adoptables ; (4) une étude comparative de différentes races locales disponibles afin de faciliter le choix de(s) race(s) à améliorer ou à utiliser dans les croisements améliorateurs ; et (5) un développement des programmes d'enregistrement simples et complets des données en station et en milieu réel.

Des études de suivi continu pour mieux caractériser les races locales en milieu réel sont nécessaires. Ce suivi permettra de dégager des contraintes et des potentialités pour l'amélioration de l'élevage. Cette évaluation est un nécessaire préalable pour la phase de sélection massale en milieu réel de(s) race(s) et des individus à retenir pour l'amélioration de la population.

S'agissant de l'amélioration d'une race au niveau national ou régional, plusieurs auteurs (Cunningham, 1979 ; Buvanendran et Johnson, 1982 ; Timon, 1987, Bondoc et al., 1989 ; Osinowo et Abubakar, 1989 ; Mbah et tawah, 1990) ont recommandé l'élaboration d'un programme d'élevage de troupeau fondateur, de troupeau de multiplication et de troupeau de producteur. En bref, un système

de sélection à noyau ouvert pour vaincre les obstacles de sélection au niveau des éleveurs traditionnels. Selon Osinowo et Abubakar (1989), ce programme doit être supporté par un service de vulgarisation efficace pour permettre la réalisation des résultats escomptés. En plus, Timon (1987) et Bradford et al. (1987) proposent deux étapes de sélection en utilisant cette technique qui sont (1) le triage de populations (population screening) au niveau des éleveurs coopérants, basé essentiellement sur des critères très simples et désirables telles que la reproduction et l'adaptabilité (mortalité, morbidité, maladies) et les éleveurs participants encouragés à castrer tous les mauvais mâles, et (2) la sélection intense proprement dite (test sur la descendance et la sélection des taureaux nécessaires pour l'I.A. sont les moyens privilégiés pour le progrès génétique) au niveau du noyau. Par conséquent, ce programme permettra la sélection moderne, l'adoption d'une méthode d'enregistrement compréhensive, la disponibilité en races amélioratrices et en stocks améliorateurs, la création des groupements d'éleveurs à caractère coopératif pour faciliter l'approvisionnement en intrants et la vente des produits d'élevage, et l'application des technologies nouvelles d'amélioration génétique telles que l'insémination artificielle (I.A.) et la superovulation et le transfert embryonnaire (MOET) dans le noyau.

Mais le système à noyau ouvert a aussi ses inconvénients qui sont : (1) la présence de l'effet du génotype et de l'environnement dans le noyau pouvant diminuer l'effet d'amélioration génétique escompté dans les troupeaux participants ; (2) la possibilité d'avoir des animaux médiocres venant des troupeaux de participants pouvant minimiser le progrès génétique escompté ; (3) les besoins en infrastructures et en fonds financiers pour l'approvisionnement en matériels d'élevage (terrain, corral, bascule, etc.) ; et (4) la possibilité d'une faible pression de sélection due à la taille de troupeau qui elle-même varie en fonction du terrain, de l'infrastructure d'élevage et du nombre d'animaux disponibles.

L'amélioration génétique de la production laitière ne peut se faire qu'avec une méthode combinant les croisements améliorateurs et la sélection. Le croisement se fera entre les races locales, qui sont déjà bien adaptées aux conditions technico-socio-économiques et climatiques du milieu, et les races exotiques laitières (Holstein, Jersey, Montbéliarde, etc.). Les animaux de grand format tels que les Holsteins et les Montbéliardes ont besoin de beaucoup plus d'énergie que ceux de petit format (Jersey) (Brody, 1945 ; St Clair Taylor, 1985). Le choix des races exotiques amélioratrices à utiliser doit donc tenir compte des systèmes de production (Syrstad, 1985). Mbah et al. (1988b) et Osinowo et Abubakar (1989) ont montré que les métis F1 sont beaucoup adaptés mais produisent moins que les métis à sang exotique plus élevé mais ne dépassant pas 75% Le sang exotique à retenir doit être en fonction du niveau technique et des conditions socio-économiques des éleveurs (tawah et al., 1989b). Lhoste (1980) et Tawag et al., (1991) ont montré que le croisement industriel entre les races locales et exotiques est bien possible mais seulement dans des conditions à l'élevage d'économie marchande (feedlot, ranching).

Enfin, pour que l'amélioration génétique ait un effet significatif au niveau de l'économie nationale ou régionale, les gouvernements africains doivent établir

une politique d'élevage précise comme en Europe et en Amérique du Nord. Ceci permettre l'établissement d'un programme d'encadrement des éleveurs, des techniques et des chercheurs, la mise en place des infrastructures nécessaires et opérationnelles, la définition de l'orientation de l'élevage, la définition d'une politique foncière efficace et fonctionnelle et la mise en place d'un système de vulgarisation fiable et des instituts de recherches opérationnels. En plus, les organismes financiers étrangers et locaux sont invités à financer et à appuyer les travaux de recherches visant l'amélioration génétique des races africaines. Pour conclure, les chercheurs africains oeuvrant dans le domaine de l'amélioration génétique de l'élevage sont invités à proposer des mesures concrètes pour une amélioration génétique soutenable et durable en Afrique.

7. BIBLIOGRAPHIE

- ABASSA, P. K., D.A. MBAH, P. ZAMBA, L.C. TAWAH, O. MESSINE ET H. OUMATE. 1991.** Factors affecting Gudali and Wakwa calf weights at birth and weaning on the Adamawa plateau (En cours de préparation).
- ADEMOSUN, A.A. 1980.** Livestock production in the subhumid tropics of West and Central Africa I. The present state of knowledge. *African J. Agr. Sci.* VII (1+2) : 57.
- ADEMOSUN, A.A. 1980.** Discours liminaire : Evolution de la production de petits ruminants au cours des deux dernières décennies et ses perspectives d'avenir en Afrique de l'ouest et en Afrique Centrale. In : Rapport de l'atelier sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Adeniji, K.O. (rédacteur), Ibadan, Nigéria, 21-25 novembre 1988, publié par l'O.U.A., Nairobi, Kenya, pp. 19.
- ADENIJI, K.O. 1989.** Allocution prononcée par un représentant de l'OUA/IBAR sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. In : Rapport de l'atelier sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Adeniji, K.O. (rédacteur), Ibadan, Nigéria, 21-25 novembre 1988, publié par l'O.U.A., Nairobi, Kenya, pp. 43.
- ADENIJI, K.O. 1989.** Review of endangered cattle breeds of Africa. In : *Animal Genetic resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock* OUA/STRC/IBAR Publication, Nairobi, Kenya, pp.20.

- ADU, I.F. et C.A.M. LAKPINI. 1989.** Systèmes d'exploitation de petits ruminants en Afrique et leur amélioration en vue d'accroître la productivité. In : Rapport de l'atelier sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Adeniji, K.O. (rédacteur), Ibadan, Nigéria, 21-25 novembre 1988, publié par l'O.U.A., Nairobi, Kenya, pp. 129.
- ANSELL, R.H. 1985.** Cattle breeding in the tropics. *World Anim. review.* 54 : 30.
- BAUER, B. 1973.** Improving Native cattle by crossing with Zebu. In : Crossbreeding Beef cattle. Series 2. Koger, M., T.J. Cunha and A.C. Warnick (eds.). University of Florida Press, Gainesville. pp. 395.
- BONDOC, O.L., C. SMITH ET J.P. GIBSON. 1989.** A Review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developing countries. *Anim. Breed. Abstr.* 57 (10) : 819.
- BOSCH, F. 1985.** Essais zootechniques en station sur trois races ovines locales du Nord Cameroun. IEMVT, France.
- BRADFORD, G.E., SUBANDRIYO ET L.C. INIGUEZ. 1987.** Breeding strategies for small ruminants in integrated crop-livestock production Systems. In : Small Ruminant Production Systems in South and Southeast Asia. Proceed. Workshop held in Bogor, Indonesia, 6-10 October 1986, Ottawa, Canada. pp. 318.
- BRODY, S. 1945.** Bioenergetics and Growth. Reinhold, New York.
- BRUMBY, P.J. ET G. GRYSEELS. 1984.** Pour un accroissement de la production laitière dans les pays déficitaires d'Afrique et d'Asie. *Bulletin du CIPEA* 19 : 2.
- BRUMBY, P.J. ET J.C.M. TRAIL. 1986.** Les études sur les races et la productivité du bétail en Afrique. *Bulletin du CIPEA* 23 : 24.
- BUVANENDRAN, V. ET A.O. JOHNSON. 1982.** Breeding strategies for improving beef cattle productivity with particular reference to nomadic herds. In *Beef production in Nigeria. proceed. national Conf. beef production.* 27-30 July, Kaduna, Nigeria. pp. 95.
- CAREW, S.F., J. SANDFORD, Y. J. WISSOCQ, J. DURKIN ET J.C.M. TRAIL. 1986.** Productivité de bovins N'Dama à la station de Teko (Sierra Leone) et premiers résultats de croisements avec la race Sahiwal. *Bulletin du CIPEA* 23 : 2.

- CHABEUF, N. 1967.** La race bovine American Brahman au Cameroun et à Madagascar (résultats actuels, perspectives d'avenir). Imprimé Manuscrit, Alfort, France.
- COSSINS, N.J. 1985.** productivité et potentialités des systèmes pastoraux. Bulletin du CIPEA 21 : 11.
- COULOMB, J. 1980.** les races, les modes d'élevage. In : Premier Colloque International : recherches sur l'élevage bovin en zone tropicale humide, Tome II. Bouaké, Côte d'Ivoire, 18-22 avril 1977. pp. 543.
- CUNNINGHAM, E.P. 1979.** The importance of continuous genetic progress in adapted breeds. Report of the FAO Expert Consultation on dairy cattle breeding in the humid tropics. pp.35. FAO, Rome.
- DAWA, O., L.C. TAWAH ET M. TCHENEM. 1989.** Carcass characteristics of West African Dwarf sheep and goats and Sahel/Uda sheep of the subhumid and semiarid zones of cameroon. In : Proceed. First Cameroon Biosciences Conf.,5-9 december, University Centre, Ngaoundere, Cameroon. (In press).
- DECIRY, A. 1986.** Reproduction des ovins de race Massa, Foulbé et Djallonké. principes résultats. rapport Annuel, IRZ Yagoua, Cameroun.
- DE LEEUW, P.N., S. BEKURE ET B.E. GRANDIN. 1984.** Aspects de la productivité de l'élevage dans les ranches collectifs Massai du Kenya. Bulletin du CIPEA 19 : 19.
- DE VACCARO, L.P., 1990.** Survival of European dairy breeds and their crosses with Zebus in the tropics. Anim. Breeds Abstr. 58(6) : 475.
- HAZEL, L.N. ET J.L. LUSH. 1942.** The efficiency of three methods of selection. J. Hered. 39 : 393.
- INGAWA, S.A., G. TARAWALI ET R. VON KAUFMANN. 1989.** Grazing reserves in Nigeria : problems, prospects and policy implications. ALPAN Network paper N°22.ILCA, Addis Abeba, Ethiopia.
- IRZ/GTZ. 1989.** Livestock Farming Systems in Adamawa : Research Report N°1 IRZ Wakwa, Ngaoundere, Cameroon.
- JAHNKE, H.E., G. TACHER, P. KEIL ET D. ROJAT. 1988.** Livestock production in tropical Africa with special reference to the tsetse- affected zone. In : Livestock Production in Tsetse-affected Areas of Africa. Proceed. Meeting of 23-27 november 1987, Nairobi, Kenya. ILCA/ILRAD. pp. 3.

- JOANDET, G.E. 1973.** Crossbreeding in Argentina. In : Crossbreeding Beef Cattle. Series 2. Koger, M., T.J. Cunha and A.C. Warnick (eds.) University of Florida Press, Gainesville pp. 422.
- KIMENYE, D. 1985.** Review of Boran in Kenya. In : Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR. Publication. Nairobi, Kenya, pp. 40.
- KIWUNA, G.H. 1985.** A review of sheep and goats Eastern Africa : In Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR. Publication. Nairobi, Kenya, pp. 122.
- LAHLOU-KASSI, A. 1985.** Review of the Moroccan sheep breeds. In Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR. Publication. Nairobi, Kenya, pp. 103.
- LETHOLA, L.L. 1985.** Review of Tswana breed of cattle : In Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR. Publication. Nairobi, Kenya, pp. 82.
- LHOSTE, PH. 1986.** Comportement saisonnier du bétail zébu Adamaoua Camerounais II. La croissance avant sevrage pour les veaux de race locale et les métis demi-sang Brahman. rev. Elev. Méd. Pays trop. 21(4) : 499.
- LHOSTE, PH. 1980.** L'amélioration génétique des zébus de l'Adamaoua (Cameroun) pour la production de viande. In : Premier Colloque International : recherches sur l'élevage bovin en zone tropicale humide, Tome II. Bouaké, Côte d'Ivoire, 18-22 avril 1977. pp. 761.
- MADALENA, F.E. 1981.** Crossbreeding strategies for dairy cattle in Brazil. World Anim. Review April-June : 23.
- MAHADEVAN, P. 1965.** Dairy cattle breeding in East Africa. East African Agr. Forage Journal. 30 : 320.
- MAHADEVAN, P. 1966.** Breeding for milk production in tropical cattle. Commonwealth Agr. Bureau, Farnham Royal.
- MBAH, D.A. 1982a.** Mortality due to rickettsia, trypanosomiasis, piroplasmiasis and streptothricosis among six genetic groups of cattle at Wakwa. Sci. Tech. Rev. 2 (2-3) : 81.
- MBAH, D.A. 1982b.** Adaptation of dairy cattle to Wakwa (Adamawa) environment. I. Resistance to cattle ticks. Sci. Techn. Rev. 2 (2-3) : 101.

- MBAH, D.A. 1984.** Adaptation of dairy cattle to Wakwa (Adamawa) environment. II. Susceptibility to heat stress. *Sci. Techn. Rev.* 1 (1) : 125.
- MBAH, D.A., A.C. NGO TAMA, D. ABBA, G. RIPPESTEIN ET V.N. TANYA. 1988a.** The effect of season on reproduction and mortality of peul sheep in the Sudano-Guinean zone of Cameroon. In : *Proceed. Third World Congress Sheep and Beef Cattle Breeding, Paris, 19-23 June, Vol. 2* pp. 691.
- MBAH, D.A., J. MBANYA ET O. MESSINE. 1988b.** Performance of Holsteins, Jerseys and their zebu crosses in Cameroon : Preliminary results. *Sci. Tech. Rev.* (In press).
- MBAH, D.A. 1989a.** Genotype-environment interactions in tropical cattle production. *Proceed. First Annual Cameroon Biosciences Conf. 5-9 December, University Centre, Ngaoundere, Adamawa, Cameroon* (In press).
- MBAH, D.A., 1989b.** Les facteurs affectant la croissance des ovins et des caprins en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale : In : *Rapport de l'atelier sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Adeniji, K.O. (rédacteur), Ibadan, Nigéria, 21-25 novembre 1988, publié par l'O.U.A., Nairobi, Kenya, pp. 95.*
- MBAH, D.A., ET C.L. TAWAH. 1990.** Livestock production in subhumid regions of West and Central Africa : Constraints and potentials for genetic improvement. Paper prepared for the West and Central Africa Workshop: Assessment of Animal Agriculture in Africa (Africa Study) organised by Winrock International Institute for Agricultural Development, Washington, D.C., U.S.A. 4-6 December, Abidjan, Côte-d'Ivoire.
- MBAH, D.A., P.K. ABASSA, P. ZAMBA, C.L. TAWAH, O. MESSINE ET H. OUMATE. 1990.** Factors affecting the reproductive performance of zebu cattle in Cameroon. *Proceed. 2nd Biosciences Conf. Nov. 28- Dec. 2, University Centre, Daschang, Cameroon.* (In press).
- MBOGOH, S.G. 1984.** Dairy development and internal dairy marketing in Subsaharian Africa : Performance, policies and options. *ILCA/LPU Working Paper n° 5. ILCA, Addis Abeba, Ethiopia.*
- McDOWELL, R.E. 1980.** Steps necessary in effective planning and evaluation of genetic improvement of tropical livestock. In : *Premier Colloque International : Recherches sur l'élevage bovin en zone tropicale humide, Tome II. Bouaké, Côte-d'Ivoire, 18-22 avril 1977. pp. 811.*

- NDIKUM MOFFOR, F.M., S. YONKEU, C.L. TAWAH, D.A. MBAH ET E.T. PAMO. 1990.** Mineral and crude protein content of natural pastures on Adamawa high lands, Cameroon. (Submitted to Innovation and Discovery).
- NGERE, L.O. 1982.** Beef cattle breeding schemes. In : Beef Production in Nigeria. proceed . National Conf. Beef Production 27-30 July, Kaduna, Nigeria. pp. 81.
- NGERE, L.O. 1985a.** The Gudali cattle of Nigeria-Review. In : Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR Publication, Nairobi, Kenya. pp.77.
- NGERE, L.O. 1985b.** The White Fulani (Bunaji) of Nigeria. In : Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR Publication, Nairobi, Kenya. pp.67.
- NGERE, L.O. 1985c.** The samll ruminants of West Afrcia. A review. In : Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR Publication, Nairobi, Kenya. pp.113.
- OLALOKU, E.A. 1974.** Problems and possibilities for milk production. In : Animal Production in the Tropics. Loosli, J.K. , V.A. Oyanga and G.M. Babaturde (eds). Heinemann Educational Books Ltd, Ibadan, Nigeria, pp.43.
- OLAYIWOLE, M.B. 1974.** Feeding and managment of dairy cows at Shika, Nigeria : In : Animal Production in the Tropics. Loosli, J.K. , V.A. Oyanga and G.M. Babaturde (eds). Heinemann Educational Books Ltd, Ibadan, Nigeria, pp.137.
- OLAYIWOLE, M.B. ET I.F. ADU 1989.** Les activités de recherhces (passées et présentes) relatives à l'élevage des ovins et des caprins au Nigéria. In : Rapport de l'atelier sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Adeniji, K.O. (rédacteur), Ibadan, Nigéria, 21-25 novembre 1988, publié par l'O.U.A., Nairobi, Kenya, pp. 95.
- OLAWUNI, K.A. 1975.** Heritability estimate of age at first calving of White Fulani cows. Department of Aniaml Science, university of Ibadan, Nigeria.

- OSINOWO, O.A. ET B.Y. ABUBAKAR. 1989.** Méthodes d'élevage appropriées pour la production de petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. In : Rapport de l'atelier sur l'amélioration des petits ruminants en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Adeniji, K.O. (rédacteur), Ibadan, Nigéria, 21-25 novembre 1988, publié par l'O.U.A., Naïrobi, Kenya, pp. 95.
- OSMAN, A.H. 1985.** The review of Butana and Kenana breeds. In : In : Animal Genetic Resources in Africa : High Potential and Endangered Livestock. OUA/STRC/IBAR Publication, Naïrobi, Kenya. pp. 33.
- PETERS, K.J. 1989.** Trends in on-farm performance teting of small ruminants in Subsaharan Africa. In : African Small Ruminant Research and Development. Proceed. Conf., 18 - 25 January, Bamenda, Cameroon, pp.439.
- PETERS, K.J. ET W. THORPE, 1989.** Tendances de l'évaluation en milieu réel des performances des bovins et des ovins de l'Afrique subsaharienne. Bulletin du CIPEA. 35 : 14.
- PLASSE, D. 1973.** Crossing Zebu, native and European breeds in Venezuela and others parts of Latin America. In : Crossbreeding Beef Cattle. Series 2. Koger, M., T.J. Cunha and A.C. Warnick (eds.). University of Florida Press, Gainesville. pp. 408.
- REYNOLDS, L. 1986.** Elevage des petits ruminants - Situation actuelle et possibilités de développement par l'amélioration de l'alimentation. Bulletin du CIPEA. 25 : 13.
- SALAZAR, J.J. 1973.** Effects of crossing Brahman and Charolais Bulls on Native breeds in Columbia. In : Crossbreeding Beef Cattle. Series 2. Koger, M., T.J. Cunha and A.C. Warnick (eds.). University of Florida Press, Gainesville. pp. 408.
- SEYOUM, S. 1989.** Consumption of dairy products in West Africa : Past trends and future prospects. APLAN Network Paper n° 23. ILCA, Addis Abeba, Ethiopia.
- SYRSTAD, O. 1985.** Relative merits of various *Bos taurus* dairy breeds crossbreeding with *Bos indicus* cattle. Livestock prod. Sci. 13 : 351.
- SYRSTAD, O. 1989.** Dairy cattle crossbreeding in tropics : Performance secondary crossbreed populations. livestock prod. Sci. 23 : 97.

- AYLOR, ST. C.S., A.J. MOORE, R.B. THIESSEN ET C.M. BABY. 1985.** Efficiency of feed utilisation in traditional and sex-controlled systems of beef production. *Anim. prod.* 40 : 401.
- TAWAH, C.L. ET D.A. MBAH. 1989.** Cattle Breed Evaluation and Improvement in Cameroon : A review of the situation. IRZ Wakwa, Ngaoundere, Cameroon.
- TAWAH, C.L. ET D.A. MBAH., O. MESSINE ET M. ENOH. 1989a.** Factors affecting preweaning growth of *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbred dairy calves semi-artificially reared in Wakwa, Cameroon. First Annual Cameroon Biosciences Conf. 5-9 December, University Centre. Ngaoundere, Cameroon.
- TAWAH C.L., M.B. ENOH, J.T. SALIKI, J.F.B. OTTOU, M.D. ACHU-KWI ET D.A. MBAH. 1989b.** Breeding and Management of Crossbred dairy Cattle in Cameroon. Extension Bulletin Series 1. IRZ Wakwa, Ngaoundere, Cameroon.
- TAWAH, C.L., D.A. MBAH ET PH. LHOSTE. 1991.** Effets génétiques du sang *Bos taurus* sur la croissance avant sevrage chez le bétail zébu de l'Adamaoua, Cameroun. (Soumise aux journées Scientifiques du réseau Biotechnologies Animales à Dakar, Sénégal).
- TEWOLDE, A. 1986.** Evaluation and utilisation of tropical breeds for efficient beef production in the tropics : Callenges and Opportunities. In Third World Congress Genetics Applied to Livestock Production. Vol. IX. Breeding Program for Dairy and Beef Cattle, Water Buffalo, Sheep and Goats, 16-22 July, Lincoln, Nebraska. pp. 283.
- IMON, V.M. 1987.** Genetic selection for improvement of native highly adaptive breeds. in : Fourth Annual Institute on Livestock in Development. heifer project International. 17-22 May.
- TOUCHBERRY, R.W. 1974.** Cattle breeding in the tropics. In : Animal production in the tropics. Loosli, J.K., V.A. Oyanga and G.M. Babaturde (eds.). Heinemann Educational Books Ltd, Ibadan, Nigeria.
- VALLERAND, F ET R. BRANCKAERT. 1975.** La race ovine Djallonké au Cameroun. Potentialités zootechniques, conditions d'élevage, avenir. *Rev. Elev. Méd. Vét. pays trop.* 28(4) : 523.

VERCOE, J.E. ET J.E. FIRSCH. 1982. factors to be considered when design breeding programmes for the tropics and subtropics. In Beef Production in Nigeria. Proceed. National Conf. Beef Production. 27-30 July, Kaduna, Nigeria. pp. 113

WHEAT, J.D. ET J. BROADURST. 1968. An analysis of data on Bunaji cattle at Birnin-Kudu Kabomo, Northern Nigeria, Samaru, Zaria. I. A.R. Samaru Miscellaneous paper n° 25.

BIOTECHNOLOGIES ET ELEVAGE AFRICAIN

DIOP PAPA EL HASSANE

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES (EISMV) B.P. 6077 DAKAR (SENEGAL)

1. INTRODUCTION

L'avènement de la Biotechnologie est souvent décrit comme la seconde révolution scientifique et technologique du 20^è siècle. Le caractère révolutionnaire tient au fait que la plupart de ses nombreuses applications sont en relation avec les besoins essentiels de l'Homme.

C'est ainsi que des Sciences classiques comme la biochimie, la génétique, la physiologie et la pathologie ont acquis de nouvelles techniques, de nouveaux partisans (CUNNINGHAM, 1989).

Ainsi dans les pays développés, nous assistons par le biais de la biotechnologie à une modification très profonde des structures de l'élevage qui riment le plus souvent avec la surproduction alors que dans le tiers monde en général et en Afrique en particulier, l'inadéquation offre et demande en matière de protéine d'origine animale est devenue préoccupante et alarmante (DIOP, 1989). Ce constat que certains verseront dans l'afropessimisme peut-il être modifié ou amélioré par l'introduction des biotechnologies animales ? La réponse à une telle question requiert un certain nombre de préalables à savoir :

- 1) Qu'est-ce que la biotechnologie ?
- 2) Quelles sont ses différentes composantes en production animale ?
- 3) L'Afrique est-elle prête à recevoir et surtout à utiliser cet outil fascinant qui est l'objet de tant de controverses ?
- 4) Qu'est ce que l'élevage africain peut-il attendre de la biotechnologie pour résoudre les nouvelles contraintes qui l'assaillent ?
- 5) Enfin, comment cet élevage doit-il s'y prendre ?

Répondre à ces nombreuses et pertinentes questions n'est point facile, néanmoins, nous allons tenter de le faire en proposant une démarche en quatre étapes :

- La première consiste à définir d'abord cette science passionnante et de faire un bref historique à travers quelques points de repère;
- la deuxième sera plus restreinte en précisant implicitement ce que nous entendons par biotechnologies animales et surtout quels sont leurs domaines d'application ;

- les résultats de l'application de ces techniques face aux nombreuses contraintes de l'élevage africain vont constituer la troisième étape ;
- enfin, nous dégagerons dans la quatrième et dernière étape, des perspectives d'application des biotechnologies en tenant compte d'un certain nombre de réalités de l'élevage africain.

2. DEFINITION - HISTORIQUE DES BIOTECHNOLOGIES

A l'heure actuelle, il existe une multitude de définitions des biotechnologies ; cette multiplicité qui rend cette tâche complexe est en relation avec l'approche multidisciplinaire de la biotechnologie (TURTON, 1989).

Néanmoins, en combinant les définitions de COOMBS (1986), d'AMSTRONG (1988) et de CONNOR (1988), la biotechnologie peut être définie comme une technique biologique qui utilise des organismes vivants ou des substances provenant de ceux-ci, dans le but de fabriquer ou de modifier un produit, améliorant génétiquement les plantes ou les animaux ou développant des microorganismes pour des utilisations spécifiques.

A cela, il faut mentionner une finalité industrielle et commerciale de cette technique (MENAIA et coll.(1987).

Au premier abord une telle définition qui a le mérite d'être large, nous donne l'impression que la biotechnologie est une nouveauté ; mais l'histoire nous enseigne qu'il est classique de distinguer des biotechnologies traditionnelles et des biotechnologies nouvelles. Nous allons faire un bref historique à travers 4 repères que nous empruntons à PABLO BIFANI (1989).

1) - Période pré-pasteur : de l'antiquité à 1865 qui correspond à la biologie descriptive avec une sélection empirique des plantes et des animaux et de la fermentation pour la préservation des aliments ou des boissons (vin, bière, etc.).

2) - Période Pasteur initiée en 1865 : les microorganismes sont alors reconnus comme agents actifs de la fermentation. Ethanol, Butanol, Acétone sont alors produits à travers l'utilisation des bactéries.

3) - La troisième correspond à l'expansion de la pétrochimie qui supprime les processus chimiques basées sur la fermentation. A la même époque la découverte de la pénicilline par FLEMING (1928) permet la production à grande échelle des antibiotiques aux débuts des années 40, ce qui correspond à la seconde guerre mondiale.

4) - La dernière période commence avec la découverte de CRICK et WATSON de la double structure de l'acide Désoxyribonucléique (ADN) en 1956 qui fut suivi par l'immobilisation enzymatique, la découverte de la technique de l'hydridome pour la fabrication d'anticorps monoclonaux dans la première moitié des années 1970. Ce sont là les éléments de base qui ont propulsé les nouvelles technologies au tout début des années 80, qui à l'heure actuelle connaissent une grande expansion de nombreux domaines, industrie alimentaire, médecine, etc.

Les nouvelles biotechnologies regroupent 4 domaines :

- les techniques de culture cellulaire et tissulaire,

- le développement technique associé aux procédés de fermentation,
- les techniques appliquées à la microbiologie pour le dépistage, la sélection et la culture des cellules et microorganismes,
- les techniques pour la manipulation, la modification et le transfert du matériel génétique.

Par conséquent, ces nouvelles biotechnologies se caractérisent par une science très intense, comparativement aux 3 repères précédents.

Qu'entend-on maintenant par biotechnologies animales ?

3. BIOTECHNOLOGIES ANIMALES

Ce concept englobe en fait 2 composantes :

- une composante santé animale avec les moyens de diagnostic et de prévention des maladies animales (DOYLE, 1989 ; CHIGARU et coll., 1989) et,
- une composante productions animales avec l'insémination artificielle, le transfert d'embryon et certaines sciences annexes (THIBIER, 1990, CHPIN, 1992, WOLMUT et coll., 1992).

3.1 Composante santé animale

Dans le domaine de la santé animale, la technique utilisée, qu'elle soit traditionnelle ou moderne, doit permettre de diagnostiquer, de prévenir ou d'éradiquer la maladie, afin de limiter les pertes.

La pathologie au sens large du terme demeure une contrainte majeure dans le domaine des productions animales. Elle est synonyme de baisse de performance, par conséquent baisse de production et de rendement.

En matière de prévention, les vaccins utilisés sont de 2 types (SPRADBROW, 1989) :

- les vaccins classiques bactériens ou viraux à base de souches atténuées ou tuées avec des adjuvants augmentant la réponse immunitaire, c'est l'exemple des vaccins contre la péripneumonie ou la peste bovine ou le tétanos ; les réponses immunitaires sont satisfaisantes dans leur ensemble et les produits sont assez bon marché.

- Les nouveaux vaccins issus des méthodes biotechnologiques nouvelles et qui font surtout appel au génie génétique.

Ils sont produits par des techniques de recombinaisons du DNA (DNA de 2 organismes différents), par des manipulations génétiques des bactéries et des virus et par la synthèse d'antigènes polypeptidiques.

Les espoirs placés très tôt dans ces techniques surtout en matière de sécurité, d'efficacité et de prix abordables ne sont pas complètement satisfaits, eu égard par exemple à la multiplicité antigénique rencontrée chez certaines souches.

A l'heure actuelle, le virus de la vaccine est utilisé comme vecteur de plusieurs vaccins ; exemple vaccin contre la peste bovine, contre la rage. Ces vaccins recombinants ne sont pas sans poser des problèmes ; exemple : la survie

Où la diffusion du virus recombinants dans la nature, les risques pour les populations humaines, en particulier celles provenant des immunodéficiences ou encore des mutations reverses et des recombinaisons ; ce qui fait qu'à l'heure actuelle, des recherches sont orientées vers la production de vaccins protéiques, synthétiques qui suppriment cette possibilité de mutation.

Quant au diagnostic, comme pour les vaccins, le diagnostic peut se faire par les procédés classiques. Les nouvelles biotechnologies ont notablement augmenté l'arsenal du laboratoire de diagnostic avec des tests rapides, exacts et sûrs. Les moyens de diagnostic les plus utilisés sont les sondes nucléiques avec des étiquettes radio-actives qui procurent une meilleure sensibilité aux tests, les anticorps monoclonaux qui permettent de faire des diagnostics précis et répétitifs, de même que de nombreuses techniques d'anticorps marqués surtout avec des enzymes en sérologie.

Mais on reproche à ces nouvelles biotechnologies diagnostiques d'être chères et de nécessiter un équipement relativement sophistiqué.

3.2. Composante production animale

Les techniques utilisées visent à produire des individus possédant un potentiel de production supérieur à celui de leurs parents et dans des conditions de moindre coût (DIOP et SERE, 1989).

La diffusion du gène améliorateur peut se faire soit par des biotechnologies classées en 3 générations : l'insémination artificielle considérée comme biotechnologie classique soit par le biais du transfert d'embryon et les disciplines annexes représentant les nouvelles biotechnologies.

La première génération comprend essentiellement l'insémination artificielle.

L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE (I.A.) permet une utilisation rationnelle dans l'espace et dans le temps des hautes capacités génétiques d'un mâle par le biais de la récolte et de la conservation de son sperme. L'acte se termine par la naissance d'un seul produit (THIBIER, 1990, CHUPIN, 1992a, DEMPFELE, 1992). Signalons pour l'histoire, que cette biotechnologie a été introduite en 1935 en Afrique, au Kenya.

Le TRANSFERT D'EMBRYON (T.E.) est à la femelle ce qu'est l'insémination artificielle au mâle. C'est une biotechnologie relativement récente comparée à l'insémination artificielle. Elle est en pleine évolution.

Il se termine par la naissance d'un minimum de 4 produits (CHICOTEAU, 1987, BREM et KLAUSSLICH, 1989, WOOLCAMS et WILMUT, 1989).

Quelles sont les possibilités et limites de l'I.A. et du T.E. ?

1) - Leur domaine d'application est vaste et intéresse la majorité des espèces domestiques et la faune sauvage.

2) - Ils sont source d'amélioration génétique qui est la conséquence directe de la multiplication du génotype. Ainsi la pression de sélection est augmentée et les intervalles entre générations sont réduits.

3) - Ils permettent la multiplication du génotype recherché ; c'est l'application la plus évidente. Les descendants d'un mâle ou d'une femelle peuvent être multipliés par 100 (T.E.) à plusieurs milliers (I.A.).

4) - Ils facilitent le mouvement du matériel génétique permettant au pays exportateur de maintenir sur place son patrimoine génétique représenté par les animaux sur pied.

5) - Ils diminuent les contraintes liées au transport d'animaux sur pied, tout en apportant une sécurité sanitaire quasi totale grâce à la présence de la zone pellucide.

6) - Ils permettent la conservation des races en voie de disparition dont les caractères peuvent s'avérer intéressants dans l'avenir ou pour d'autres pays.

7) - Ils favorisent la lutte contre certaines formes d'infertilité.

Les SCIENCES ANNEXES ou BIOTECHNOLOGIES de 3^e génération sont constituées par les micromanipulations embryonnaires (CLINE et coll., 1980 ; SINATRA et coll., 1988 ; CUNNINGHAM, 1989 ; PICARD, 1989 ; THIBIER, 1990).

Elles permettent de :

- diviser les embryons le plus souvent en deux, l'un devant servir à des études cytologiques et l'autre serait à transférer ;

- de réaliser le sexage des embryons qui permet de transférer sélectivement des embryons mâles ou femelles. 3 méthodes sont utilisées :

* Le sexage cytogénétique par l'étude du caryotype,

* le sexage immunologique par la mise en évidence de l'antigène H-Y du mâle par l'anticorps H-Y,

* surtout le sexage par la mise en évidence du chromosome spécifique Y pour une sonde d'ADN spécifique. Son taux de succès est de 95%.

- de favoriser les modifications de l'oeuf par introduction d'agents porteurs d'informations génétiques ;

- l'étude des anomalies chromosomiques ;

- le clonage qui aboutit à la formation de jumeaux identiques avec 15 à 20% du succès ;

- les chimères issus d'espèces différents : mouton ou chèvre.

En résumé, on peut dire que les applications possibles des biotechnologies sont nombreuses et variées.

Quelle est la situation de l'Afrique face à ces technologies ?

4. ELEVAGE AFRICAIN ET BIOTECHNOLOGIES

Cette étude nécessite une brève présentation de l'élevage africain avant de faire le point sur l'utilisation des biotechnologies tant en santé qu'en production animale.

4.1 Caractéristique de l'élevage africain

Sur les 30.000.000 km² qui constituent la superficie de l'Afrique, l'élevage est présent à des degrés variables dans les 3.000.000 km² de forêt et 15.000.000 km² de savane-steppe. Dans cette dernière zone 8.000.000 km² sont dépourvus de glossine avec une densité de 17,5 têtes/km², densité encore plus forte dans les zones à hauts plateaux du fait de l'abondance des pâturages ; cependant, elle n'est que de 2,5 têtes/km² dans les 7.000.000 km² restants du fait de l'infestation massive par les glossines. Par conséquent, dans cette zone, toute activité aussi bien humaine qu'animale est fortement entravée.

*** Espèce**

Si d'une manière générale, toutes les espèces sont présentes, sur le plan économique, bovins et petits ruminants occupent une place de choix dans l'exploitation des animaux de rente.

Zébus et taurins représentent les principales races bovines associées à leurs produits de croisements. Signalons que la majorité des taurins vit dans des zones à glossines et se caractérise par leur trypanotolérance.

Chez les petits ruminants, s'il est vrai qu'il existe plusieurs races, la tendance générale est de les distinguer en 2 grands groupes :

- les moutons et chèvres des zones arides et semi-arides,
- les moutons et chèvres des zones semi-arides et humides.

Les produits de croisement de ces deux groupes vivent dans les zones intermédiaires.

A l'instar des races taurines bovines, les petits ruminants des zones semi-arides et humides sont trypanotolérants.

*** Productivité**

Les races africaines, quelles soient bovines, ovines, ou caprines, se caractérisent par des productions faibles en viande (50%) et en lait (1 à 4 l/jour) et des paramètres de la reproduction peu performants ; par exemple chez les bovins en milieu traditionnel, l'âge au 1er vêlage se situe vers 48 à 68 mois et l'intervalle vêlage de 18 à 22 mois alors que de plus en plus la tendance est la recherche d'un veau par an.

Malgré ce manque général de performance, ces races locales sont bien adaptées pour survivre et se reproduire dans leur environnement. La conservation des races pures est souvent compromise pour des raisons socio-économiques (culture attelée par exemple).

* Systèmes de Production

Pour toute espèce confondue, l'élevage est régi par deux systèmes :

- un système dit traditionnel pastoral ou agro-pastoral fournissant 95% des productions, caractérisé par la transhumance, et la thésaurisation, concepts incompatibles avec les objectifs du développement ;
- un système dit moderne réalisé aussi bien dans les stations d'Etat que dans les fermes privées gérées par cette nouvelle race d'éleveurs pour qui, la notion de rendement est le soubassement de toute action.

Quel est l'apport de l'élevage dans la bataille de l'autosuffisance alimentaire en Afrique ?

FITZUGH et coll. (1992) se basant sur les statistiques de la FAO (1990) montre que l'Afrique au Sud du Sahara contient 14% du capital bovin mondial mais ne participe qu'à la production de 5% de viande et 2% de lait à l'échelle planétaire.

Cette production est en inadéquation avec l'essor démographique. En effet une étude prospective de la Banque Mondiale (WORLD BANK, 1990) montre que de 1990 à l'an 2025, la population humaine de l'Afrique au Sud du Sahara passera de 500.000.000 habitants à 1.500.000.000 donc cette population triplera en 35 ans ; durant cette même période, la population citadine passera de

145.000.000 à 700.000.000, on observera alors une multiplication par cinq d'une population urbaine fortement demandeuse.

Les tableaux 1 et 2 empruntées à la FAO (1985) illustrent bien le rapport offre-demande en matière de protéine d'origine animale.

TABLEAU 1. SITUATION DE L'ELEVAGE DES RUMINANTS EN 1984 EN AFRIQUE TROPICALE

RÉGIONS	Population humaine (,000)	Effectifs (,000)		Production Viande		Production lait bovin (,000 t.)	Productivité/tête Viande (kg)		Disponible/habitant kg	
		Bovins	Ovins + caprins	Bovins	Ovins + caprins		Bovins	Ovins + caprins	Viande	Lait
SAHEL	55.510	39.093	76.838	423	279	1.615	10,8	3,6	12,6	29,1
- Pays sahéliens ^(a)	34.565	19.493	43.838	180	137	605	9,2	3,1	9,2	17,5
- Soudan	20.945	19.600	33.000	243	142	1.010	12,4	4,3	18,4	48,2
AUTRES AFR. OUEST	133.118	16.942	51.289	326	217	463	19,2	4,2	4,1	3,5
- Nigéria	41.081	5.142	12.489	101	39	138	19,6	3,1	3,4	3,4
- Autres ^(b)	92.037	11.800	38.800	225	178	325	19,1	4,6	4,4	3,5
AFRIQUE CENTRALE ^(c)	46.900	6.605	6.655	101	30	60	15,3	4,5	2,8	1,3
AFRIQUE DE L'EST ^(d)	117.601	72.909	100.208	863	338	3.077	11,8	3,4	10,2	26,2
AFRIQUE AUSTRALE ^(e)	44.969	16.380	5.440	255	20	587	15,6	3,7	6,1	13,1
AFRIQUE TROPICALE	398.098	151.529	240.430	2.148	884	5.802	14,1	3,7	7,6	14,6
AFRIQUE (TOTAL)	536.870	175.588	339.556	3.028	1.381	10.930	17,2	4,1	8,2	20,4

Source : FAO, 1985

(a) Sénégal, Gambie, Cap-Vert, Mauritanie, Mali, Burkina Faso, Niger, Tchad

(b) Guinée, Guinée Bissau, Sierra Leone, Libéria, Côte-d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin

(c) Cameroun, République Centrafricaine, Gabon, Congo, Zaïre

(d) Burundi, Ethiopie, Kenya, Madagascar, Rwanda, Somalie, Tanzanie, Ouganda

(e) Angola, Botswana, Malawi, Mozambique, Zimbabwe, Zambie

TABLEAU 2. : EVOLUTION DE LA SITUATION DE L'ELEVAGE DES RUMINANTS EN AFRIQUE ENTRE 1974 ET 1984 (EN P. 100)

R E G I O N S	Population humaine	Effectifs		Production viande		Production lait bovin	Productivité/tête viande		Disponible/habitant	
		Bovins	Ovins + caprins	Bovins	Ovins + caprins		Bovins	Ovins + caprins	Viande	Lait
<u>SAHEL</u>	+ 27,5	+ 28,0	+ 28,6	+ 27,8	+ 43,8	+ 22,6	- 0,2	+ 11,9	+ 4,9	- 3,8
- Pays sahéliens (a)	+ 25,4	+ 23,0	+ 25,2	+ 19,2	+ 45,7	+ 26,8	- 3,2	+ 16,3	+ 3,1	+ 1,0
- Soudan	+ 30,8	+ 33,0	+ 33,2	+ 39,0	+ 42,0	+ 20,2	+ 1,4	+ 6,6	+ 5,1	+ 8,0
<u>AUTRES AFRIQUOUEST</u>	+ 34,3	+ 9,5	+ 46,6	+ 21,2	+ 29,9	+ 14,3	+ 10,7	+ 11,4	- 7,3	- 14,9
- Nigéria	+ 30,6	+ 16,9	+ 23,4	+ 20,2	+ 21,9	+ 30,2	+ 2,9	- 1,2	- 7,6	- 0,3
- Autres (b)	+ 36,0	+ 6,6	+ 14,6	+ 21,6	+ 31,8	+ 8,7	+ 14,1	+ 15,0	- 7,4	- 20,0
<u>AFRIQUE CENTRALE</u> (c)	+ 27,8	+ 42,1	- 22,6	+ 17,4	+ 15,4	+ 33,3	- 17,3	+ 49,1	- 8,5	+ 4,3
<u>AFRIQUE DE L'EST</u> (d)	+ 32,6	+ 11,4	+ 15,7	+ 21,2	- 34,2	+ 34,7	+ 8,8	- 43,2	- 26,1	+ 1,6
<u>AFRIQUE AUSTRALE</u> (e)	- 1,5	+ 6,9	- 13,6	+ 4,1	- 4,8	+ 9,3	- 2,6	+ 10,2	+ 5,0	+ 11,0
<u>AFRIQUE TROPICALE</u>	+ 26,9	+ 15,6	+ 17,2	+ 30,7	- 4,1	+ 26,4	+ 13,0	- 18,1	- 6,8	- 0,4
AFRIQUE (TOTAL)	+ 31,0	+ 12,7	+ 13,0	+ 20,2	+ 28,2	+ 21,4	+ 7,1	+ 15,5	- 6,1	- 7,3

Source : FAO, 1985

- (a) Sénégal, Gambie, Cap-Vert, Mauritanie, Mali, Burkina Faso, Niger, Tchad
 (b) Guinée, Guinée Bissau, Sierra Leone, Libéria, Côte-d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin
 (c) Cameroun, République Centrafricaine, Gabon, Congo, Zaïre
 (d) Burundi, Ethiopie, Kenya, Madagascar, Rwanda, Somalie, Tanzanie, Ouganda
 (e) Angola, Botswana, Malawi, Mozambique, Zimbabwe, Zambie

Pour la FAO (1985), en faisant une projection en l'an 2.000 avec un taux de croissance de la population humaine de 4,5%, les productions animales doivent progresser de 4,7% avec une augmentation de 240% des productions de lait et viande entre 1980 et l'an 2.000 ; malheureusement, le taux en vigueur est de 3,6% avec de plus en plus une tendance à la baisse. Mais quels sont les véritables facteurs limitants de l'élevage ?

* Facteurs limitants

Nous allons simplement les citer, ce sont :

- le manque de disponibilité alimentaire,
- le faible potentiel génétique des races,
- les facteurs infectieux, ex. : la trypanosomiase sévissant sur les 7.000.000 km² de savane,
- le mode d'exploitation,
- l'homme par défaut d'alphabétisation.

Quel bilan peut-on faire de l'application des biotechnologies à l'élevage africain ?

4.2. Biotechnologies et santé animale

La santé animale est altérée par la trypanosomose, la répartition de la peste bovine, l'émergence ou la stagnation des affections comme le charbon, la péripneumonie, la peste des petits ruminants, la fièvre de la Vallée du Rift, la Brucellose, la dermatose nodulaire, etc., le tout formant un cortège pathologique fort préoccupant. La forme de lutte demeure essentiellement la vaccination qui, le plus souvent se fait à la demande et autour des foyers. Les vaccins sont le plus souvent fabriqués par les laboratoires nationaux et l'offre est le plus souvent inférieure à la demande (SARR, 1989 ; CHIGARU et coll.).

D'après SARR (1989), les laboratoires produisent 17 types de vaccins viraux et 11 types bactériens, avec principalement des vaccins contre la peste bovine et la péripneumonie. Cependant, l'efficacité des campagnes de vaccinations est souvent compromise par la rupture de la chaîne de froid.

4.3. Biotechnologie et production animale

Elle est résumée par le tableau n°3.

Tableau 3 : Application du Transfert d'Embryon (T.E.) et de l'Insémination Artificielle (I.A.) en Afrique

	I.A.		T.E.	
	E	A	E	A
TANZANIE		+		
SENEGAL		+	+	±
ETHIOPIE		+	+	
GAMBIE	+		+	
GHANA	+			
NIGERIA	+			
ZIMBABWE		+		+
KENYA		+	+	
MAROC		+	+	
TUNISIE		+	+	
ALGERIE		+	+	
EGYPTE		+	+	
RWANDA		+		
BURUNDI		+		
CAMEROUN		+		
COTE D'IVOIRE		+		
BURKINA FASO		+	+	
AFRIQUE DU SUD		+		+

(Source : DIOP, 1993)

E : Utilisation expérimentale - A : Utilisation large

5. PERSPECTIVES

Les perspectives obéissent à un certain nombre de préalables :

5.1. Santé animale

1) La priorité des priorités est de conserver les acquis de la vaccination en systématisant cet acte aussi longtemps que des foyers de maladies existeront.

2) Résoudre l'inadéquation offre-demande en vaccins, en essayant de régionaliser les unités de fabrication tout en renforçant les structures de contrôle. Rien ne sert de se réfugier derrière un nationalisme puéril avec des moyens de fonctionnement ridicules.

3) Améliorer la rapidité des moyens d'intervention pour éviter la rupture de la chaîne de froid nuisible à l'efficacité et à la survie des vaccins.

5.2. En production animale

- Les actions majeurs doivent conduire à une amélioration quantitative d'abord puis qualitative du disponible alimentaire et il en est de même pour l'abreuvement.

- la notion de rendement doit demeurer une préoccupation majeure de l'éleveur traditionnel, ce qui amène à supprimer le concept de thésaurisation d'où une action renforcée de l'alphabétisation. Ces préalables étant acquis, l'essor des biotechnologies animales en Afrique reposera d'abord sur la formation.

La FORMATION vise à pallier l'insuffisance de personnel qualifié pour l'utilisation des biotechnologies. A notre avis, elle constitue le premier maillon de la chaîne. Une formation de type régionale est nécessaire pour éviter la dispersion des maigres ressources dont dispose le Continent africain. Ainsi la coopération internationale jouera un rôle essentiel dans le domaine du transfert de technologie qui une fois de plus doit s'adapter aux réalités nationales. L'exemple a été donné par le Séminaire de formation en transfert d'embryon organisé dans le cadre de la Francophonie par l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar, en collaboration avec la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal en mai 1989. Il a regroupé 15 pays africains. Un second volet beaucoup plus poussé a consisté dans une première étape à réaliser la formation des formateurs aussi bien en T.E. qu'en I.A. au Canada et en France. La seconde étape, par la suite, permettra d'initier tous les ans ou tous les deux ans une vingtaine de personnes à l'appui du noyau des formateurs. Il faut que les ressources humaines soient suffisantes au moment de la réalisation des projets de développement.

La RECHERCHE doit être dynamique pour devenir le véritable moteur du développement. Par conséquent, elle doit être à la fois introspective et prospective ; compte tenu de la modicité des moyens de nos pays, elle doit aussi avoir une vocation régionale avec la constitution d'équipes de recherche thématique, action que la coopération internationale encourage et soutient ; ceci est une priorité des réseaux de recherche partagée de l'UREF qui l'a bien illustré avec un projet de recherche sur la superovulation des races de 6 pays africains.

Le DYNAMISME, certes timide que connaît l'élevage africain doit être encouragé en mettant en place un certain nombre de dispositifs réglementaires

facilitant l'installation de petites unités d'élevage intensifs à même de fabriquer de produits de qualité. Dans ces unités la vaccination sera systématique et contrôlée.

L'insémination artificielle sera utilisée à la fois comme outil de reproduction et d'amélioration génétique, tandis que le transfert d'embryon va favoriser la création d'un noyau de femelles d'élite et de procéder à la multiplication de génome. A la longue une telle action se traduira par l'établissement d'une banque de gènes à vocation commerciale inter-africaine.

6. CONCLUSION

S'il est vrai que les Biotechnologies provoquent un engouement universel, l'élevage africain, de par sa dynamique actuelle, ne doit pas se permettre de refaire l'histoire de la science.

Avec une coopération internationale réalisée dans le cadre d'un partenariat égalitaire, et une volonté politique réelle des autorités nationales, l'élevage africain est capable d'intégrer judicieusement et rationnellement les nouvelles données biotechnologiques pour être au rendez-vous de l'autosuffisance alimentaire.

7. BIBLIOGRAPHIE

AMSTRONG D.G., 1988 : The implication of biotechnology for livestock production, nutrition and health.
Nutritrop, Abstracts and reviews (série 6) ; 58 (8) : 415-126.

BREM G. and KRAUSSLICH H., 1989 : Application models of embryo transfer techniques in cattle.
In : Biotechnology for Livestock Production, Plenum Publishing Corporation, New York : 97-107.

CHICOTEAU P., 1987. : Perspectives et réalités du transfert d'embryons en Afrique.
In : International Embryo Movement Symposium, Montréal : IETS : 41-53.

CHIGARU P., RUREDOZO T.J. ; OKANTAH S.A. ; PETERS K.J., 1989 : Biotechnology in Africa.
In : Biotechnology in Livestock in developing Countries. Proceeding of Biotechnology, 1989. University of Edingburgh, 4-8 sept. 1989 : 406-124.

CHUPIN D., 1992a : Nouvelles technologies de la reproduction : implication par l'obtention et la demande du progrès génétique.
Réunion FAO sur l'amélioration génétique des bovins de l'Afrique de l'Ouest et du Centre, Banjul (Gambie) 17-21 octobre 1992.

- CHUPIN D., 1992b** : Résultats d'une enquête sur l'état de l'insémination artificielle en Afrique.
Réunion FAO sur l'amélioration génétique des bovins de l'Afrique de l'Ouest et du Centre, Banjul (Gambie) 17-21 octobre 1992.
- CLINE M. J., STANG H., MERCOLA K., MORSE L., RUPRECHT R., BROWNE J. ; SALSER W., 1980** : Gene transfer for Britain's biotechnology.
Nature U.K. 384 : 422-425.
- CONNOR S., 1988.** : The Battle for Britain's Biotechnology.
New Scientist, 19 (1625) 45-50.
- COOMBS J., 1986** : Macmillan Dictionary of Biotechnology.
London U.K. The Macwilliam press Ltd : 330 p.
- CUNNINGHAM E.P., 1989** : Biotechnology in livestock production.
Biotechnology Seminar Canberra, 24-29 may 1989. World Bank - ISNAR-AIDAB-ACIAR, 46-55.
- DEMPFLE L., 1992.** : Genetic Imporvment of Indigenous Cattle in West Africa. Problems of Selection and Dissemination of Genetic Programm. Communication Réunion FAO sur l'amélioration génétique des bovins de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Projet FAO RAF 88/100, Banjul (The Gambia, 17-21 octobre 1992).
- DIOP P.E.H., 1989** : Adaptation du transfert d'embryons dans le contexte de l'élevage africain.
Communication aux journées scientifiques et professionnelles sur le transfert d'embryon, Dakar 10 mai 1989.
- DIOP P.E.H. ; SERE A. 1989** : Biotechnologie et productions animales : situation et perspectives en Afrique
Communication au Séminaire international sur les prespectives de la biotechnologie en Afrique. Centre Régional Africain de Technologie (CRAT), Dakar 14-16 novembre 1989.
- DIOP P.E.H., 1993** : L'Élevage Africain face à l'enjeu des biotechnologies animales.
Communication à la réunion de concertation thématique du réseau Biotechnologies Animales de l'UREF, Cotonou (Bénin) 19 février 1993.
- DOYLE J., 1989** : Animal disease control and biotechnology.
Biotechnology Seminar Canberra, 24-29 may 1989. Workd bank - ISNAR-AIDAB-ACIAR : 42-45.

- FAO, 1985** : Production yearbook 1984, Rome FAO.
- FAO, 1990** : Production yearbook 1989, Vol. 44, Rome FAO.
- FITZUGH H.A. ; EHOI S.K. ; LAHLOU-KASSI A., 1992** : Research strategies for development of animal agriculture.
Revue Mondiale de Zootechnie, 72(3) : 9-19.
- MENAIA J.A.G.F., FERREIRA L.M.A., FERNADES T.H., PORTUGAL A.B.C.V., 1989** : O Papal da Biotecnologia No Desenvolviemnto da producao animal.
Revta Port. clen. vet., 83(484) : 239-254.
- PERRIN J., LACAZE S., COUPET H., 1989** : Impact du transfert embryonnaire en ferme.
Elev. Insémi., 231 : 15-24.
- PICARD L., 1989** : La manipulation, la congélation et le sexage des embryons.
In : Mieux maîtriser la reproduction des espèces domestiques par le transfert d'embryons. Journées Scientifiques - Sommet de la Francophonie, Dakar, 2-11 mai 1989 : 96-104.
- SARR J., 1989** : Biotechnologie et Santé animale : Situation et persepectives.
Communication au Séminaire international sur les perspectives de la biotechnologie en Afrique. Centre Régional Africain de Technologie (CRAT), Dakar 14-16 novembre 1989.
- SINATRA M.C., CELI R., CHIES L., DURSO G., 1988** : L'embryo transfer ed alcune sue applicazioni Zootecniche.
Tecnica agricola, 2(15) : 5-18.
- SPRADBROW P.B., 1989** : Biotechnology for animal production and heath.
Biotechnology Seminar Canberra, 24-29 may 1989. Workd bank - ISNAR-AIDAB-ACIAR : 39-41.
- THIBIER M., 1990.** : New Biotechnologies in Cattle Reproduction in Proceedings of the 7th Congress of the Federation of a Seau Veterinary Association : 4-7 novembre 1990, Pattaya, Thailand : 512-514.
- TURTON J.D., 1989** : The application of Genetic Biotechnology in Animal Breeding.
Ag. Biotech. News, vol. 1, n°2 : 183-187.

- WILMUT I., HALEY C.S., WOOLIAMs J.A., 1992** : Impact of Biotechnology on Animal Breeding.
Anim. Reprod. Sci., 28 : 149-162.
- WINROCK INTERNATIONAL, 1992.** : Assessment of Animal Agriculture in Sub Saharan Africa.
Morrilton, Arkon sas, Winrock International.
- WOOLIAMs J.A. & WILMUT I., 1989** : Embryo Manipulation in Cattle Breeding and Production.
Anim. Prod., 48 : 3-30.
- WORLD BANK, 1990** : World Development Report, 1990 : Poverty Oxford U.K., Oxford University Press.

LES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION ET L'AMELIORATION SANITAIRE DU TROUPEAU

Par M. THIBER et B. GUERIN*

Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs - UNCEIA, 13, rue Jouët, B.P. 65-F, 94703 Maisons-Alfort.

Publié avec l'aimable autorisation du *Recueil de Médecine Vétérinaire*
RESUME

Les biotechnologies de la reproduction, classiquement décrites en trois générations : l'Insémination Artificielle (IA), le Transfert d'Embryon (TE) et la troisième comprenant le sexage des embryons, la Fécondation In Vitro (FIV) et le clonage, peuvent en plus de leurs différentes autres qualités, génétiques notamment, concourir à améliorer l'état sanitaire du troupeau. Un certain nombre de risques existent, en théorie, de contamination des nimaux par ces méthodes de transferts de gènes. Cependant la connaissance précise de ceux-ci a permis à la Communauté Scientifique Vétérinaire d'établir une doctrine propre à chacune de ces Biotechnologies de la Reproduction, fondée sur l'application de règles épidémiologiques désormais éprouvées.

L'Insémination Artificielle réclame le maintien des mâles dans un Centre, dont le statut sanitaire est rigoureusement contrôlé. par contraste, la surveillance sanitaire du transfert embryonnaire, qui constitue à l'heure actuelle le moyen le plus sûr d'échanges de gènes, repose sur le concept d'Equipes de TE agréées et sur des conditions de manipulation adéquates lors de la phase *in vitro* de ces opérations. La micromanipulation des embryons telle qu'elle se réalise lors du sexage ne doit pas être entreprise que lorsque l'embryon se trouve dans un milieu stérile. Les embryons fécondés *in vitro* peuvent être associés à des agents pathogènes. Les recommandations pour leur manipulation, en cours d'étude, tendent à reconnaître également la nécessité d'agréer des équipes de production d'embryons ainsi fécondés et de réaliser le contrôle sanitaire à partir des milieux dans lesquels ces embryons ont été manipulés.

Lorsque ces conditions sont effectivement remplies, ces Biotechnologies, présentes ou nouvelles, contribuent alors à l'amélioration du statut sanitaire des troupeaux .

MOTS CLES : Insémination Artificielle. Transfert Embryonnaire. Fécondation *in vitro*, risque sanitaire.

1. INTRODUCTION

Les Biotechnologies de la Reproduction comprennent classiquement trois générations : la première la plus ancienne est l'**insémination artificielle**, la seconde qui a commencé à se développer chez les bovins vers la moitié des années 1970, est communément appelée Transfert Embryonnaire, la troisième génération est celle qui est ne cours de développement et d'application selon un stade propre à chacune de ces entités, à savoir : le **Sexage des embryons**, la **Fécondation in vitro (FIV)** et le **Clonage**. pour être complet, on pourrait citer une quatrième génération, d'ores et déjà en cours d'étude mais non de développement chez nos animaux domestiques de ferme, la **Transgénèse**.

Ces Biotechnologies ont de nombreux points communs même si leur usage sur le terrain diffère radicalement, le développement de certaines d'entre elles, FIV ou clonage par exemple, n'étant pas encore assuré, faute de résultats économiquement ou techniquement suffisants. Un de ces points communs, qui sera l'objet du présent article, est leur apport essentiel à l'amélioration sanitaire des troupeaux. Ceci a permis à ces technologies de contribuer à la prophylaxie de certaines maladies dans une population circonscrite, régionale ou nationale par exemple, et aussi d'ouvrir de vastes perspectives d'échanges internationaux. Bien que l'intérêt économique de ces techniques soit surtout manifeste dans l'espèce bovine, que nous prendrons comme modèle principal, la plupart des règles appliquées à cette espèce sont aussi valables pour les petits ruminants et les porcins.

2. L'INSEMINATION ARTIFICIELLE

Le développement de l'insémination artificielle (IA) depuis plus de quarante ans, coïncide à l'évidence avec le progrès génétique que l'utilisation rationnelle de cette technique de Reproduction permet aujourd'hui de maîtriser.

Cette biotechnologie représente aussi une des principales composantes de l'amélioration des statuts sanitaires des cheptels, observée non seulement en France, mais également dans tous les pays qui ont largement intégré l'IA à leurs programmes de Reproduction.

2.1. Risque de contamination et agents pathogènes

Cette observation peut néanmoins paraître paradoxale lorsqu'on étudie les agents pathogènes éventuellement présents dans le sperme, ou que l'on considère les risques de transmission des maladies correspondantes aux femelles inséminées, généralement plus importants que lors d'une saillie naturelle. L'utilisation, en Insémination Artificielle de semences infectées, risque en effet, en théorie, d'être un facteur de diffusion important en raison, principalement du nombre élevé de femelles susceptibles d'être inséminées par un même éjaculat, mais aussi en liaison avec la durée d'utilisation de telles semences qui s'étend parfois à plusieurs années. A cela s'ajoute une plus grande sensibilité des

féelles à une éventuelle contamination par la voie utérine puisque les muqueuses vaginales et cervicales ne jouent alors plus leur rôle immunitaire protecteur.

Dans une étude récente consacrée aux maladies transmissibles par la semence, l'Office Internationale des Epizooties (12) ne renverrait pas moins de 69 agents infectieux pathogènes, bactéries, virus, protozoaires ou champignons, susceptibles d'être présents et/ou transmis par la semence (tableaux I et II). Parmi ceux-ci, on peut relever les virus de la fièvre de l'IBR-IPV, le *Mycoplasma mycoides* de la péripneumonie bovine, les *Brucella abortus*, *ovis* et *meltensis* des Brucelloses des grands et des petits ruminants, les agents de la Tuberculose, de la Chamydiose (*Chlamydia psittaci*).

Tableau 1 : Liste des maladies virales éventuellement présentes ou transmissibles dans / par le sperme selon les espèces (adaptée selon 12).

Maladies ou Agents pathogènes	Bovins	Petits ruminants	Porcs
Fièvre Aphteuse	P ; Tr	P ; (Tr)	P ; (Tr)
Peste Bovine	P ; (Tr)	P ; (Tr)	(P)
Stomatite vésiculeuse	P ; (Tr)		
Fièvre Catarrhale	P ; Tr	P ; Tr	
Peste des petits Ruminants		P ; (Tr)	
Clavelée ; variole	P ; (Tr)		
Vésicule du porc			P ; Tr
Peste porcine classique (IBV/IPV)	P ; Tr		P ; Tr
Leucose Bovine Enzootique	(P)		
Maladie d'Aujeszky			P ; (Tr)
BVD/MD	P ; Tr		
Border disease		P ; (Tr)	
Para-influenzae	P ;		
CAEV			
Tremblante		P ; (Tr)	
Gastroentérite transmissible			(P) ;
Parvovirus porcins			(Tr)
Enterovirus			P ; Tr
Adenovirus			P ; (Tr)
Papillomatose génitale	P ; (Tr)		P ; (Tr)

P : Présence démontrée ; Tr : transmissible ; entre paraenthèses : vraisemblable. Les cases vides indiquent l'absence du germe.

L'extrême diversité de ces microorganismes et des maladies dont ils sont responsables rend compte des origines possibles de la contamination de la semence. Le sperme peut en effet être infecté par des microorganismes présents

dans l'appareil reproducteur (testicules, glandes annexes) lorsque l'animal souffre d'une infection (1, 6 et 19), mais il peut également être contaminé au moment de la récolte par les micro-organismes qui colonisent l'urètre ou la cavité préputiale (4, 13 et 17). A cette contamination s'ajoute celle des micro-organismes qui proviennent de l'écosystème environnant, dont la présence dans la semence va dépendre des conditions de récolte (aire de monte, boute-en-train notamment) ou du traitement des semences (hygiène des laboratoires, techniques de congélation, méthodes de stockage).

Tableau 2 : Liste des maladies bactériennes ou assimilées éventuellement présentes ou transmissibles dans / par le sperme selon les espèces (adaptée selon 12)

Agents pathogènes	Bovins	Petits ruminants	Porcs
<i>Brucella abortus</i>	P ; Tr		
<i>Brucella melitensis</i>		P ; (Tr)	
<i>Brucella suis</i>			P ; Tr
<i>Brucella ovis</i>		P ; (Tr)	
<i>Campylobacter</i> sp.	P ; Tr	P ; Tr	
<i>Trichomonas</i>	P ; Tr		
<i>Mycobacterium</i> sp.	P ; Tr		(P) ; (Tr)
<i>Mycobacterium R. Ruminantium</i> (Heartwater)	P ; (Tr) (P) ; (Tr)	(P) ; (Tr)	
<i>Leptospires</i>	P ; Tr	P ; Tr	
<i>Chlamydiae psittaci</i>			
Autres souches de <i>Chlamydiae</i>	P ; (Tr) P ; (Tr)	P ; (Tr) P ; (Tr)	
<i>Coxiella burnetti</i>		(P) ; (Tr)	
<i>Mycoplasma</i> sp. (PPPC)		P ; (Tr)	
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	P ; Tr	P ; Tr	(P) ; (Tr)
<i>Mycoplasma</i> sp.		P ; (Tr)	
<i>Salmonella abortus ovis</i>	(P) ; (Tr)		
<i>Anaplasma marginale</i>	(P) ; (Tr)		
<i>Theileria</i> spp	(P)		
<i>Trypanosoma</i> sp.	(P)		
<i>Babesia</i> sp.	(P)		
<i>Listeria</i>	P ; Tr		
<i>Haemophilus somnus</i>	P ; (Tr)		
<i>Ureaplasma</i> sp.		P ; Tr	(P) ; (Tr)
<i>Toxoplasma gondii</i>		P	(P)
<i>Actinobacillus seminis</i>			

P : Présence démontrée ; Tr : transmissible ; entre parenthèses : vraisemblable.

Les cases vides indiquent l'absence du germe

La maîtrise des risques sanitaires liés à l'utilisation de la semence des animaux Reproducteurs, en Insémination Artificielle, va donc devoir intégrer la grande diversité des agents pathogènes susceptibles d'être véhiculés par la semence, ainsi que les connaissances épidémiologiques et sémiologiques qui s'attachent aux maladies qu'ils sont susceptibles de provoquer. Il est important toutefois de préciser que la relation agent pathogène-spermatozoïde ne doit être considérée que par l'intermédiaire des sécrétions, quelle qu'en soit l'origine (testicules, glandes annexes) ; l'intégration des ADN des agents pathogènes aux gamètes mâles n'a en effet encore jamais été démontrée, ni pour les bactéries, ni pour les virus. Tout au plus peut-on envisager l'hypothèse d'une absorption de certaines particules virales ou bactériennes sur le spermatozoïde, à l'occasion d'une contamination de la semence. Des travaux en cours dans notre laboratoire devrait permettre rapidement de vérifier cette hypothèse.

2.2. Les règles épidémiologies de surveillance

La bonne gestion du risque sanitaire qui, depuis près de cinquante ans, a permis d'obtenir les résultats énoncés ci-dessus, a donc consisté à associer, relativement à ces maladies ou à ces agents pathogènes, des mesures de prophylaxie sanitaire ou médicale, des protocoles stricts de contrôle sanitaire au niveau individuel et/ou collectif et également des précautions générales d'hygiène qui sont appliquées aux animaux et à la fabrication des doses.

Le concept de base est le suivant : tout mâle, producteur de sperme doit être indemne de toutes les maladies susceptibles d'être transmises par la voie sexuelle, aux femelles inséminées. La définition stricte de ce statut sanitaire individuel ne peut être garantie que par l'extension de cette règle au groupe dans lequel se trouve l'animal Reproducteur.

On aboutit ainsi à la notion, schématisée à la figure 1, d'individus indemnes introduits et maintenus dans un effectif lui-même indemne.

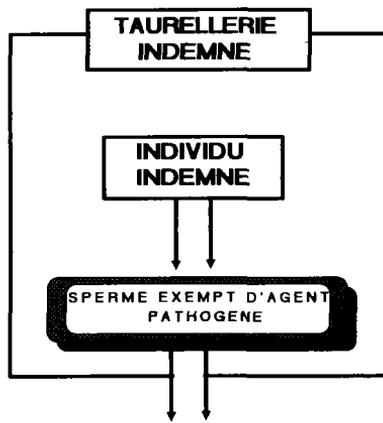


FIG. 1 - Schéma du principe de prophylaxie sanitaire apportée par l'Insémination Artificielle (Selon 29).

Le respect de ces principes et règles fondamentaux et la nécessité de leur application stricte, qui seuls permettent d'apporter aux éleveurs une garantie totale, ont conduit les autorités vétérinaires françaises à proposer des textes officiels qui exposent les conditions sanitaires auxquelles doivent être soumis les animaux qui sont utilisés en Insémination Artificielle (Arrêté ministériel du 1er août 1990). L'harmonisation des règlements sanitaires européens a entraîné en outre la mise en place d'une législation fortement inspirée des textes français (Journal Officiel des Communications Européennes : Directive du Conseil 88/407 du 14 juin 1988).

L'application rigoureuse de ces règles constitue depuis toujours, la base de la réussite française en matière d'insémination artificielle et a très fortement contribué à amener le niveau de la taurellerie française à l'un des premiers rangs mondiaux. Les maladies qui justifient de telles mesures sont : la Fièvre aphteuse, la Tuberculose, la Brucellose, la Leucose bovine Enzootique, l'IBR-IPV, la BVD/MD, la Trichomonose et la Campylobactériose. Le cas de la Fièvre aphteuse est traité dans le programme national de prophylaxie contre cette maladie. Les conditions de définition des statuts sanitaires des animaux reproducteurs et leur strict maintien, associent étroitement : la connaissance des statuts sanitaires des troupeaux d'origines (tuberculose, brucellose) et/ou de ceux de leur mère (leucose bovine enzootique), une antibiothérapie précise (leptospirose) et des méthodes de contrôle biologique indiscutables (maladies déjà citées auxquelles s'ajoutent l'IBR-IPV, la BVD/MD, la Campylobactériose et la Trichomonose chez les bovins).

Tout résultat positif à l'un de ces contrôles entraîne l'arrêt immédiat, de l'animal, son isolement et/ou son élimination, le contrôle de tous les autres animaux de l'effectif et l'impossibilité de l'utilisation du stock de semence de l'animal positif, constitue depuis la date du précédent contrôle négatif.

Parallèlement à ces mesures qui visent à maîtriser les maladies contagieuses et celles dont la transmission par la voie sexuelle est particulièrement bien connue, les professionnels de l'Insémination Artificielle se sont depuis longtemps efforcés de diminuer le nombre de micro-organismes qui peuvent être présents dans les doses de semence. Ainsi, deux voies distinctes ont récemment fait l'objet de développements particuliers : la destruction des micro-organismes dont le pouvoir pathogène semble dans certaines circonstances constituer un danger majeur, et la réduction du nombre total des micro-organismes qui constituent la flore dite banale de tout échantillon de sperme ou de semence.

La première voie consiste à utiliser des substances antibiothérapeutiques dont le spectre d'activité antibactérienne est judicieusement choisi par rapport à un grand nombre d'espèces ou par rapport à une espèce bactérienne définie. Ainsi les différentes associations d'antibiotiques utilisables dans les dilueurs sont : Streptomycine (500 mcg/ml) et Pénicilline (500 UI/ml) choisis pour leur large action synergistique notamment sur *Campylobacter fetus*, Lincomycine (500 mcg/ml) et Streptinomycine (500 mcg/ml) choisis pour leur action sur les *Mycoplasmes*, les *Ureaplasmes* et *Haemophilus somnus* (27). Ces associations peuvent être modifiées à conditions d'utiliser des mélanges dont l'activité est

équivalente. Ainsi aux Etats-Unies, la formule la plus couramment utilisées associé Gentamicine (500 mcg/ml), Tylosine (100 mcg/ml) et Lincospectine (300/600 mcg/ml).

La seconde voie consiste à s'efforcer de limiter le nombre de micro-organismes dits banals, présents dans la dose de semence. Cette préoccupation a conduit la communauté internationale à définir une norme relative à la qualité bactériologique de la semence congelée qui a été fixée à 500 Unités Formant Colonies par dose.

Animé par le souci constant de promouvoir les nouveaux concepts de qualité de la semence française et de répondre aux besoins technologiques des Centres d'Insémination Artificielle (CIA), le laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs s'est ainsi engagé, en collaboration avec des nombreux CIA, dans différentes voies de recherche et de développement destinées à permettre à court terme l'obtention de semences conformes aux normes internationales qui exigent de très hautes qualités génétiques indissociables de la valeur biologique et sanitaire des éjaculats.

3. LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE

Le développement de celui-ci s'est largement accru au cours des années 1980, chez les bovins et en Europe tout particulièrement. Ainsi en 1989, selon les statistiques de l'AETE ⁽¹⁾, plus de 100.000 embryons avaient été transférés en Europe (non compris l'URSS) et 30.000 environ l'auront été en France au cours de l'année 1990. Bien que cette technologie soit relativement récente, la Communauté scientifique vétérinaire a sur rapidement conduire les travaux nécessaires quant aux règles à observer pour éviter toute contamination de pathogènes lors de ces opérations. L'excellent travail ainsi réalisé lui a permis d'édicter sa doctrine et de présenter, à l'Office International des Epizooties dès 1985 (OIE-Table Ronde sur le Transfert Embryonnaire, 1985), les bases de celle-ci qui vont ainsi permettre à cette nouvelle Biotechnologie de la Reproduction de constituer «le moyen le plus sûr au plan sanitaire d'échanges de gènes».

3.1 L'embryon, entité unique au plan sanitaire et risques de contamination

La qualité spécifique de l'embryon qui le distingue radicalement d'un animal vivant ou même d'une collection de gamètes tel que le sperme, est la raison pour laquelle, tout raisonnement, tel qu'il fut parfois présenté, assimilant l'embryon à l'une ou à l'autre de ces deux entités a mené à une impasse ou illogisme.

L'embryon possède en effet une spécificité sanitaire qui repose sur les observations biologiques suivantes :

¹ AETE : Association Européenne de Transfert Embryonnaire

- L'embryon est entouré d'une triple protection contre les agents présents dans l'environnement : le corps maternel, la cavité utérine (avec laquelle l'embryon aux stades particulièrement précoces auxquels il se trouve, n'a évidemment aucun échange direct gazeux ou métabolique) et la membrane pellucide.

- L'embryon demeure dans la cavité utérine de la donneuse pendant un temps limité, habituellement pendant moins de 9 jours. A ce stade, l'embryon est libre dans la cavité utérine, protégé par sa membrane pellucide et n'est l'objet d'aucun échange direct avec sa mère.

- L'embryon est l'objet d'intenses changements métaboliques associés à une activité mitotique et de l'expression des gènes. Ces stades très précoces de la gestation sont très sensibles à un environnement défavorable qui conduit à une importante mortalité embryonnaire précoce.

- L'embryon présente une caractéristique particulière, sans doute unique, puisqu'il est possible de l'examiner à la loupe, et de s'assurer de l'intégrité de la surface de sa membrane externe (ZP), en contact avec le milieu extérieur. Cette observation n'est évidemment pas réalisable ni pour le géniteur d'une tonne, ni pour tous et chaque spermatozoïde !

- L'embryon qui vient d'être collecté n'est pas livré à lui-même mais se trouve toujours inclus dans un milieu particulier qui reflète fidèlement l'environnement immédiat auquel cet embryon est soumis.

Ces quelques points suffisent à montrer l'originalité de l'embryon et justifient les mesures spécifiques dont il doit être l'objet au plan sanitaire.

Six types de risques sont classiquement reconnus (figure 2) et ceux-ci ont été récemment l'objet de commentaires particuliers (32). En bref, on peut retenir que l'essentiel des craintes doit porter sur l'environnement immédiat de l'embryon depuis sa collecte jusqu'à la mise en place dans un outil de transfert, tel que les paillettes. Cette succession d'étapes recouvre ce qu'on appelle généralement la «phase *in vitro*», à laquelle il convient donc, en toute logique, de porter l'essentiel des efforts de surveillance.

3.2 Les agents pathogènes à considérer

Potentiellement, tous les types d'agents : champignons, bactéries, mycoplasmes, virus, etc. doivent être considérés.

En raison de leurs propriétés biologiques particulières, les virus ont été étudiés en priorité. Quelques travaux récents montrent néanmoins qu'il ne faut pas sous-estimer la possibilité d'interaction de bactéries ou d'autres micro-organismes avec la membrane pellucide de l'embryon.

Selon la revue du Sous-Comité de Recherche de la Société Internationale de Transfert Embryonnaire, présidé par W.C.D. Hare, nous avons pu recenser près de 50 agents qui ont été ou sont en cours d'investigations, dans le but d'apprécier les risques liés à l'utilisation d'embryons qui seraient contaminés par ces agents pathogènes.

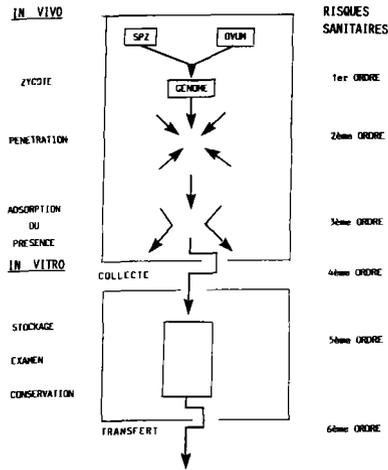


FIG. 2 - Types de risques de contamination sanitaire des embryons

La plupart de ces études portent sur l'espèce bovine mais le nombre de travaux chez les petits ruminants et le porc, voire sur des animaux sauvages, croît régulièrement.

Parmi les principales conclusions de ce groupe d'experts, on retiendra qu'on ne peut extrapoler le comportement d'un agent pathogène vis-à-vis de l'embryon d'une espèce, à celui d'une autre espèce et encore moins, au sein d'une même espèce, d'un agent pathogène à un autre, même apparemment taxonomiquement proche. Une des raisons de ces observations provient de la structure complexe et variable selon les espèces, de la membrane pellucide, ainsi que récemment rapporté (8).

Chez les bovins, aucun agent pathogène ne s'est révélé susceptible de traverser la membrane pellucide et seuls deux types de virus sont capables d'adhérer à cette membrane acellulaire : les Herpes Virus Bovins (types 1 et 4) et le Virus de la Stomatite Vésiculeuse (24, 28).

Dans le cas de telles adhérences, (25) a montré que le traitement des embryons par une enzyme protéolytique telle que la trypsine, pouvait rompre ces liaisons et ainsi éviter le transfert de ces agents avec l'embryon. Cependant, dans le cas de l'IBR/IPV (BHV1), ce type de traitement n'apparaît pas toujours indispensable. On sait en effet qu'après une phase aiguë, de courte durée, la maladie évolue vers une infection latente. Chez les bovins, les phases de réactivation et de récurrence, peu fréquentes, s'accompagnent rarement d'excrétion virale. En cas d'excrétion, le virus transite alors par voie nerveuse jusqu'aux épithéliums. La probabilité de contamination *in vivo* est donc extrêmement faible. Ainsi (31) et (33) ont pu démontrer qu'à partir de vaches donneuses séropositives, c'est-à-dire sûrement infectées, aucun embryon transféré (plus de 1.500) sur des receveuses dont la séronégativité avaient été éprouvée auparavant, n'a entraîné une séro-conversion de ces receveuses.

Certaines bactéries semblent aussi pouvoir s'absorber sur la membrane pellucide. C'est le cas d'*Haemophilus somnus* par exemple (34) mais cet organisme est sensible aux antibiotiques qui sont ajoutés au milieu de conservation des embryons. En outre ce micro-organisme entraîne la plupart du temps la mort de l'embryon ainsi que (16) ont pu le démontrer. Des mycoplasmes et uréaplasmes sont aussi capables, semble-t-il, d'adhérer à la membrane pellucide, mais leur rôle pathologique demande à être confirmé (5, 7 et 22). En outre, ces organismes sont sensibles à certains antibiotiques tels que la Lincomycine et la Streptomocycne. *Mycobacterium paratuberculosis* semble aussi pouvoir s'absorber sur la zone pellucide de l'embryon après contamination *in vivo* mais a de fortes concentrations et sans adjonction d'antibiotiques (23).

Pour tous les agents infectieux qui peuvent être présentés dans l'environnement immédiat des embryons mais qui ne s'absorbent pas sur la membrane pellucide, de nombreux auteurs (24) ont montré qu'un lavage rigoureux et précis, comprenant nécessairement au moins dix bains successifs réalisés avec une dilution égale ou supérieure au 1/100, avec bien sûr une pipette propre à chaque passage, garantissait l'élimination de l'agent initialement présent. A cela, il convient d'ajouter l'élimination de tout embryon dont la zone pellucide n'est pas intacte car il pourrait y avoir alors contact direct entre l'agent pathogène et l'embryon et ceux accompagnés de cellules somatiques appelés parfois «débris». L'ensemble de ces précautions permet d'obtenir, après le 10^e bain de lavage un environnement stérile. Il est donc du devoir impérieux de tout transplantateur, au cours de ses manipulations, de respecter scrupuleusement ces points qui constituent la base déontologique de l'activité de la transplantation embryonnaire, et de les considérer comme obligatoire.

Dans les autres espèces, petits ruminants ou porcins, la situation n'est pas aussi favorable. Il semble qu'en raison de propriétés particulières de la membrane pellucide des embryons de ces espèces, celle-ci soit capable de se lier plus fréquemment avec un nombre plus grand d'agents pathogènes bactériens ou viraux. A ce titre d'illustration, nous avons montré récemment dans nos laboratoires (tableaux III et IV) que *Brucella ovis* ou *Mycoplasma mycoides mycoides* mis en présence *in vitro*, respectivement d'embryons ovins et caprins, étaient capables d'adhérer à leur membrane pellucide.

La présence possible d'agents pathogènes dans les produits biologiques tels que sérums foetaux ou albumine doit être aussi envisagée (1). Il convient donc de veiller absolument à la garantie que donne le fabricant à cet égard. Des essais sont actuellement en cours et particulièrement dans notre laboratoire pour substituer à ces agents biologiques des milieux entièrement synthétiques (15).

Enfin, selon le risque de transmission des maladies infectieuses par le transfert embryonnaire, le Comité ad hoc de la Société Internationale de Transfert Embryonnaire a catalogué ces maladies sous forme de liste et les a classées en quatre groupes selon la connaissance des risques qu'ils peuvent entraîner (14). Cette liste vient d'être l'objet d'une nouvelle révision et se trouve modifiée (tableau V). Ainsi, la catégorie 1 comprend-elle 5 entités cliniques d'importance, la Leucose Bovine Enzootique, la Fièvre Aphteuse, la Brucellose

(chez les bovins), l'IBR/IPV et la maladie d'Aujeszky (chez les porcins), à condition pour ces deux dernières maladies que le traitement à base de trypsine ait été mis en oeuvre pendant la phase *in vitro* de la manipulation.

En conclusion, chez les bovins en particulier, la plupart des agents pathogènes ne s'absorbent pas sur la membrane pellucide. Dans cette situation, un lavage correct des embryons comprenant au moins dix bains, rend stérile l'environnement immédiat des embryons. Pour les agents susceptibles d'adhérer, un traitement adéquat des embryons à la trypsine, rompt ces liaisons.

Jusqu'à présent et malgré les milliers d'embryons transférés entre fermes, il n'a jamais été rapporté une quelconque contamination de receveuses à partir d'embryons transférés.

3.3. Les règles épidémiologiques de surveillance

Les règles à appliquer au transfert embryonnaire diffèrent radicalement de celles classiquement appliquées aux animaux vivants ou à la semence, pour les raisons évoquées ci-dessus.

Tableau 3 : Isolement de *B. ovis* (UFC) dans les liquides de lavage ou les embryons, après contamination expérimentale *in vitro*

Lote	Nombre d'embryons	LAVAGES										Embryons (a)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I (b)	8	+++	+++	+++	++	45	20	50	7	3	++	34
II (c)	6	+++	+++	++	++	155	85	88	70	30	105	40
Témoins	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(a) Nombre de colonies observées après lavage et broyage des embryons (b) Dose infectante = $1,01 \cdot 10^9$ UFC/ml, milieu de lavage = PBS contenant des antibiotiques. (c) Dose infectante = $1,74 \cdot 10^{11}$ UFC/ml, milieu de lavage = PBS sans antibiotiques.

La donnée fondamentale est que pour la première fois dans l'histoire de la médecine vétérinaire, le point privilégié de cette surveillance ne s'exerce pas sur l'animal lui-même mais sur l'HOMME (vétérinaire ou praticien) qui effectue la manipulation de l'embryon, c'est-à-dire pendant la phase *in vitro*. Ceci permet de soulager les contraintes sanitaires sur la femelle donneuse à la fois parce que celles-ci sont peu efficaces et parce qu'elles sont défavorables à l'expansion du transfert embryonnaire, moyen le plus sûr au plan sanitaire de transfert de gènes.

En outre, il est toujours possible de mettre en oeuvre une surveillance complémentaire au niveau des receveuses, préalablement choisies indemnes des maladies souhaitées et mises en station de quarantaine. Cette stratégie a été choisie par les autorités françaises, par exemple dans le cas d'importation d'embryons provenant d'outre-Atlantique (USA et Canada).

Ce nouveau concept de surveillance épidémiologique au niveau de la phase *in vitro* a été récemment introduit dans l'Annexe 5.2.3.1. du Code

Zoosanitaire de l'Office International des Epizooties (OIE), votée par l'Assemblée Générale de cette Institution Internationale en mai 1989. C'est également sur ce concept que reposent l'Arrêt Ministériel de la République Française (AM du 8 septembre 1986), le premier du genre, au monde, qui traite de la Transplantation Embryonnaire et la Directive de la CEE relative à la Transplantation Embryonnaire (89/556 du 25 septembre 1989) et applicable au 1er janvier 1991. En vertu de cette Directive, les Services compétents de la Direction Générale de l'Alimentation du Ministère de l'Agriculture Français travaillent à la réactualisation de l'AM du 8 septembre 1986 et sa publication devrait intervenir dans les premiers mois de 1991.

Afin que n'importe quel éleveur puisse mettre en oeuvre la Transplantation Embryonnaire dans son troupeau avec un **Risque zéro** d'introduire et de transmettre un agent pathogène, il est donc nécessaire de s'assurer du «sérieux» de l'équipe de transfert embryonnaire et de sa compétence technique pour appliquer les mesures nécessaires à la surveillance de la phase «*in vitro*». Ceci conduit tout naturellement à la notion d'«Equipe de Transfert Embryonnaire Agréée» telle qu'elle apparaît dans les textes réglementaires français et européens indiqués ci-dessus.

Tableau 4 : Isolement de *Mycoplasma mycoides large colonie* dans les liquides de lavage et sur les embryons frais ou congelés après contamination expérimentale *in vitro*.

Lots	Nombre d'embryons	LAVAGES										Embryons (a)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Embryons frais												
I	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	19	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
III	20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Témoins	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Doses infectantes lot I : $2,3.10^7$ UFC/ml. Lot II : $2,3.10^6$ Lot III : $2,3.10^4$

+: croissance de MmmLC ; - : pas de croissance

Pour qu'une Equipe de Transfert Embryonnaire soit officiellement agréée, les quatre conditions suivantes doivent être remplies :

- être composée d'un personnel compétent au plan technique et hygiénique, **comprenant au moins un vétérinaire**,
- posséder un équipement adéquat et des locaux adaptés. Ceux-ci doivent comprendre un laboratoire statique permettant une stérilisation appropriée du matériel en contact avec les embryons et si nécessaire pour les collectes «en ferme», un laboratoire mobile qui doit inclure une paillasse, un microscope, un ensemble facilement nettoyable et désinfectable, donc isolé du reste de l'environnement de la ferme, et incluant dans le cas de la France, d'une façon obligatoire **une hotte à flux laminaire**,

- accepter de suivre à la lettre et en toute conscience professionnelle, toutes les recommandations exigées relativement à la manipulation des embryons par les textes réglementaires, y compris les dix lavages associés à un taux de dilution adéquat à chaque bain (au moins 1/100), l'utilisation d'une pipette stérile à chaque lavage et l'élimination de chaque embryon dénué d'une membrane pellucide intacte ou accompagné de débris cellulaires,

- accepter de se soumettre régulièrement à un «contrôle de qualité» destiné à s'assurer de l'absence d'éléments infectieux, bactériens et viraux, à partir d'échantillons issus des liquides de collecte, de lavage (trois derniers bains par exemple) et embryons dégénérés. Naturellement ceci nécessite leur stockage en prévision des contrôles à venir.

Mais cette condition permet au système de fonctionner avec à la fois le maximum de sécurité et le minimum de coût, donnant ainsi aux Services Vétérinaires Officiels une garantie du respect de l'engagement des équipes qui sont ainsi nommément agréées.

3.3. Le problème particulier des embryons dits «MANIPULES»

Les textes officiels jusqu'ici ne traitent que des embryons à zone pellucide intacte. Cela exclut donc les embryons sexés ou résultant de transfert nucléaire, technique utilisée dans le processus de clonage. Pour pallier cette lacune qui risque de gêner en particulier, le transfert entre fermes d'embryons sexés qui se développe en France à l'instigation des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Artificielle, le groupe *ad hoc* de la Société Internationale de Transfert Embryonnaire vient ces derniers mois de remettre à la Commission du Code Zoosanitaire de l'Office International des Epizooties, pour examen, un texte traçant les grands principes qui devront être appliqués à de tels échanges. Ces principes sont d'une part le maintien total du concept de l'Équipe de Transfert Agréée et responsable des opérations et d'autre part l'absolue nécessité de ne rompre l'intégrité de la zone pellucide que lorsque l'embryon se trouve dans un milieu stérile, c'est-à-dire en l'absence de toute cellule étrangère aux embryons dans le milieu et après avoir réalisé les dix lavages qui, on le sait, conduisent à l'obtention d'un environnement embryonnaire stérile. Ceci implique aussi que tout le matériel soit propice à cette stérilité. C'est la raison pour laquelle une hotte à flux laminaire est absolument nécessaire.

Tableau 5 : Liste des maladies en fonction des risques sanitaires liés à leur transmission par Transfert Embryonnaire (14)

CATÉGORIE	1	2	3	4
	Leucose bovine Fièvre Aftéuse Brucellose (Bov) IBR/IPV (Trypa.) Maladie d'Aujeszky (tryps.)	Fièvre catarrhale (Bov) Peste porcine classique	Peste Bovine (Bov) BVD Fièvre catarrhale (Ov) Campylobacter fetus (Ov) Fièvre Aftéuse (Ov, Cap, Por) Maladie vésic. du porc Peste porcine Africaine Tremblante (Ov) Haemophilus somnus	Akabane Stomatite vés. (Bov, Por) Chlamydia psittaci (Bov) Ureaplasma. Mycopl. (Bov, Cap) Maedi-Vianna (Ov) Adenim. Pulm; (Sov) Tremblante (Cap) CAEV Parvovirus (Por) Entérovirus (Bov, Por) Leptospirine (Por) Bov Herpes Virus 4 Mycob. Paratub (Bov) Bruc; oris et abort. (Ov) Border disease (Ov) Virus parainfluenzae 3 (Bov) BSE

Pour la catégorie 1, les risques sont négligeables si la manipulation a été effectuée en conformité avec les règles du manuel de l'IETS. Le niveau de sécurité, compte tenu des travaux publiés va décroissant de la catégorie 1 à 4. pour cette dernière, ne figurent sur la liste que les maladies ou agents pathogènes pour lesquels les travaux entrepris n'en sont qu'au stade préliminaire.

L'analyse du milieu après conservation d'une partie aliquote de celui-ci, permet de vérifier si nécessaire ou requis par l'autorité vétérinaire, la réalité de cette stérilité. C'est en effet dans ces seules conditions que le «risque zéro» de transmission d'agents pathogènes avec l'embryon peut être assuré.

4. LES EMBRYONS FECONDES IN VITRO

Bien que la technique de Fécondation *In vitro* (FIV) ne soit pas encore parvenue au stade de développement de masse, en raison de son faible taux de succès, des veaux issus de cette technique sont déjà nés et ont déjà été proposés aux échanges entre troupeaux voire entre pays, entre le Royaume-Uni et la République d'Irlande, par exemple. Les études portant sur l'intervention éventuelle entre agents pathogènes et de tels embryons sont encore peu nombreuses. Trois études ont cependant été publiées, provenant de France (9, 10 et 11). La première montre que des prélèvements d'ovocytes de vaches tout venant, mais dont certaines étaient éliminées dans le cadre des programmes nationaux prophylactiques (Brucellose et Leucose Bovine Enzootique) pouvaient être effectués sans que les agents pathogènes n'apparaissent sur les ovocytes, liquides folliculaires, cellule tubaires et embryons. Dans la seconde investigation portant sur des ovocytes prélevés de vaches expérimentalement contaminées par le virus BHV1 (IBR/IPV), et en phase aiguë de l'infection, il a été montré que le virus pouvait être retrouvé dans les ovaires ou les oviductes (tableau VI) ainsi que sur les embryons et dans le liquide de maturation (tableau VII).

Tableau 6 : Présence du virus BHV 1 dans les oviductes de 10 vaches infectées expérimentalement, en fonction de sa présence dans les ovaires, le liquide folliculaire et le corps jaune (selon 10).

GONADES	OVIDUCTES	
	+	-
Ovaires : +	A (n = 5)	B (n = 2)
Liq. folliculaires : +		
Corps jaunes : +		
Ovaires : +	C (n = 1)	0
Liq. folliculaires : -		
Corps jaunes : +		
Ovaires : -	0	D (n = 2)
Liq. folliculaires : -		
Corps jaunes : -		

+ : présence de BHV ; - : absence de BHV ; A, B, C, D : catégories des vaches
0 : absence d'animaux

La dernière publication ouvre, en outre, bien d'autres perspectives car elle tend à démontrer qu'après la contamination *in vitro*, par le virus BHV1 d'ovocytes au cours de leur maturation ou de leur fécondation *in vitro*, ceux-ci se trouvaient encore en présence de virus dans les milieux de lavage 9 et 10, mais aussi voyaient leur probabilité de développement compromise dans une plus grande proportion que les ovocytes témoins. De plus, la qualité de leur fécondation se voyait altérée et une plus grande fréquence d'anomalies de décondensation des pronucléi était observée (11).

Les conséquences de ces observations originales sont nombreuses :

1. Il est impératif de se préoccuper de la qualité sanitaire des embryons fécondés *in vitro* malgré le plus grand nombre de bains divers auxquels ils sont soumis au cours de leur manipulation.

2. Le milieu environnant de ces embryons est un excellent témoin de la qualité sanitaire de l'embryon. Ces milieux constituent ainsi un témoin de choix du risque lié à la présence d'agents pathogènes au contact de tels embryons.

Enfin, ces enseignements relatifs aux embryons issus de Fécondation *in vitro* sont tout aussi importants pour les embryons issus de reprogrammation nucléaire (clônes produits) puisque les étapes de maturation *in vitro* et de culture *in vitro* des embryons demeurent semblables dans l'un ou l'autre cas.

Tableau 7 : Contamination des ovocytes, des milieux de maturation et des embryons après injection expérimentale par le virus BHV1 des vaches donneuses en fonction du statut infectieux de l'appareil génital (selon 11)

PRÉSENCE DU VIRUS (nombre d'animaux positifs)				
CATEGORIES	OVOCYTES	MILIEU DE MATURATION	EMBRYONS	
			Non dégénérés	Dégénérés
A (n = 5)	4	5	0	3
B (n = 2)	1	2	1	0
C (n = 1)	0	0	0	0
D (n = 1)	0	0	0	0

n : nombre de vaches ; A : ovaires et oviductes contaminés ; B : ovaires contaminés ; C : ovaires sauf liquide folliculaire et oviductes contaminés ; D : pas de contamination des ovaires ni des oviductes (cf. tableau VI).

C'est à partir de ces données que le Comité Import/Export de l'IEETS a rédigé une proposition de texte pour le Comité du code Zoo-sanitaire de l'OIE. Ce texte est en cours d'examen et pourrait être proposé à l'Assemblée Générale de l'OIE dans les deux années à venir. Il repose d'une part sur le concept de l'Equipe de Fécondation *in vitro* agréée et d'autre part sur la surveillance sanitaire portant sur l'examen des liquides de maturation, de culture ou des embryons dégénérés.

5. CONCLUSION

Ainsi, ces nouvelles Biotechnologies de la Reproduction, depuis l'Insémination Artificielle jusqu'aux embryons fécondés *in vitro* peuvent-elles concourir, en plus de leurs effets bénéfiques zootechniques et génétiques, à améliorer l'état sanitaire du troupeau et permettre ainsi sans risque sanitaire la diffusion des gènes recherchés, partout dans le monde. Cet avantage considérable nécessite cependant la connaissance précise des règles sanitaires épidémiologiques propres à chacune d'elles et leur application rigoureuse. C'est là le défi jeté à la médecine vétérinaire. Elle a su jusqu'à présent le relever sans faille.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. **AFSAHR (A.) et EAGLESOME (M.D.)** - Viruses associated with bovine semen.
Theriogenology, 1990, **60**, 93-109.
2. **ANDERSEN (J.B.), PEDERSEN (H.) et RONSHOLT (L.)** - Embryo Transfer in Denmark.
In : 13 th Conference of the OIE Regional Commission for Europe. (Madrid, 27-30 Nov 1988), 43-47, Office International des Epizooties (Paris).
3. **Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE).**
Statistiques Nationales de transfert d'embryons dans les pays d'Europe. Colloque 1990. Fondation Marcel Mérieux public. (Lyon).
4. **BALL (H.J.) et LOGAN (E.F.)** - Isolation of Mycoplasmas from bovine semen in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 1987, **121**, 322-324.
5. **BIELANSKI (A.), EAGLESOME (M.D.), RUHNKE (H.L.) et HARE (W.C.D.)** - Isolation of Mycoplasmas bovis from intact and microinjected preimplantation bovine embryos washed or treated with trypsin or antibiotics. *J. in vitro Fert. Emb. Trans.*, 1989, **6**, 236-241.
6. **BOWEN (R.A.), HOWARD (T.H.), ENTWISTLE (K.W.) et PICKETT (B.W.)** - Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected mature bulls. *Am. J. Res.* 1983, **44**, 2268-2270.
7. **BRITTON (A.P.), MILLER (R.B.), RUHNKE (H.L.) et JOHNSON (W.M.)** - The recovery of Ureaplasmas from bovine embryos following in vitro exposure and ten washes. *Theriogenology*, 1988, **30**, 997-1003.
8. **CHEN SHI SONG et WRATHALL (A.E.)** - The importance of the Zona Pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. *Br. Vet. J.*, 1989, **45**, 129-140.
9. **GUERIN (B.) LE GUIENNE (B.) et THIBIER (M.)** - Absence de contamination microbiologique des embryons bovins fécondés in vitro. *Bull Acad. Vet. de France*, 1988, **61**, 513-520.
10. **GUERIN (B.) LE GUIENNE (B.) CHAFFAUX (St.) HARLAY (T.), ALLIETTA (M.) et THIBIER (M.)** - Contamination des ovocytes et des embryons fécondés in vitro après fécondation expérimentale de vaches donneuses par le virus Herpes Bovin de type 1 (BVH1). *Rec. Med. Vet.*, 1989 **165**, 827-833.

11. **GUERIN (B.) MARQUANT LE GUIENNE (B.), ALLIETTA (M.), HARLAY (Th.) et THIBIER (M.)** - Effets de la contamination par le virus BVH1 sur la maturation et la fécondation in vitro des ovocytes de bovins . *Rec. Med. Vet.*, 1990, 166, 911-917.
12. **HARE (W.C.D.)** - Deases transmissible by semen and embryo tranfer techniques. *Office International des épizooties*, 1985, Technical series n°4, (Paris).
13. **HUMPHREY (J.D.), LITTLE (P.B.), BARNUM (P.A.), DOIG (P.A.), STEPHENS (L.R.), THORSEN (J.)** - Occurence of «Haemophilus somnus» in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. *Can. J. Compar. Med.*, 1982, 46, 215-217.
14. **International Embryo Tranfer Society (IETS)** - Conclusion of the research Subcommittee of the IETS Import/Export Committee. *Rev. Sci. Techn. Off. Int. Epiz.*, 1989, 2, 567-568.
15. **JOLY (T.), NIBART (M.), ESPOSITO (L.) et THIBER (M.)** - The substitution effect of BSA by Hyaluronic acid in mice embryo freezing media. In 6th Scientific Meeting of the AETE (Abstr.) 156. 1990 (Fond M. Merieux-Lyon).
16. **KANEENE (J.B.), COE (P.H.), GIBSON (C.D.), YAMINI (B.), MARINEZ (R.O.) et MORROW (D.A.)** - The role of Haemophilus somnus in early embryonic death I the effect of the organism on embryos by day 8 postbreeding. *Theriogenology*, 1986, 26, 189-198.
17. **KHER (H.N.), DHOLAKIA (P.A.)** - Prevalence of fungi in bovine seme. *Ind. J. Anim. Reprod.* 1985, 6, 100-101.
18. **McVICAR (J.W.), SINGH (E.L.), MEBUS (C.A.) et HARE (W.C.D.)** - Embryo transfer as a mean of controlling the transmission of viral infections. XIII Failure to detect foot and mouth disease viral activity associated with embryos collected from infected donor cattle. *Theriogenology*, 1986, 26, 595-601.
19. **MEYLING (A.), MIKELJENSEN (A.)** - Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVD-V) by Artificial Insemination (AI) with semen from a persistently infected bull. *Vet. Microb.*, 1988, 17, 97-105.
20. **Office International des Epizooties** - Round Table Meeting on sanitary problems related to embryo transfers. *Rev. Sci. Techn. Off. Int. Epiz.*, 1985, 4, 843-913.

- 21. Republique Française** - Arrêté Ministériel relatif aux conditions sanitaires exigées pour la production et la transplantation d'embryons de l'espèce bovine. *Journal Officiel de la République Française*, 27 septembre 1986, 11585-11587.
- 22. RIDDELL (K.P.), STRINGFELLOW (D.A.) et PANANGALA (V.S.)** - Interaction of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* with preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 1989, **32**, 633-641.
- 23. RODHE (R.F.), SHULAW (W.P.), HUESTON (W.D.), BECHNIELSEN (S.), HAIBEL (G.K.) et HOFFSIS (G.F.)** - Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from washed bovine ova after in vitro exposure. *Am. J. Vet. Resl.*, 1990, **51**, 708-710.
- 24. SINGH (E.L.)** - Potentiel of embryos to control transmission of diseases : a review of current research. *In* : IETS 1987 a. Manual. 11-21. (Champaign I11. USA).
- 25. SINGH (E.L.)** - Recommendations for the sanitary handling of embryos. *In*: IETS 1987 b. Manual. 31-38. (Champaign I11. USA).
- 26. SINGH (E.L.), HARE (W.C.D.), THOMAS (F.C.) et BIELANSKI (A)** - Embryo transfer as a means of controlling the transmission of vital infections. IV Non transmission of infectious bovine rhinotrachetis/infectious pustular vaginitis virus from donors shedding virus. *Theriogenology*, 1983, **20**, 167-176.
- 27. SHIN (S.J.), LEIN (D.H.), PATTEN (V.H.), RUHNKE (A.L.)** - A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of *Mycoplasmas*, *ureaplasmas*, *Campilobacter fetus* subsp. *Venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*, 1988, **29**, 577-591.
- 28. STRINGFELLOW (D.A.), LAUERMAN (L.H.), NASTI (K.B.) et GALIK (P.K.)** Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious Bovine Rhinotrachetis Virus or Bovine Herpes Virus 4. *Theriogenology*, 1990, **33**, 331, Abst.
- 29. THIBER (M.)** - Insémination artificielle et transplantation embryonnaire chez les bovins : moyens de prophylaxie sanitaire efficace. *In* : Banques des gènes et technologie de la Reproduction Bovine, Symp. pau 20-6-1986, 40-54. Ed BIG (pau-France).
- 30. THIBER (M.)** - Diffusion et intérêt du transfert embryonnaire en Europe Occidentale. *In* «Proc. of Symposium International Embryo movement (Montreal, 1987) 103-112 IETS (Champaign I11. USA).

- 31. THIBER (M.) - Embryo Transfer in Farm Animals. Comprehensive report.**
In : 13th Conference of the OIE Regional Commission for Europe.(Madrid, 27-30 nov. 1988), 3-36. Office International des Epizooties (Paris).
- 32. THIBER (M.) - Le transfert Embryonnaire : le moyen le plus sûr, au plan sanitaire, d'échanges de gènes.** *In* : 6th Scientific Meeting of the AETET. 1990, 67-81. Fond; M.Mérieux (Lyon).
- 33. THIBER (M.) et NIBART (M.) - Disease control of embryo importations.**
Theriogenology, 1987, **27**, 37-47.
- 34. THOMSON (M.S.), STRINGFELLOW (D.A.) et LAUREMAN (L.H.) - Adherence of Haemophilus somnus to bovine embryos after in vitro exposure.** *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 63-66.

BILAN DE L'AMELIORATION DE L'ELEVAGE DES PETITS RUMINANTS AU TCHAD

V. ZEUH

Direction des Productions Animales · Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha.
B.P 433 NDJAMENA - TCHAD.

RESUME

Le présent article met en évidence les facteurs responsables des échecs de programmes d'amélioration génétique chez les petits ruminants au Tchad. Les échecs enregistrés sont le plus souvent dus à des facteurs extérieurs : le mauvais choix du terrain, l'absence de ressources hydrauliques pérennes et la non participation des éleveurs aux actions. Certaines opérations ont été abandonnées dès que les premiers résultats ne donnaient pas satisfaction. La valeur de ces tentatives, quoique négatives, ne peut être discutée. Elle permet de tirer une doctrine d'action en matière d'amélioration génétique qui doit être édifiée à l'avenir sur des bases solides, pratiques et adaptées à l'élevage du milieu.

1. INTRODUCTION

L'amélioration rapide qui a caractérisé la production animale dans de nombreux pays industrialisés, en particulier au milieu de ce siècle, est due à l'effet conjugué des progrès rapides survenus dans plusieurs secteurs de la zootechnie. L'accroissement de la production d'aliments pour animaux, l'amélioration des techniques sanitaires, l'adoption des méthodes d'élevage plus économiques et la sélection des animaux présentant le potentiel génétique pour renforcer la production, sont autant de facteurs qui ont contribué à ces progrès.

Dans les pays en développement, en revanche, les conditions climatiques défavorables, le faible niveau de technicité des éleveurs, l'existence de certaines pathologies et le manque d'animaux génétiquement améliorés n'ont pas permis l'évolution de ces secteurs.

L'idée d'obtenir une amélioration du bétail domestique par sélection des meilleurs sujets d'une race autochtone, ou par croisement de races locales avec des géniteurs étrangers de qualité supérieure, n'est pas nouvelle. C'est ne pas autrement qu'ont été créées les races à grande production des pays d'Europe, puis d'Amérique.

Pendant l'ère coloniale, les zootechniciens d'alors devaient faire préférer, sinon adopter, l'amélioration génétique par croisement de races locales avec des reproducteurs importés. C'est ainsi qu'eurent lieu des importations les plus

iverses, dont force est de constater aujourd'hui qu'à de rares exceptions chez les bovins, elles n'ont pas laissé de traces. Ce sont ces échecs qui ont favorisé pendant ces vingt dernières années, l'apparition de programmes d'amélioration de plus en plus axés sur la sélection des races locales.

L'exemple qui suit des petits ruminants au Tchad doit inciter à considérer les aspects historiques de programmes d'amélioration génétique dans l'élaboration de nouveaux programmes en Afrique intertropicale.

2. LES ETABLISSEMENTS D'ELEVAGE : fermes, ranchs

Pour répondre aux objectifs d'amélioration du bétail domestique, des établissements d'élevage furent créés au Tchad.

Deux modestes centres, situé l'un à Moussoro, l'autre à NGrouri existaient avant la deuxième guerre mondiale. Seul le second a survécu et a fonctionné jusqu'aux années 1970. Celui de Moussoro qui se consacrait à l'élevage du mouton n'a pas connu un grand succès.

Les établissements d'élevage du Tchad ont été au début polyvalents. Par la suite, certains se sont spécialisés et d'autres ont disparu. Seule la ferme de Fianga, dans la partie soudanienne du pays, présentait jusqu'aux années 1970 les normes originales. Dans son rapport annuel de 1964 (4), le Service de l'Elevage du Tchad fait le bilan des activités des établissements comme suit :

- L'établissement d'élevage d'Abougoudam consacrait ses activités :
 - * à l'élevage du mouton à fourrure en vue de sa multiplication et de sa diffusion en milieu africain ;
 - * à l'étude et à l'amélioration du zébu arabe en vue de l'obtention de sujets plus précoces et plus lourds ;
 - * à l'amélioration du cheval du Ouaddaï par des étalons sélectionnés.
- L'établissement de NGouri avait pour objectifs le développement de :
 - * l'élevage du cheval ;
 - * l'élevage du porc et du mouton ;
 - * l'étude de la race bovine Kouri.
- Le ranch de l'Ouaddi-Rimé a été créé afin de démontrer que le bétail du Tchad, placé sur des parcours offrant en abondance l'eau et le pâturage, pouvait rapidement augmenter de poids et améliorer ses qualités bouchères.
- La ferme de Fianga a été surtout conçue comme une station d'élevage bovin dans le but de créer une race nouvelle, adaptée aux conditions écologiques de la zone soudanienne. Elle a également consacré ses activités à l'élevage du porc et de la chèvre rousse de Maradi.

3. AMELIORATION DE L'ELEVAGE OVIN :

3.1. Le mouton à fourrure (5)

L'existence au Tchad d'un mouton arabe à robe noire présentant une ressemblance avec le mouton à fourrure de race Karakul, a poussé le Service

d'Elevage d'alors à introduire des géniteurs de cette race. Le but principal était de remplacer les moutons autochtones par des métis Karakul Arabe de plus en plus près au sang par un système de croisements continus. Le but final de l'opération était d'obtenir en même temps qu'une production massive de fourrure "Astrakan" une amélioration de la race locale aussi bien du point de vue production de viande que de lait. Pour ce faire le Tchad a importé de la France un petit nombre de géniteurs en 1938. Les essais furent interrompus du fait de la guerre. Les animaux étaient élevés à Moussoro. Les descendants du premier lot furent transférés à NGouri, où ils sont restés jusqu'à la fin de la guerre.

Les nouvelles importations furent réalisées en 1947. Elles ont porté sur un lot d'une centaine d'animaux, cette fois-ci de provenance d'Iran. Les animaux, élevés à NGouri, ayant subi des pertes sévères, il fut décidé en 1948 de les transférer à Abougoudam où un centre d'élevage fut construit. Peu de temps après, on devait s'apercevoir que l'établissement est le résultat d'une erreur fondamentale. L'existence présumée d'abondantes réserves d'eau ayant été la raison essentielle de la création de la bergerie, tout devait s'écrouler lorsqu'il devint certain que ces réserves n'existaient pas. De plus, Abougoudam s'étend en effet sur des sols très pauvres à pâturages médiocres. Ajoutée à l'insuffisance de l'eau, la pauvreté en ressources alimentaires rendait impossible le maintien en bon état de troupeaux nombreux.

Jusqu'en 1955 le nombre des ovins au centre atteignait 3.000 unités.

Malgré les difficultés, les expériences se sont poursuivies en 1956. 4.000 têtes sont comptées dont 2.000 métis de dominance Karakul plus ou moins forte. Des distributions de mâles furent faites dans les troupeaux autochtones, afin de réaliser l'imprégnation dans la race locale. Le peu d'empressement des éleveurs à se prêter à l'expérience ne pouvait faire redouter un échec. En effet, les reproducteurs distribués gratuitement aux éleveurs ont été souvent sacrifiés lors des cérémonies traditionnelles (7).

Brusquement en 1956 une saison sèche très rude provoquait la catastrophe. En quelques mois le troupeau perdit près de la moitié de son effectif. On pouvait dire que partout au Tchad, et surtout dans la région de Ouaddaï, le troupeau ovin est à peu près stable ; chaque période d'accroissement étant suivi d'une mauvaise saison qui anéantit tous les progrès réalisés.

Curieusement, à Abougoudam se furent les animaux de race locale qui subirent les pertes les plus lourdes. Les Karakuls dans l'ensemble se révélèrent plus résistants et plus rustiques surtout si on considère le résultat de quelques reproducteurs qui ont survécu en milieu traditionnel. A l'issue de la dramatique sécheresse qui avait démontré l'insuffisance des points d'eau, l'effectif du troupeau fut ramené à 600 têtes.

En 1958, subsistait un troupeau composé exclusivement de Karakuls "sang pur" et des métis à haute dominance.

Ceci dit, l'expérience menée à Abougoudam n'a pas été un échec sur le plan zootechnique, puisque les Karakuls ont montré leur potentialité d'adaptation en de circonstances difficiles. Cette affirmation est certes sommaire si on sait que

l'élevage des Karakuls n'a connu des succès pour le continent africain que dans les hauts plateaux de l'Afrique Australe.

En 1960 l'établissement d'Abougoudam a été fermé et les troupeaux dispersés ou remis au ranch de Ouaddi-Rimé.

3.2. Le mouton de boucherie

Les essais d'introduction de moutons mérinos, berrichons et solognots ont été faits à NGouri en 1953. L'opération de métissage a été poursuivie avec les moutons arabes et bororos jusqu'en 1957. La totalité de l'élevage a été liquidée par vente en octobre de la même année. Comme le montre le tableau ci-dessous, les échecs de NGouri puis d'Abougoudam pendant la même période ont contribué à l'abandon des opérations dès que les premiers résultats enregistrés ne permettaient plus d'étendre l'action.

Tableau des effectifs des moutons de boucherie à la station de NGouri (1953-1957).

Années	Berrichon	Solognot	Merino	Arabe	Bororo	Métis
1953	5	4	5	100	100	-
fin 53	3	2	2			9
1954	-	-	-	66	54	3
1955	-	-	-	144	134	-
1956	-	-	-	197	134	-
1957	-	-	-	277	135	-

3.3. Le mouton à laine

Les essais faits à Moussoro en 1927 ont été abandonnés et les géniteurs laissés aux éleveurs qui élevaient les moutons à laine barabarins.

3.4. L'élevage expérimental de la Cotontchad

En 1975, la Société Coton Tchad à Békamba (Moyen-Chari) constituait un troupeau d'ovins par achat de brebis tout venant et par importation de 6 béliers de France dont 2 brebis charmois, 2 berrichons et 2 préAlpes du sud. Les femelles de la race locale ont été ensuite sélectionnées pour ne conserver que la variété blanche (le mouton du Mayo-Kebbi). L'objectif alors recherché était l'amélioration des qualités bouchères de la race locale par l'introduction de sang amélioré (2).

Après quelques années de croisement, l'utilisation des métis charmois semblait sans intérêt. En regard de la rusticité et de la précocité la race préAlpes

en revanche apparaissait, par rapport aux autres éventualités (croisement Berrichon et Charmois), comme la seule spéculation à envisager au niveau du troupeau local tchadien (3). Suite à la guerre civile de 1979, la station a été fermée et les animaux dispersés.

4. L'AMELIORATION DE L'ELEVAGE CAPRIN

4.1. La chèvre rousse

Un petit troupeau de chèvres de la race dite "rousse de Maradi" a été importé du Niger en vue de promouvoir le développement de cette race au Tchad. Elle est intéressante par les qualités de sa peau, sa fécondité et la qualité de sa viande.

Malheureusement, la chèvre de Maradi se comporte mal en dehors de son habitat naturel. Ainsi, toutes les expériences de transfert ont été soldées par des échecs.

Un troupeau de 43 têtes introduit en 1953 à la ferme de Fianga a presque complètement disparu en 1958. L'expérience a été arrêtée.

5. CONCLUSION

Entre 1900 et 1980 beaucoup d'établissements d'élevage ont entrepris l'amélioration des petits ruminants au Tchad. Les actions entreprises ont suivi pour la plupart le plan préconisé par Receveur en 1943 (6). Tous les essais ont conduit à des échecs, sauf le centre d'Abougoudam où la race Karakul a montré une certaine rusticité dans le milieu. La vulgarisation de cette race en milieu paysan devait dépendre plutôt des éleveurs qui, à côté de la sélection naturelle, sont les artisans de la sélection. On remarque que pendant cette période, les ovins ont été préférés aux caprins à cause des caractéristiques spécifiques de production (fourrure, laine) que ces derniers ne possèdent pas. Pour ces exemples au Tchad comme pour d'autres ailleurs, chez les petits ruminants comme chez les autres espèces, les aspects historiques d'amélioration d'élevage sont à considérer si des nouveaux échecs devaient être évités.

Pour les milieux défavorables des pays en développement, Bougler, 1989 (1) préconise une stratégie qui consiste à chercher avant tout un équilibre entre les objectifs des éleveurs, les contraintes du milieu et les possibilités des animaux. La prochaine étape consiste à mettre en place des programmes de gestion des troupeaux et de reproduction et enfin la mise en place du programme d'amélioration génétique.

6. REFERENCES

- 1. BOUGLER, J. 1989** - Quelle stratégie génétique pour les pays en développement ? Capricorne 2 (1), 6-10.
- 2. IEMVT - Région de Recherches Vétérinaires et Zootechniques d'Afrique Centrale.** Etude zootechnique des sud tchadien élevés à la ferme de Békamba. NDjamena, L.R.V.Z. Farcha, Rapport annuel, 1978.
- 3. IEMVT - Région de recherches Vétérinaires et Zootechniques d'Afrique Centrale.** Essai d'amélioration génétique du troupeau bovin et ovin du sud tchadien. NDjamena, L.R.V.Z. Farcha, Rapport annuel, 1979 p. Z.80 - Z.94.
- 4. Rapport annuel du Service de l'Elevage du Tchad, 1964, Fascicule VIII**
- 5. Rapports annuels du Service de l'Elevage du Tchad, Etablissement d'Elevage d'Abougoudam, 1951 à 1957.**
- 6. Receveur, P. - Tchad et élevage - Projet d'organisation et d'orientation de l'élevage au Tchad. AOF, 1943.**
- 7. Tacher, G. 1991 - Communication personnelle.**

INFLUENCE D'INJECTIONS REPETEES DE METERGOLINE SUR LA CINETIQUE DE LH ET FSH AU COURS D'UN TRAITEMENT DE SUPEROVULATION CHEZ LA VACHE HORS LACTATION

HANDAJA KUSUMA, P.S.^{*}, TAINTURIER, D.^{} & MERCIER, A.^{**}**

^{*} Faculté de Médecine Vétérinaire, Université AIRLANGGA, J.L. Airlangga 6, Surabaya-INDONESIE.

^{**} Service de Pathologie de la Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, C.P. 3013-44087 Nantes-Cedex-France.

Des études réalisées *in vitro* chez la ratte (21) et la truie (20) montrent que la prolactine intervient dans la sécrétion d'oestrogènes par inhibition de l'activité aromatasase. Segerson et coll., 1977 (17) utilisant des cellules lutéales bovines prouvent que la prolactine stimule la synthèse de la progestérone.

In vivo, une élévation de la prolactine pendant le proestrus et l'oestrus est observée chez la ratte (14, 19, 22) et chez la brebis (15). Chez la vache, nous avons trouvé comme Dieleman et coll., 1986 (4,13) un pic préovulatoire de prolactine. Par contre Karg et coll., 1970 (10) ne le mettent pas en évidence. Chez la vache, nous avons montré comme Aboul et coll., 1947 (1) que le taux de prolactine est plus élevé pendant la phase lutéale que folliculaire. Toutefois, Bevers et coll., 1988 (3) ne peuvent pas perturber le cycle oestral en utilisant la bromocryptine (un inhibiteur de la prolactine). C'est la raison pour laquelle la plupart des auteurs pensent que le pic de prolactine est plus symptomatique que fonctionnel.

Chez la vache superovulée à la PMSG, Bevers et coll., 1987 (3) constatent qu'il n'existe pas de différence significative entre le taux de prolactine chez l'animal ayant un pic de LH et celui qui n'en a pas. Cependant les modifications associées à l'utilisation d'un inhibiteur de la prolactine n'ont jamais été étudiées.

1. MATERIEL & METHODE

1.1. Animaux

Afin d'effectuer 16 traitements expérimentaux, 7 vaches tarées et 1 génisse de race Prim-Holstein, âgées de 3-8 ans, pesant de 400-600 kg sont divisées en deux lots de quatre.

2. PROTOCOLE

2.1. Superovulation

Le traitement est commencé 9 jours après les chaleurs de référence (soit 20 jours après la pose d'un implant de 3mg de Norgestomet et d'une injection de 5mg de Valerate d'oestradiol et de 3 mg de Norgestomet (Synchromate-B, N.D.¹). Les vaches du lot A sont traitées selon le protocole 1 (témoin) et celles du lot B selon le protocole 2 (Méteergoline²).

2.1.1. *Protocole 1*

Le protocole comprend 8 injections par la voie intramusculaire de FSH³ réparties sur 4 jours à raison d'une injection toutes les 12 heures avec une posologie décroissante de 6, 6, 5, 5, 3, 3, 2, 2 mg (soit 32 mg au total par vache) ou 5, 5, 4, 4, 2, 2, 1, 1 mg (soit 24 mg par génisse). La PGF2 α (0,5 mg de Cloprosténol-Estrumate N.D.⁴) est injectée au moment à la 5ème injection de FSH.

2.1.2. *Protocole 2*

Il est identique au protocole 1, mais 400 mg de la Méteergoline par la voie intraveineuse sont associés à chaque injection de FSH.

2.2. Insémination artificielle

Les animaux sont inséminés 56h. et 72h. après l'oestrus. 3 mois après la première collecte, les animaux du lot A reçoivent le traitement du protocole 2 (Méteergoline) et ceux du lot B reçoivent le protocole 1 (témoin).

3. PRELEVEMENTS SANGUINS

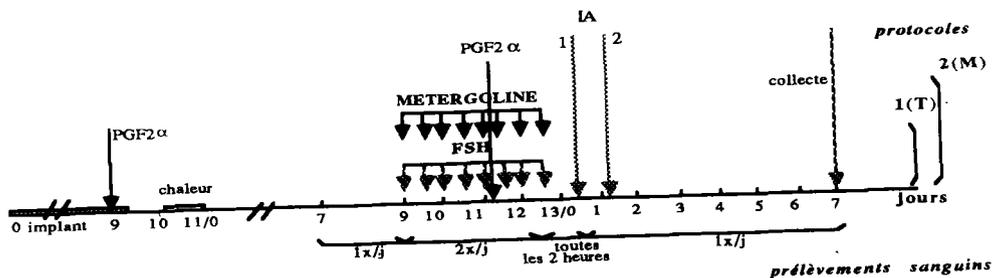
10ml de sang sont prélevés sur tube hépariné à la veine jugulaire ou à la veine caudale. Les prélèvements sanguins sont réalisés selon le rythme suivant: une fois par jour au cours des 2 jours précédant le début du traitement ; deux fois par jours pendant le traitement de FSH ; toutes les deux heures de la 35ème à la 55ème heure après l'injection de PGF2 α ; une fois par jour entre la période précédente et la collecte. Le sang est centrifugé et le plasma est congelé à - 25°C jusqu'au jour du dosage des hormones.

¹. INTERVET S A 43 Avenue Joze 49002 Angers, Cedex-France

². VIBRAC BP 27 08511 CARROS Cedex-France

³. SANOFI LA BALLASTIERE 33 501 Libourne Cedex-France

⁴. PITMAN-MOORE 38 Avenue de l'Épinette BP 142 77100 MEAUX-France



RYTHME DES PRELEVEMENTS DE SANG AU COURS DES DEUX PROTOCOLES DE SUPEROVULATION : 1 (T) INJECTIONS DE FSH ET 2 (M) INJECTIONS DE FSH ASSOCIEES A LA METERGOLINE.

4. DOSAGES HORMONAUX

Les hormones sont dosées en double par une technique de radio-immunologie.

4.1. Dosage de la prolactine

La prolactine plasmatique est dosée en double par la méthode de Kann. Sérum de lapin antiprolactine au 1/60.000 et sérum de mouton antilapin SMAL sont utilisés.

La sensibilité du dosage est de 0,3 ng/ml de plasma avec des coefficients de variation intra et inter dosage de 5% et 8% respectivement.

4.2. Dosage de la FSH

Son dosage est effectué à l'aide du kit délivré par le National Hormone & Pituitaire Programme Université de Maryland. L'anticorps anti-FSH ovine a été préparé par immunisation de lapins. La FSH ovine marquée à l'iode est référencée NIAMDD-O FSH-I (AFP-5679 c). La courbe étalon est préparée à partir de la préparation au NIAMDD oFSH-RPI avec des concentrations situées entre 1ng/ml et 64 ng/ml.

La procédure analytique est celle conseillée par le NIAMD ; dans ces conditions, les coefficients de variation intra et inter essai sont respectivement de 12% et 14,1%.

4.3. Dosage de la LH

L'anticorps anti-LH ovine a été préparé par immunisation de lapins par l'INRA-NOUZILLY. L'hormone LH ovine utilisée pour les marquages et la préparation des gammes étalons a été purifiée par l'INRA-NOUZILLY. Elle est référencée 1C 1951, 1mg correspond à 2,1 mg de LH NIH. Sa contamination en FSH est voisine de 0,9%. Le dosage est effectué par compétition.

La précision de la mesure est de 9,7% intradosage et de 7,5% interdosage pour un témoin proche d'une concentration de 1ng/ml. La sensibilité du dosage

est de 0,1 ng/ml de plasma. Pour les valeurs proches d'une concentration de 15ng/ml, la précision de la mesure est de 4,9% avec une sensibilité du dosage de 0,5ng/ml.

5. STATISTIQUE

Plusieurs méthodes d'analyse statistique ont été utilisées : l'analyse de bloc complète équilibrée, test du t de Student et test du X².

6. RESULTATS

D'après Xu et coll., 1988 (24), les facteurs individuels de variation liés à l'animal, sont ceux qui jouent le rôle le plus important sur le nombre de corps jaunes, d'embryons collectés et sur les profils hormonaux. C'est la raison pour laquelle cette recherche utilise les mêmes vaches sur lesquelles des traitements différents ont été comparés.

Chez l'animal superovulé, l'oestrus se produit à partir de la 20ème heure avant jusqu'à la 20ème heure après le pic préovulatoire de LH, au contraire l'intervalle entre le pic de LH et l'ovulation est constant (23). Par ailleurs, lors de nos traitements, 93,7% des profils de LH coïncident avec ceux de la FSH. C'est la raison pour laquelle dans cette expérience, les vaches qui ont des pics normaux de LH ou FSH sont considérées comme ayant répondu normalement au traitement de superovulation.

Les critères des pics de LH et FSH normaux sont les suivants : ils doivent apparaître 24 à 55h après l'injection de PGF2 α ; les valeurs respectives des pics sont supérieurs à 4 ng/ml (pour LH) et 100 ng/ml (pour FSH) ; la durée de la décharge dépasse 2 heures.

Respectant ces critères, 4 parmi les 8 vaches témoins présentent des pics de FSH normaux, et sous l'action de la Métergoline, 3 d'entre elles n'ont plus de décharge de FSH (fig. 6, 7 & 8), une présente un pic plus court que celui des témoins (fig. 5).

En revanche, parmi les 2 témoins qui n'ont pas de pics de FSH (fig.2 & 3), l'injection de Métergoline, s'accompagne de l'apparition de pics anormaux chez l'une d'entre elles (vache n°2).

Chez les témoins ayant répondu normalement, le taux de base de FSH (moyenne 63,7 ng/ml) et celui de la période comprise entre la 24-55h. après l'injection de PGF2 α (moyenne 131,5ng/ml) est statistiquement plus élevé que celui obtenu sous l'action de la Métergoline (moyenne 31,8 ng/ml ; 33 ng/ml respectivement).

Inversement, chez les témoins qui ont des pics de FSH anormaux, le taux de base de FSH (moyenne 32,8 ng/ml) et celui de la période comprise entre 24-55h. après l'injection de PGF2 α (moyenne 32,7ng/ml) est statistiquement moins élevé que celui obtenu sous l'action de la Métergoline (moyenne 58 ng/ml ; 55,3 mg/ml respectivement tab. 1 & 2).

Il y a donc une forte corrélation ($\alpha < 0,005$) entre le taux de base et l'apparition des pics préovulatoires de FSH.

En ce qui concerne la LH, 6 des 8 témoins ont répondu normalement au traitement de superovulation ; parmi les 6 vaches qui ont des pics de LH normaux, sous l'influence de la Métergoline, une présente des pics d'amplitude inférieure et moins durable (vache n°5), 2 ont présenté des pics anormaux, les autres n'ont pas eu de décharge de LH (fig. 3, 4, 5, 6, 7, 8).

En revanche les pics qui n'existent pas chez les 2 témoins, apparaissent sous l'action de la Métergoline.

Il n'y a pas de différence significative ($\alpha > 0,05$) du taux de base de LH quelque soit le protocole utilisé. Au contraire, le taux de LH au cours des 24h. suivant l'injection de PGF2 α jusqu'à la 1ère insemination artificielle, est moins élevé significativement ($\alpha < 0,05$) chez les vaches traitées (moyenne = 1,82 ng/ml) par rapport aux témoins (moyenne = 5,32 ng/ml).

Nos résultats montrent que dans l'expérience où les pics de LH et FSH sont normaux (n = 4), la durée moyenne du pic de LH est supérieure à 6 heures avec une amplitude moyenne de 30,5 ng/ml. Dans l'expérience où les pics de LH sont normaux avec des pics de FSH anormaux (n = 3), la durée moyenne de pic de LH est supérieure à 4 heures avec une amplitude moyenne de 16,7 ng/ml. en ce qui concerne les pics de LH anormaux (n = 4), l'amplitude moyenne est de 14,8 ng/ml.

Le taux de prolactine entre la 24 et la 55ème heure après l'injection de Cloprosténol est inférieur ($\alpha < 0,05$) chez les vaches traitées à la Métergoline (moyenne = 28,1 ng/ml) par rapport aux témoins (moyenne = 32 ng/ml).

Le nombre de corps jaunes chez les vaches témoins ($8,1 \pm 2,6$), est supérieur à celui des vaches traitées ($6,0 \pm 5,1$), mais la différence n'est pas significative.

En ce qui concerne le nombre d'embryons collectés, il est plus élevé chez les animaux témoins (moyenne = 5,5) que chez les animaux traitées (moyenne = 2,6), cependant, la proportion d'embryons transférables est plus élevée chez les animaux traités (52,4%) que chez les témoins (22,7%).

	Taux de FSH (ng/ml)	
	BASE	24-55H SUIVANT PGF2 α
TEMOINS NORMAUX (n=4)	63,7	131,5
SOUS METERGOLINE	31,8	33,0
TEMOINS ANORMAUX	32,8	32,7
(n=4)	58,0	55,3
SOUS METERGOLINE		

Tableau 1 : Influence d'injections répétées de métergoline sur les plasmatiques de FSH chez les témoins normaux et anormaux.

n° vache	CRITERES DES PICS DE LH (>4ng/ml) et FSH (>100ng/ml)								CONCLUSION			
	moment après PGF2 α (heure)				durée (heure)				LH		FSH	
	LH		FSH		LH		FSH		T	M	T	M
1	-	68	145	68	-	>4	4pic/4j	>4	-	A	A	A
2	-	-48&72	1	-48	-	1pic&1pic	-	1pic	-	A	-	A
3	49	72	-	-	>4	1pic	-	-	+	A	-	-
4	49	57	51	57	>4	>2	<2	1pic&>4	+	A	A	+
5	24&47	45	24&47	45	1pic&>4	>4	1pic&>4	<2	+	+	+	A
6	45	-	45	-	>6	-	>6	-	+	-	+	-
7	43	-	45&121	-	>8	-	>4&1pic	-	+	-	+	-
8	47	-	47	-	>6	-	>6	-	+	-	+	-

♣ - 48 : 48 heures avant l'injection de PGF2 α (-) pas de pic (+) pics normaux (A) pics anormaux

Tableau 2 : Profil des Pics de LH et de FSH chez les vaches superovulées sans (T) et avec Métergoline (M).

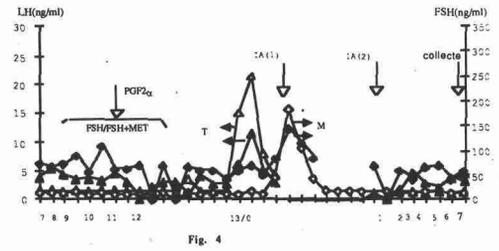
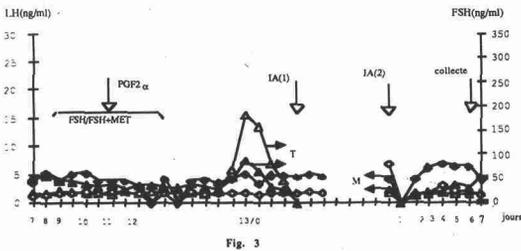
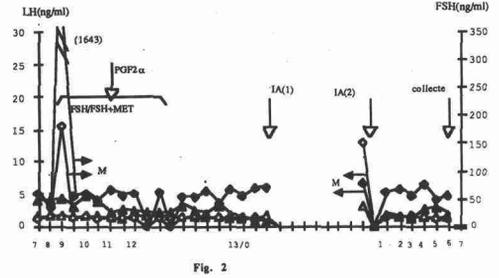
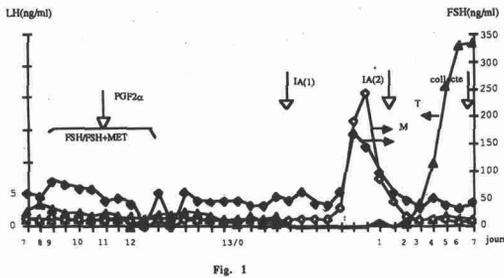


Fig 1 - 4 : TAUX DE LH (Δ) ET DE FSH (\blacktriangle) CHEZ LES VACHES TMOINS 1 - 4 ET TAUX DE LH (ϕ) ET DE FSH (ϕ) CHEZ CES MEME VACHES TRAITES A LA METERGOLINE.

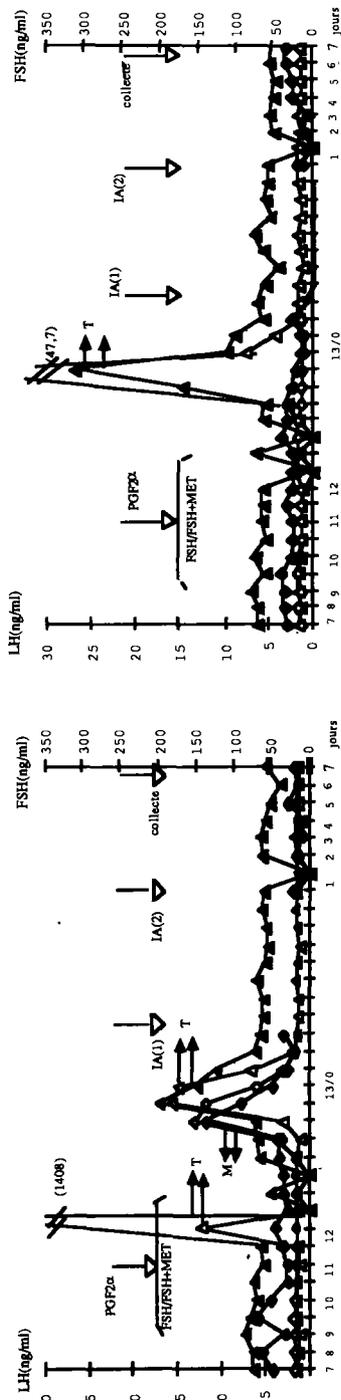


Fig. 5

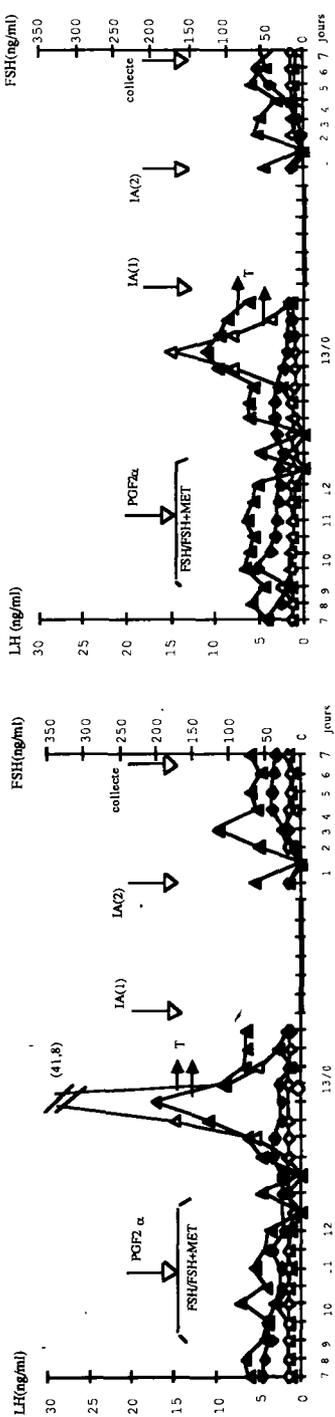


Fig. 6

Fig. 7

Fig. 5 - 8 : TAUX DE LH (Δ) ET DE FSH (\blacktriangle) CHEZ LES VACHES TEMOINS 5 - 8 ET TAUX DE LH(\times) ET DE FSH(\times) CHEZ CES MEME VACHES TRAITEES A LA METERGOLINE.

Fig. 8

7. DISCUSSION

Sur 8 témoins, 2 vaches (25%) n'ont pas de pics de LH ou de FSH. Ce résultat est comparable à ceux obtenus par Hyttel et coll., 1991, qui ont observé qu'il n'y a qu'une moitié des vaches qui répond au traitement de superovulation. Il est possible que ces vaches n'aient pas répondu au traitement de superovulation. Il est possible également que la réponse ait lieu dans des délais anormaux, conduisant à des périodes où les prélèvements de sang n'ont pas été assez fréquents (1-2 fois par jour) par rapport à la durée du pic de LH (8-16 heures) (12).

Chez la vache qui a un faible taux de FSH, la Métergoline provoque l'augmentation du taux de FSH. En revanche chez la vache qui a un taux élevé de FSH, la Métergoline le réduit. On suppose donc que la Métergoline augmente le taux de FSH, mais dans le cas où celui-ci était déjà élevé, cette augmentation a un effet rétrocontrôle-négatif sur la sécrétion de GnRH.

Cette expérience montre également que l'association FSH-Métergoline empêche la sécrétion de LH chez les animaux ayant répondu normalement au traitement de superovulation de LH chez les animaux ayant répondu normalement au traitement de superovulation. Par contre, lorsqu'on utilise l'association FSH-Métergoline chez les animaux ayant une anomalie d'ovulation, elle rétablit le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique de ceux-ci.

Le mécanisme selon lequel la Métergoline semble plutôt agir comme un régulateur de la fonction ovulatoire que comme un stimulant vrai de gonadotrophine n'a jamais été décrit. Il est possible qu'elle agisse soit par l'intermédiaire de l'effet antisérotoninergique soit par l'action inhibiteur de la prolactine.

L'action de la sérotonine sur la sécrétion de la LH et FSH dépend du paysage hormonal des animaux. Par exemple, la sérotonine inhibe la sécrétion de la LH chez la ratte ovariectomisée et n'a pas d'influence chez la femelle intacte (18). Lorsque celle-ci est administrée régulièrement, elle augmente effectivement le taux de LH chez les rattes ovariectomisées quand celles-ci sont prétraitées avec de l'oestradiol, ainsi que chez les rattes normales durant l'oestrus 2).

Le mécanisme d'action de la sérotonine sur la sécrétion du gonadotrophine a été étudié. Il existe une superposition des neurones de la LHRH et de ceux de la sérotonine dans l'hypothalamus. Des contacts synaptiques entre les terminaux sérotoninergiques et les éléments immunoréactifs de la LHRH ont été décrits dans la région préoptique médiane (8,11).

De même, l'influence de la sérotonine sur la FSH dépend de l'état physiologique hormonal de l'animal. Justo et coll., 1989, constatent que le précurseur de la sérotonine stimule la sécrétion de FSH chez le rat normal et au contraire elle diminue le taux de FSH chez le rat castré.

Chez la vache superovulée, le taux d'oestradiol 17B est 3 fois plus élevé que chez la vache cyclée normalement (12). L'oestradiol provoque une hypertrophie des cellules lactotrophes et induit une augmentation du taux de la

prolactine (6). Chez la brebis, Rozel et coll., 1990 constatent que le pic d'oestradiol provoque le pic préovulatoire de prolactine.

Nos résultats montrent qu'au cas où la superovulation provoque des profils de la LH/FSH atypiques (absents, précoces, retardés), l'association à la Métergoline semble participer à rectifier le profil anormal de LH & FSH. Il en est de même pour les valeurs anormales de la FSH, l'association à la métergoline augmente le taux de la FSH.

En revanche, il est connu qu'une concentration physiologique de prolactine est nécessaire à une maturation folliculaire et ovocytaire (13). Nos résultats prouvent que chez les témoins ayant répondu au traitement de superovulation, l'injection de Métergoline provoque la disparition des pics préovulatoires de la LH et FSH. Il en est de même pour les valeurs normales de la FSH, l'injection de la Métergoline induit la baisse du taux de la FSH.

Ce bénéfice peut être exploité pour l'application pratique de cette association chez les vaches qui ont des problèmes de dysfonction ovarienne. Cependant d'autres études mériteraient d'être effectuées pour améliorer les résultats obtenus, car cette association n'améliore pas le nombre d'embryons récoltés, bien que la modification de la LH et la FSH est nette.

8. CONCLUSION

L'association FSH-Métergoline empêche les sécrétions de LH et FSH chez les animaux ayant répondu normalement au traitement de superovulation. En revanche, chez l'animaux présentant un trouble de l'ovulation, la Métergoline semble participer à un meilleur fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysovarien et augmente la proportion d'embryons transférables.

10. REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier MM. RAVAUT, J.P. (INRA-NOUZILY), ASCHER, F. (LABO VIRBAC) ET CHATAGNON G. (ENVN) POUR LEUR COLLABORATION TECHNIQUE.

11. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABOUL-ELA A., YOUSSEF R.H., IBRAHIM S.S., RAGAB A.M. & TAWEEL E.A.** - Fluctuations of serum prolactin & its binding activity in relation to ovarian status of cows. *Vet. Med. j.*, 1987, 35, 1 :
2. **BECU DE VILLALOBOS D., LUX V.A.R., LACAU DE MENGIDO L. & LIBERTUN C.** - Sexual differences in the serotonergic control of prolactin & luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 1984, 115 / 84-89.
3. **BEVERS M.M. & DIELEMAN S.J. & KRUIP TH. A.M.** - Chronic treatment with bromocryptine during the oestrus cycle of the cows : Evidence that prolactin is not involved in preovulatory follicular growth. *Anim. Reprod. Sci.*, 1988, 17 : 21-32.
4. **BRYANT G.D., GREENWOOD F.C., KANN G., MARTINET J. & DENAMUR R.** - Chronic treatment with bromocryptine during the oestrus cycle of cows : Effect of pituitary stalk section. *J. Endocr.*, 1971, 51,405.
5. **DIELEMAN S.J., BEVERS M.M., VANTOL H.T.M. & WILLEMSE A.H.** - Peripheral plasma concentrations of estradiol, progesterone, cortisol, LH & prolactin during the oestrus cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrus period. *Anim. Reprod. Sci.*, 1986, 10 : 275-292.
6. **DJIANE J. & KELLY P.A.** - La prolactine. La reproduction chez les mammifères et l'Homme. Thibault eds. Inra, 1991, 113-126.
7. **HYTTEL P., CALLESSEN H., GREVE T. & SCHMIDT M.** - Ovocyte maturation & sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 1991, 35, 1 : 91-108.
8. **JENNES L., BECKMAN W.C., STUMPH W.E. & GR ZANNA R.** - Anatomical relationships of serotonergic & noradrenalinergic projections with the GnRH system un septum & hypothalamus. *Exp. Brain Res.*, 1982, 42 : 331-338.
9. **JUSTO S.N., ROSSANO G.L., SZWARCFARB B., RUBIO M.D. & MOGUILEVSKY J.A.** - Effect of serotonergic system on FSH secretion in male & female rats : Evidence for stimularory & inhibitory actions. *Neuroendocrinology*, 1989, 50 : 382-386.

10. **KARG H. & SCHAMS D.** - Prolactin levels in bovine blood under different physiological conditions. Lactation, éd. I.R. Falconer, Butterworths, London, 1970,144.
11. **KISS J. & HALASZ B.** - Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone releasing hormone neuron in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry & high resolution utography. *Neuro Sci.*, 1985, 14 : 69-78.
12. **KWEON O.K., KANAGAWA H., TAKAHASHI Y., MIYAMOTO A., MASAKI J., UMEZU M. KAGABU H. IWAZUMI Y. & AOYAGI Y.** - Plasma endocrine profiles & total cholesterol levels in superovulated cows. *Theriogenology*, 1987, 27, 6 : 841-857.
13. **MARTIN B.L., BOUHDIBA M., SAINT POL P., PEYRAT J.P.** - Effects peripheriques de la prolactine dans la fonction de la reproduction. II, Fonction de reproduction femelle. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1989, 18 : 288-294.
14. **NEILL J.D.** - Prolactin : Its secretion & control Greeep, Astwood, Handbook of physiology, section 7 : Endocrinology, vol IV : The pituitary gland & its neuroendocrine control, part 2, 1974, 469-488.
15. **REEVES J.J., ARIMURA A. & SCHALLY A.V.** - Serum levels of prolactin & luteinizing hormone in the ewe at various stages of the oestrus cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1970, 134 : 938.
16. **ROZELL T.G. & KEISLER D.M.** - Effects of oestradiol on LH, FSH & prolactin in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fert.*, 1990, 88 : 645-653.
17. **SEGERSON E.C.** - Luteotrophic activity of prolactin & LH utilizing subcellular particles from bovine corpora lutea. *Am. Soc. Anim. Sci.*, 1977, 69th. Ann. meeting.
18. **SHNEIDER H. & McCANN S.** - Monoamine & indolamines & control of LH secretion. *Endocrinology*, 1970, 86 : 1127-1133.
19. **SINHA Y.N. & TUCKER A.H.** - Relationship of pituitary prolactin & LH to mammary uterine growth of pubertal rats during the oestrus cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1969, 131 : 908.
20. **VELDHUIS J.D., KLASE P. & HAMMOND J.M.** - Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro : Influence of cytodifferentiation. *Endocrinology*, 1980, 107 : 42-46.

21. **WANG C. & CHAN V.** - Divergent effects of prolactin on estrogen & progesterone production by granulosa cells of rat Graafian follicles. *Endocrinology*, 1982, 110 : 1085-1093.
22. **WIERSMA J.A.** - Detailed characterization of prolactin secretion patterns during daylight in individual cycling & pseudopregnant rats. *Neuroendocrinology*, 1981, 33 : 288-294.
23. **YADAV M.C., WALTON J.S. & LESLIE K.E.** - Plasma concentrations of luteinizing hormone & progesterone during superovulation of dairy cows using Follicle Stimulating Hormone or Pregnant Mare Serum Gonadotropin. *Theriogenology*, 1986, 26 : 523-540.
24. **XU K., WU M., WANG H. & MAPLETOFT R.J.** - FSH-p lot number & superovulation response in beef heifers. *Theriogenology*, 1988, 29,1 : 335.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU GENE BOORoola : ETUDE DES SECRETIONS DE GONADOTROPINES ET DE STEROIDES PLASMATIQUES DE LA NAISSANCE A L'AGE ADULTE CHEZ LES MALES CROISES BOORoola PORTEURS OU NON DU GENE MAJEUR DE PROLIFICITE OU GENE "F".

M. SECK - Département de Biologie animale, Université C.A.D., Dakar, Sénégal.

C. PISSELET, C. PERREAU, C. CORNU, M.T. HOCHEREAU-DE REVIERS.

-Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Physiologie de la Reproduction,
37 380 Nouzilly, France.

J. THIMONIER -Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Chaire de
Zootechnie, Place Viala, 34 060 Montpellier, France.

L. BODIN, J.M. ELSEN - Institut National de la Recherche Agronomique, Station
d'Amélioration Génétique des Animaux, 31 326 Castanet-Tolosan, France.

BOOMAROV - INRA, 147 rue de l'Université, 75 341 Paris, France.

1. INTRODUCTION

La prolificité exceptionnelle des femelles Mérinos de la souche Booroola est le fait d'un gène majeur appelé gène "F". cependant, aucune expression directe de ce gène n'a été notée chez le mâle (Bindon et Piper, 1986). Chez les jeunes mâles, une augmentation de la concentration plasmatique en FSH a été observée chez les porteurs du gène (SECK, 1987 ; SECK et al. 1988) mais ce résultat, par la suite, a été contesté par les observations de Purvis et al., 1989 et Montgomery et al. (1989) qui ont considéré que la majeure partie des variations de teneurs plasmatiques en FSH provenait de différences entre pères. Chez le mâle adulte Booroola, Martin et al. (1987) ont observé une pulsativité de la LH plus élevée que chez les béliers témoins Mérinos. Bien que le génotype de leurs mâles n'ait pas été identifié, ces auteurs pensent que la différence observée entre les croisés Booroola et les Mérinos, pour le profil de sécrétion de la LH, pourrait être associée à la présence du gène de prolificité chez les porteurs, les non porteurs du gène "F" ayant une pulsativité en LH identique à celle des Mérino.

Chez les mâles de génotype connu, les profils de sécrétion des gonadotropines et de la testostérone sont très peu connus ; aucune analyse, sur une longue période, n'a été faite sur le même animal à partir de la naissance, comparant dans un même état physiologique et génétique, des béliers porteurs et non porteurs du gène.

Le but de ce travail a été d'analyser les teneurs plasmatiques en gonadotropines et en testostérone, de l'état impubère à l'âge adulte chez des béliers issus de deux croisements Booroola x Romanov et Booroola x Mérinos d'Arles, porteurs et non porteurs d'une copie du gène "F".

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Les animaux

** Booroola x Mérinos d'Arles (BooMa)*

Trois béliers mâles de souche Booroola, porteurs hétérozygotes du gène "F", ont sailli des femelles Mérinos d'Arles. Les agneaux mâles qui en sont issus (BooMa : n=92) sont nés à l'automne 1983. Neuf d'entre eux ont été identifiés comme étant des F+ et dix comme étant des ++, après analyse des taux d'ovulation de leurs descendances femelles. Le reste des animaux était de génotype inconnu (XX).

Tous ces animaux ont subi des prélèvements de sang hebdomadaires de 2 à 9 semaines d'âge. En saison sexuelle à 11 et 23 mois d'âge et en période de repos sexuel à 18 mois, des prélèvements de sang, sur tous les mâles typés et une partie des non typés, ont été effectués toutes les 30 minutes pendant 10 heures, à partir de 8 heures du matin.

** Booroola x Romanov (BooRo)*

Cinquante mâles F+ ont été obtenus par insémination de brebis Romanov avec les spermatozoïdes de sept béliers Booroola FF. En parallèle, dix neuf mâles ++ ont été obtenus avec les spermatozoïdes de trois béliers Booroola ++. Seize des F+ et quatre des ++ ont été allaités artificiellement. Ces agneaux BooRo sont nés au printemps 1987 et ont subi un prélèvement hebdomadaire de l'âge d'un an. Dix de chaque génotype ont été castrés à l'âge de 18 mois. Un mois plus tard, leur sang a été prélevé 2 fois par semaine pendant 7 semaines ; à la fin de la 4ème semaine, ces vingt mâles ont reçu un implant de testostérone permettant une concentration plasmatique moyenne en testostérone de 5 ng/ml.

2.2. Dosages radioimmunologiques

Après centrifugation les échantillons de plasma sont stockés à - 20°C jusqu'au moment des dosages. La LH a été dosée par déplacement selon Pelletier et al. (1982) chez les BooRo et les BooMa excepté à l'âge 23 mois où le dosage a été fait par compétition. La sensibilité des dosages est de 6,0 + 0,2 pg de la oLH 1051. Le coefficient de variation se situe entre 8,9 et 10,2%.

Le dosage de la FSH a été effectué selon Blanc et Poirier (1979). La réaction croisée avec la oLH a été éliminée par une première incubation avec des

anticorps anti-oLH. Dans ces conditions, la sensibilité du dosage est de 100 pg de FSH. Le coefficient de variation est 7%.

Les teneurs plasmatiques en testostérone sont déterminées par dosages radioimmunologiques directs selon la méthode de Garnier et al. (1978) modifiée par Hochereau-de Reviers et al. (1990). La sensibilité du dosage est de 0,3 ng/ml de testostérone et le coefficient de variation est de 18% pour 0,3 ng/ml et décroît à moins de 5% à 3 et 10 ng/ml.

2.3. Les statistiques

Les nombres de pulses LH et testostérone, ont été déterminés selon la méthode de Merriam et Wachter (1982), avec le programme "Pulsar".

Les données ont été analysées avec un programme d'analyse multivariées selon ANVARM AMANCE (Bachacou et al. 1981) pour les mâles BooMa et avec le programme GLM-SAS pour les mâles BooRo. Chez les BooMa les facteurs de variation sont pères intra BooMa et génotype intra père, le même père ayant des fils F+ et ++. Chez les BooRo, les facteurs de variation sont le génotype, pères intragénotype et mode d'allaitement.

3. LES RESULTATS

3.1. Chez les agneaux impubères

3.3.1 FSH

*** Les agneaux BooMa (Tableau 1)**

Les valeurs moyennes des teneurs plasmatiques en FSH augmentent de l'âge de 2 (5,30 ng/ml) jusqu'à l'âge de 5 semaines (5,96 ng/ml) et après décroissent jusqu'à l'âge de 9 semaines, fin de la première période de prélèvements de sang (5,31 ng/ml). Les concentrations moyennes varient significativement selon les pères (A = 5,35 ; B = 5,80 ; C = 5,38 ng/ml ; F = 4,21 ; P < 0,05).

Les agneaux porteurs du gène "F" ont des concentrations plasmatiques en FSH significativement plus élevées que les agneaux non porteurs (F+ = 6,10 vs ++ = 5,20 ng/ml ; F = 7,30 ; P < 0,01). Les agneaux de génotype inconnu (XX) présentent des teneurs plasmatiques en FSH intermédiaires (5,65 ng/ml) entre celles des agneaux F+ et des ++.

*** Les agneaux BooRo (Tableau 1)**

Les concentrations plasmatiques en FSH augmentent de 4 semaines (F+ : 4,82 ; ++ : 4,33 ng/ml) jusqu'à 7 semaines d'âge (F+ : 5,90 ; ++ : 5,15 ng/ml) et après se maintiennent élevées jusqu'à la fin de la période de prélèvements chez

les agneaux F+ et diminuent chez les agneaux ++ (4,65 ng/ml). Les agneaux mâles F+ montrent des concentrations plasmatiques en FSH significativement plus élevées que ceux des ++ (5,47 vs 4,61 ng/ml ; $F = 4,93$; $P = 0,03$). Cependant, des différences significatives en fonction des pères ($F = 2,34$; $P = 0,03$) ont été observées, ceci résultant du fait que les fils d'un des pères FF ont des teneurs plasmatiques en FSH plus basses (4,48 ng/ml) que celle des ++. Un effet supplémentaire du mode d'allaitement, artificiel ou maternel, a aussi été observé; les agneaux allaités artificiellement ayant des teneurs plasmatiques en FSH plus faibles ($F+ = 4,65$ vs $++ = 4,12$ ng/ml) que les agneaux allaités par leur mère ($F+ = 5,89$ vs $++ = 4,67$ ng/ml ; $F = 9,90$; $P = 0,003$).

La répétabilité des mesures de FSH est de 0,43 et 0,61 pour les BooMa et les BooRo respectivement.

3.3.2 LH

*** Les agneaux BooMa (Tableau 1)**

Les teneurs plasmatiques moyennes augmentent significativement avec l'âge entre 2 et 5 semaines (2 semaines = 0,33 ; 5 semaines = 1,03 ng/ml ; $F = 4,20$; $P < 0,01$). Des différences non significatives ont été observées entre les fils des différents pères ($A = 0,78$; $B = 0,65$ et $C = 1,00$ ng/ml) et selon les génotypes ($F+ = 0,94$; $++ = 0,61$; $XX = 0,73$ ng/ml). Après transformation logarithmique des valeurs de LH, aucune différence entre les fils des pères A, B et C n'a été détectée, mais il apparaît une différence significative entre les agneaux F+ et ++ ($F = 1,69$; $P < 0,05$), les F+ ayant une valeur supérieure à celle des ++.

*** Les agneaux BooRo (Tableau 1)**

Les teneurs plasmatiques moyennes en LH augmentent significativement entre 2 (0,48 ng/ml) et 6 semaines d'âge (1,10 ng/ml) et par la suite restent à cette valeur. De 3 semaines d'âge et après, les agneaux F+ montrent un niveau de LH légèrement plus élevé, mais non significativement, que celui des agneaux ++ ($F+ = 1,04$ vs $++ = 0,79$ ng/ml). La transformation logarithmique des valeurs de LH ne modifie pas ce résultat. L'origine partenelle influence significativement les concentrations plasmatiques en LH ($F = 3,12$; $P = 0,006$). par contre, le mode d'allaitement n'influence pas les niveaux de LH.

La répétabilité des mesures est presque nulle, quelque soit l'expression, le génotype et le type génétique. Les valeurs moyennes des concentrations en LH et de FSH plasmatiques par animal sont significativement et positivement corrélées ($r = + 0,30$; $P = 0,05$).

3.3.3 Testostérone

* Les agneaux BooMa (Tableau 1)

Les teneurs plasmatiques de testostérone augmentent continuellement de 2 à 9 semaines d'âge (0,33 à 0,67 ng/ml ; F = 8,68 ; P < 0,01). Comme la LH, la testostérone ne montre aucune différence significative selon le père (A, B, et c) ou selon le génotype (F+ et ++). Après transformation logarithmique des valeurs de testostérone, les agneaux porteurs du gène "F" ont des valeurs significativement plus élevées que celles des agneaux ++ (F = 5,69 ; P < 0,01). Les teneurs plasmatiques moyennes en testostérone et en LH par animal sont significativement et positivement corrélées (r = + 0,43 ; P < 0,05), quelque soit le type génétique.

* Les agneaux BooRo (Tableau 1)

Les concentrations moyennes de testostérone sont significativement plus faibles chez les agneaux F+ que chez les agneaux ++ (F+ = 1,14 vs ++ = 1,30 ng/ml ; F = 3,60 ; P = 0,06). Ceci est essentiellement dû à la différence observée aux environs de 6 semaines d'âge. Il est observé aussi un effet paternel significatif (F = 3,15 ; P = 0,005). Les agneaux allaités artificiellement ont un niveau de testostérone plasmatique significativement plus bas que ceux qui sont allaités par leur mère (artificiel : F+ = 1,03 vs ++ = 0,91 ; maternel : F+ = 1,39 vs ++ = 1,42 ng/ml ; F = 3,88 ; P = 0,05).

Tableau 1: Les teneurs plasmatiques moyennes en FSH, LH et testostérone de 2 à 9 semaines d'âge chez les mâles croisés: BooMa (A) et BooRo (B); analyse de variance et valeurs des moindres carrés .** P<0,01; * P<0,05; XX: génotype inconnu.

Source de variation	n	ddl	FSH	LH	Testo
A) BooMa:					
-Age	92	7	F=8,61 **	F=4,20 **	F=8,68
**					
-Père	92	2	F=4,21 **	F=2,17 NS	F=2,81
NS					
-Génotype	92	2	F=5,77 **	F=1,21 NS	F=1,00
NS					
moyenne:					
.F+	9		6,10	0,94	0,50
.XX	73		5,65	0,73	0,58
.++	10		5,20	0,61	0,63
B) BooRo					
-Père	69	9	F=2,34 **	F=3,12 *	F=3,15
*					
-Génotype	69	1	F=4,93 **	F=1,71 NS	F=3,60
*					
Mode d'allait ^t	1		F=9,90 **	F=0,63 NS	F=3,83
*					
moyenne:					
F+	50		5,47	1,04	1,1
++	19		4,61	0,79	1,3

4. LES ANIMAUX ADULTES

4.1 - FSH

* Les béliers BooMa (Tableau 2)

Les concentrations plasmatiques de FSH sont plus faibles à 11 mois (4,38 ng/ml) qu'à 5 semaines d'âge (5,59 ng/ml). Elles augmentent à nouveau durant la 2ème année de vie (18 mois : 5,97 ng/ml). Il n'y a pas de variations significatives ni selon le génotype ni selon le père.

* Les béliers BooRo (tableaux 3 et 4)

Les teneurs plasmatiques moyennes en FSH sont significativement plus faibles au début du printemps (1,74 + 0,01 ng/ml) qu'au milieu de l'été (4,51 + 0,51 ng/ml) où elles égalent les valeurs observées avant la puberté.

Quelque soit la saison, les mâles ++ ont des niveaux de FSH plus faibles (-15%), mais pas significativement, que les mâles F+ (au printemps : ++ = 1,60 cs F+ = 1,80 ; en été : ++ = 4,18 vs F+ = 4,88 ng/ml). Un mois après castration, les teneurs en FSH plasmatique sont multipliées par six pour les deux génotypes (avant : 4,50 + 0,5 vs après : 27,90 + 3,40 ng/ml). Cependant, il n'y a pas de variations en fonction du génotype (F+ = 30,70 + 4,3 ; ++ = 23,90 + 4,7 ng/ml). Les implants de testostérone placés pendant 15 jours n'ont pas modifié les teneurs plasmatiques en FSH (30,2 + 1,80 ng/ml).

4.2. LH

* Les béliers BooMa (tableau 2)

Les concentrations plasmatiques moyennes en LH sont identiques chez l'agneau prépubère et chez l'adulte (0,72 ng/ml). Ces teneurs en LH ne montrent pas de variations saisonnières significatives bien que le nombre de pulses de LH/10 heures soit plus élevé en automne (11 mois = 2,4 ; 23 mois = 1,6) que durant le printemps à 18 mois d'âge (1,1). Aucune différence significative en fonction du génotype ou de l'origine paternelle n'a été observée ni pour le nombre de pulses ni pour les teneurs moyennes plasmatiques (Tableau 2). Le profil de sécrétion et le nombre de pulses n'ont jamais été constants pour un animal donné durant la saison sexuelle (11 et 23 mois ; Fig. 1).

* Les béliers BooRo (tableau 4)

Les concentrations plasmatiques en LH des mâles pendant les périodes prépubère et adulte sont similaires (1 ng/ml). Ces teneurs ne varient pas significativement en fonction du génotype chez les béliers adultes BooRo (F+ = 1,16 + 0,45 ; ++ = 0,89 + 0,30 ng/ml).

4.3. Testostérone

* Les béliers BooMa (Tableau 2)

Les teneurs plasmatiques moyennes en testostérone augmentent avec la puberté et plus tard présentent des différences saisonnières significatives avec un minimum pendant le printemps aussi bien pour les concentrations moyennes que pour la pulsativité sur une période de 10 heures (1,0) lorsqu'on les compare avec les valeurs de l'automne (moyenne : 6,2 ng/ml ; nombre de pulses : 2,7). Aucune différence selon le génotype ou l'origine paternelle n'est observée pour ces paramètres. Comme pour la LH, les valeurs de testostérone obtenues en automne varient selon les années (Fig. 1).

* Les béliers BooRo (Tableau 4)

Après la puberté, les concentrations plasmatiques de testostérone augmentent par un facteur trois. Ces valeurs sont plus faibles pendant le printemps (3,6 + 0,3 ng/ml) que durant l'été (4,3 + 0,9 ng/ml) et on n'observe pas de variations en fonction du génotype (F+ = 3,9 + 0,5 ; ++ = 3,4 + 0,2 ng/ml).

Chez les béliers adultes, BooMa ou BooRo, le rapport entre les teneurs moyennes en testostérone et LH est identique (2,8) durant la saison non sexuelle.

Tableau 2 : Les paramètres de sécrétion de la FSH, la LH et la testostérone à différents âges (11, 18 et 24 mois) en fonction du génotype (F+, ++ et XX inconnu) chez les mâles croisés BooMa. **P<0,01; *P<0,05.

source de variation	n	ddl	Moy. FSH	Moy. LH	Nbre Pulses LH/10h	Moy. Testo	Nbre Pulses Testo/10h
Génotype F=1,76NS à 11 mois	60	2	F=0,59NS	F=4,69*	F=1,74NS	F=4,03*	
F+	6		4,23	0,80	2,83	7,16	2,66
++	8		4,64	0,91	3,00	8,06	3,50
XX	46		4,37	0,69	2,24	5,10	2,59
Génotype F=0,81NS à 18 mois	31	2	F=2,56NS	F=1,63NS	F=1,99NS	F=0,12NS	
F+	9		6,12	0,61	0,78	1,81	0,89
++	10		5,63	0,60	1,00	1,65	0,90
XX	12		6,15	0,66	1,50	1,64	1,25
Génotype F=0,28NS à 23 mois	29	2	F=1,28NS	F=0,31NS	F=0,66NS	F=1,70NS	
F+	9		6,72	2,48	1,44	8,40	1,44
++	10		8,24	2,54	1,50	5,64	1,30
XX	10		7,54	2,42	1,90	6,30	1,60
Père à 11 mois	60	2	F=2,50NS	F=0,33NS	F=2,58NS	F=0,65NS	F=3,47*
Père à F=0,05NS 18 mois**	31	2	F=0,32NS	F=0,52NS	F=0,26NS	F=0,79NS	
père à F=0,28NS 23 mois	29	2	F=1,28NS	F=0,31NS	F=0,66NS	F=1,70NS	

Moy.:moyenne; Testo: testostérone; : Automne; **:printemps

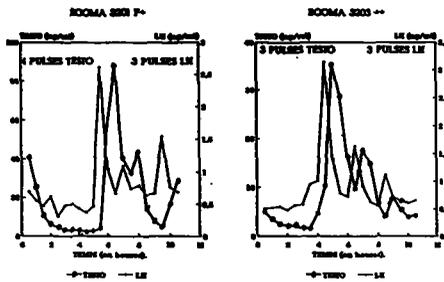
Tableau 3: Les concentrations moyennes en FSH avant et après castration et avec ou sans implant de testostérone chez les mâles adultes BooRo.

	Avant castration	Après castration	
		0 testo	+ testo
F+	4,1±2,0	30,9±4,7	35,3±4,6
++	4,9±1,3	23,2±4,8	24,7±4,4

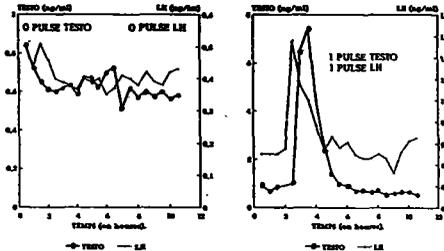
Tableau 4: Concentrations plasmatiques en FSH, LH et testostérone à 14 mois au printemps en période de repos sexuel chez des mâles Booroola x Romanov.

Genotype	n	FSH	LH	TESTO
.F+	10	1,89 ± 0,13	3,90 ± 0,46	1,16 ± 0,17
.++	10	1,60 ± 0,14	3,40 ± 0,22	1,16 ± 0,21

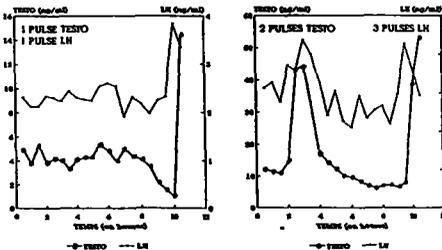
Fig. 1: Les profils de sécrétion de LH et de testostérone à différents âges chez des mâles adultes Booroola représentatifs (1 F+ et 1 ++).



Profils de sécrétion de LH et testostérone à l'âge de 11 mois (Automne)



Profils de sécrétion de LH et testostérone à l'âge de 18 mois (Printemps)



Profils de sécrétion de LH et testostérone à l'âge de 24 mois (Automne)

5. DISCUSSION

Les teneurs plasmatiques en FSH et LH indiquent une augmentation similaire durant les premières semaines de vie dans les deux types de croisements, avec un maximum aux environs de 5-7 semaines d'âge. Ce phénomène est indépendant du début de la croissance testiculaire rapide qui arrive plus tôt chez les agneaux BooRo (entre 6 et 8 semaines) et plus tard chez les agneaux BooMa (à 23 semaines d'âge ; SECK , 1987). La sécrétion de testostérone a augmenté, de la 3ème semaine et au delà, plus rapidement chez les BooRo que chez les BooMa. Cette augmentation des teneurs en gonadotropines et en testostérone durant la période prépubère avait déjà été décrite (Courot et al. 1975 ; Cotta et al. 1978 ; Garnier et al. 1978 ; Lafortune et al. 1984). Pendant la période néonatale chez les BooMa, les valeurs de LH et de testostérone, après transformation logarithmique, montrent des différences génotypiques significatives; les agneaux porteurs du gène "F" ayant plus de LH et moins de testostérone. En fait, ces transformations logarithmiques permettent une diminution des variations dues à la pulsabilité de ces hormones. Cette méthode a été utilisée par Montgomery et al. (1989) pour les valeurs de FSH.

Chez les agneaux mâles l'expression du gène "F" pourrait être reliée aux variations des gonadotropines plasmatiques observées durant la période prépubère. Des variations analogues ont été observées chez les agnelles BooMa, les porteuses du gène "F" ayant des teneurs plasmatiques plus élevées durant les premiers mois de vie (Fernandez-Abella 1985 ; Elsen et al. 1988). Montgomery et al. (1989), chez les agneaux croisés Romney x Booroola, ont obtenu ce même résultat chez la femelle, par contre, n'ont trouvé aucune différence chez le mâle. Cependant, leurs agneaux qu'ils soient FF ou ++ sont issus d'un seul père FF ou ++. Ainsi, ils ne tiennent pas compte des variations individuelles qui pourraient exister entre les pères et qui dans notre cas sont apparus comme étant importants. Par ailleurs, Purvis et Ford (1987) ont comparé des agneaux F+ issus d'un seul père à 6 agneaux Mérino et ils ont observé moins de FSH chez les animaux Booroola. Cette observation pourrait provenir des différences soit génétiques comme celles observées entre les agneaux Mérinos d'Arles et BooMa soit individuelles entre les pères (SECK et al. 1988). Plus récemment, dans une expérience plus large avec trois pères FF, et deux ++, portant sur 51 agneaux mâles, Purvis et al. (1989) concluent à une absence de variations génotypiques mais observe un effet paternel significatif. Chez les BooMa, les agneaux F+ et ++ sont issus de trois pères F+ permettant ainsi une séparation claire de l'influence paternelle et du facteur génotype, chaque père ayant des fils F+ et ++.

Chez l'adulte ces différences n'apparaissent plus : les teneurs en FSH ne sont pas plus élevées chez les agneaux F+ que ++, quelque soit le croisement, BooRo ou BooMa, et la saison. La castration ne révèle aucune différence à long terme pour les teneurs plasmatiques en FSH chez l'adulte, que ce soit en présence ou absence d'implants de testostérone. Par contre, au cours de la recrudescence saisonnière du testicule ou bien peu de temps après castration, Price et al. (1991) observent des variations temporaires de FSH. Ceci indiquerait qu'un mécanisme

temporaire modifiant le rétrocontrôle des hormones gonadotropes intervient chez l'adulte comme chez le jeune dans l'expression du gène F de prolificité. Ce résultat relativise l'hypothèse de Bindon et al. (1985) dans laquelle les auteurs suggèrent la possibilité pour le testicule adulte fonctionnel de masquer les différences potentielles de concentrations en gonadotropines entre des mâles Booroola porteurs du gène et des Mérino non prolifiques.

Chez les béliers adultes BooMa, ni les teneurs plasmatiques moyennes ni le nombre de pulses de LH ou de testostérone ne présentent des différences génotypiques significatives. Par contre, Martin et al. (1987) ont observé que les pulsatilités de la LH et de la testostérone chez des béliers Booroola sont deux fois plus élevées (22/24hr) que celles des béliers Mérino. Ces valeurs semblent très élevées comparées à celles de D'Occhio et al. (1984), Poulton and Robinson (1987) et les nôtres 53/10 hr) durant l'activité sexuelle, même si le sang a été prélevé à des fréquences différentes selon les auteurs. Martin et al. (1987) ont imputé cette différence à la présence du gène "F" chez les mâles croisés Booroola ; le gène "F" étant absent chez les béliers témoins Mérino. Cependant, ils notent dans leur discussion que le génotype de leurs mâles croisés Booroola n'a pas été déterminé mais pensent que certains d'entre eux sont porteurs du gène. De plus, leur analyse ne repose que sur une série de prélèvements sur une seule saison, négligeant la répétabilité de ces résultats d'une saison à l'autre et d'une année à l'autre. Les mâles sur lesquels nous avons travaillé ont été prélevés à 11, 18 et 23 mois ; la variabilité dans les résultats ne permet aucune caractérisation individuelle ou génotypique. Le fait que ces hormones soient très liées à l'état physiologique de l'animal et que ce dernier soit dépendant de plusieurs autres facteurs, rend ce paramètre difficile à maîtriser. La diversité des résultats présentés ici en est une illustration parfaite.

Même s'il a été possible de trouver des différences significatives au niveau de la FSH entre les jeunes mâles F+ et ++, il apparaît clairement que cela n'est pas suffisant pour trier les porteurs des non porteurs du gène "F". En effet, les analyses discriminantes et les tests de bimodalité effectués n'ont jamais pu révéler deux populations de mâles F+ et ++ totalement distinctes (SECK, 1987). Chez l'adulte, il n'y a aucune différence convaincante entre les mâles F+ et ++ sans doute parce que le gène de prolificité correspond à un mécanisme de rétrocontrôle qui modifierait des équilibres endocriniens, peu faciles à analyser

6. REFERENCES

- BACHACOU J., MASSON J.P., MILLIER C., 1981. Manuel de la programmatisation statistique AMANCE. 427-448. INRA Ed. Champenoux.
- BINDON B.M., PIPER L.R., 1986. The reproductive biology of prolific sheep breeds. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 8, 414-451.

- BINDON B.M., PIPER L.R., CUMMINS L.J., O'SHEA T., HILLARD M.A., FINDLAY J.K., ROBERTSON D.M., 1985.** Reproductive endocrinology of prolific sheep : studies of the Booroola Merino. pp 217-235. In : "Genetics of reproduction in sheep", R.B. Land & D.W. Robinson Eds, Butterworths, London.
- BLANC M.R., POIRIER J.C., 1979.** A new homologue radioimmunoassay for ovine follicle stimulating hormone : development and characterization. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 19, 1011-1026.
- COTTA Y., TERQUI M., PELLETIER J., COUROT M., 1975.** Testostérone et LH plasmatiques chez l'agneau de la naissance à la puberté. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D* 280, 1473-1476.
- COUROT M., de REVIERS M.M., PELLETIER J., 1975.** Variation in pituitary and blood LH during puberty in the male lamb. Relation to time of birth. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 15, 509-516.
- D'OCCHIO M.J., SCHANBACHER B.D., KINDER J.E., 1984.** Profiles of LH, FSH, testostérone and prolactin in rams of diverse breeds : effects of contrasting short (8L : 16 D) photoperiods. *Biol. Reprod.* 30, 1039-1054.
- EARL C.R., MALE R.H., BINDON B.M. PIPER L.R., RUSSELL D, FINDLAY J., 1989.** Plasma inhibin in rams of differing Booroola genotypes. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 21, 5.
- ELSEN J.M., CORNU C., BODIN L., THIMONIER J., BOOMAROV O., 1988.** FSH plasma levels during the post natal period and natural ovulation rate in Booroola x Romanov females. 3rd World Cong. Sheep and Beef Cattle Breeding. Paris. Vol 3, 667-669.
- FERNANDEZ-ABELLA D., 1985.** Contribution à l'étude endocrinienne comparée des brebis Mérinos d'Arles et des brebis prolifiques, Mérinos x Booroola. Thèse Doc. Ing., Rennes I.
- GARNIER D.H., COTTA Y., TERQUI M., 1978.** Androgén radioimmunoassay in the ram ; results of direct plasma testostérone and dehydroepiandrosterone measurement and physiological evaluation. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18, 265-281.
- HOCHEREAU-de REVIERS M.T., COPIN M., SECK M., MONET-KUNTZ C., CORNU C., FONTAINE I., PERREAU C., ELSEN J.M BOOMAROV, 1990** Stimulation of Stimulation of testostérone production by PSSG injection in the ovine male : effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the "F" gene. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 21-32.

- LAFORTUNE E., BLANC M.R., ORGEUR P., PELLETIER J., PERREAU C., TERQUI M., HOCHEREAU-de REVIERS M.T., 1984.** Comparison of the evolution of LH, FSH and testosterone in male spring born lambs of two different breeds. *Reprod. Nutr. Develop.* 24, 947-952.
- MARTIN G.B., SUTHERLAND S.R.D., LINDSAY D.R., 1987.** Effects of nutritional supplements on testicular size and the secretion of LH and testosterone in Merino and Booroola rams. *Anim. Reprod. Sci.* 12, 267-281.
- MERRIAM G.R., WATCHER K.W., 1982.** Algorithmes for study of episodic hormone secretion. *Anim. J. physiol.* 12, 310-318.
- MONTGOMERY G.W., SCOTT I.C., LITTLEJOHN R.P., DAVIS G.H., PETERSON A.J., 1989.** Concentrations of FSH are elevated in new-born ewe lambs carrying the Booroola "F" gene but not in lambs from a prolific Romney strain. *Reprod. Fert. Dev.* 1, 299-307.
- PELLETIER J., GARNIER D.H., de REVIERS M.M., TERQUI M., ORTAVANTR., 1982.** Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. *J. Reprod. Fert.* 64, 341-346.
- POULTON A.L., ROBINSON T.J., 1987.** The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. *J. Reprod. Fert.* 79, 609-626.
- PURVIS I.W., FORD J.R., 1987.** Plasma FSH concentrations in ram lambs carrying the Booroola fecundity "F" gene. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 18, 57.
- PURVIS I.W., FORD J.R., 1987.** Plasma FSH in Merino ram lambs with and without the Booroola "F" gene. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. Proc.* 21, 10.
- PRICE C.A., HUDSON N.L., McNATTY K.P. 1991.** Differences in LH and FSH secretions in adult rams with respect to the Booroola fecundity gene. In "Second International Workshop on Major genes for Reproduction in Sheep". Toulouse (France). July 16-18, 1990, Ed. INRA.
- SECK M., 1987.** Comparaisons de paramètres endocriniens (LH, FSH et testostérone) et testiculaires entre mâles ovins Mérinos d'Arles et croisés Booroola x Mérinos d'Arles porteurs et non porteurs du gène majeur de prolificité "F". Thèse de Doct. USTL, Montpellier II.

SECK M., HOCHEREAU-de REVIERS M.T., BOOMAROV O., 1988.
Comparaisons des teneurs plasmatiques en hormone gonadotrope FSH, durant les trois premiers mois de vie, chez des agneaux mâles, porteurs ou non du gène "F" de prolificité. C. R. Sci. Paris, Série III. 307, 433-437.

7. REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel des domaines expérimentaux du Merle (Salon de Provence 13) et de la Sapinière (Bourges 18) pour les soins donnés aux animaux et le personnel de la station de Physiologie de la Reproduction pour son aide dans la réalisation des dosages hormonaux. Ce travail a été effectué grâce à un financement AIP INRA.

PLACE DE LA CONGELATION DANS LES TECHNIQUES DE REPRODUCTION ANIMALE ET EXEMPLES DE METHODES PROPOSEES POUR L'EMBRYON BOVIN.

A. MASSIP

Sciences Vétérinaires, Université Catholique de Louvain 3, Place Croix du Sud - 1348 - Louvain-La Neuve, Belgique.

La technique de l'insémination artificielle et plus tard celle de la transplantation embryonnaire ont permis de réaliser des progrès considérables en sélection animale.

La congélation du sperme et des embryons a grandement facilité et accru la diffusion du progrès génétique. Voyons tout d'abord quelle est sa place dans la génétique et la reproduction animale puis nous donnerons quelques exemples de méthodes simples et congélation d'embryons bovins.

1. PLACE DE LA CONGELATION DANS LA GENETIQUE ET LA REPRODUCTION ANIMALE

Les progrès de la recherche en biologie ont accru le pouvoir de l'homme sur le vivant. Dans deux domaines, la reproduction et la génétique, des bouleversements importants sont en train de marquer notre époque : les physiologistes ont appris à maîtriser les cycles de reproduction des principales espèces domestiques et la biologie moléculaire avec le concours du génie génétique, nous permet d'envisager maintenant la création artificielle de nouvelles races.

On méconnaît souvent le rôle que joue la congélation dans les applications de ces connaissances, tant à l'économie des productions animales que maintenant en médecine.

1.1 Insémination et congélation de la semence

La mise en évidence en 1949 par Polge et ses collaborateurs des propriétés cryoprotectrices du glycérol sur les gamètes de mammifères et son utilisation pour la congélation de la semence bovine a permis la mise en place d'une véritable industrie de l'insémination artificielle, sur laquelle repose l'organisation de l'amélioration génétique (Inskeep et Peters, 1981). Si la semence congelée est employée de façon rationnelle dans une population animale

importante, on peut espérer obtenir un progrès génétique annuel de 3% (Van Vleck, 1981). Ainsi, grâce à l'insémination artificielle, la production des bovins laitiers a augmenté en moyenne de 10 litres par an pour atteindre aujourd'hui des productions annuelles moyennes supérieures à 6.000 litres de lait.

La congélation de la semence et avec elle l'insémination artificielle permettent aussi d'introduire dans les élevages d'autres technologies qui visent à la maîtrise de la reproduction du troupeau. C'est le cas notamment avec la synchronisation des cycles des femelles obtenue soit à l'aide de progestagènes - Thibier, 1976 ; Aguer, 1981) ou de prostaglandines (Steffan, 1981). Ces techniques de synchronisation des cycles et d'induction de l'ovulation sont actuellement bien maîtrisées : chez les bovins en moyenne plus de 80% des jeunes génisses "synchronisées" et près de 75% des vaches adultes peuvent devenir gestantes après insémination effectuée au moment de l'extériorisation de l'oestrus. Grâce à elles, l'éleveur peut organiser la répartition dans le temps de son travail et planifier sa production.

1.2. Transfert d'embryons et congélation des embryons

La maîtrise des cycles et du moment de la fécondation a favorisé le développement d'une autre technique, le transfert embryonnaire. Cette méthode de reproduction surtout utilisée chez les bovins mais également chez les ovins et caprins permet d'augmenter la descendance des meilleures femelles d'une race ou d'un troupeau donné, mais aussi de réaliser une sélection à partir de ces femelles et donc d'augmenter la valeur génétique d'un troupeau. Dans les pays africains, le transfert d'embryons de bovins NDama a permis de développer l'élevage de cette race trypanotolérance (Jordt et al., 1986 ; Lefèvre 1988 ; Thibier, 1988). Une autre race particulièrement intéressante de ce point de vue et pour sa faculté d'adaptation est la race italienne maremme qui est une race des régions difficiles et très robuste.

La transplantation embryonnaire comprend une série d'étapes dont la maîtrise conditionne le succès final (voir revue par Nibart et Bouyssou, 1981). La première de ces étapes consiste à faire produire à la donneuse un grand nombre d'ovules en stimulant ses ovaires avec des hormones gonadotropes qui permettent la croissance de plusieurs follicules. L'ovulation est assurée par l'administration de prostaglandines et la fécondation par insémination. Les embryons sont récupérés 6 à 8 jours après l'insémination par lavage de l'utérus des femelles donneuses à l'aide d'une solution physiologique. Au cours des dernières années le rendement de la production d'embryons s'est amélioré sensiblement grâce à l'utilisation d'hormones gonadotropes hypophysaires porcines pures (Beckers, 1987) telles que le Stimufol (Mérieux) et à une modification du protocole de stimulation ovarienne impliquant une préstimulation en début de cycle (Touati et al., 1989, 1991). C'est ainsi que le nombre moyen d'embryons utilisables par donneuse est passé de 5,1 avec un traitement classique (35 mg Armour de FSH en 4 jours) à 7,5 avec un traitement comportant une préstimulation aux jours 3 et 4 avec 2,5 mg Armour.

Les progrès de la biologie moléculaire permettent actuellement d'envisager l'utilisation de FSH bovine produite par recombinaison et les résultats connus à ce jour sont très encourageants puisque le pourcentage d'embryons viables est supérieur à 80% (Wilson cité par Massey, 1990). Les taux de gestation obtenus après transfert non chirurgical d'embryons frais sont voisins de ceux qui résultent d'une insémination artificielle c'est-à-dire 60% quand l'ensemble des conditions techniques et d'élevage est bien maîtrisé. La démonstration faite en 1972 (Whittingham et al.) que l'embryon de mammifère pouvait survivre après congélation dans l'azote liquide, a eu pour conséquence de modifier le commerce international d'animaux : la diffusion du progrès génétique peut maintenant se faire au moyen d'embryons congelés et bénéficier aux pays qui jusqu'alors ne pouvaient que lentement, par croisement avec des races locales, améliorer leur cheptel.

La congélation, qui permet de dissocier dans le temps, la collecte, du transfert, simplifie considérablement les interventions techniques : de ce point de vue, la maîtrise de la congélation de l'embryon constitue un tournant décisif dans le développement de la transplantation embryonnaire.

La congélation peut être envisagée comme un moyen de sauvegarder certaines races ou espèces sauvages en voie de disparition. Il est important en effet d'éviter la perte irréversible d'un potentiel génétique qui pourrait retrouver un intérêt dans une conjoncture économique différente.

Sur la plan sanitaire, la congélation des embryons constitue un atout pour préserver le potentiel d'un cheptel voué à l'abattoir en cas d'épidémie. Banques de sperme, banques d'embryons : une mutation profonde de la place de la reproduction dans l'économie de l'élevage est en cours.

1.3 Nouvelles technologies et congélation

De nouvelles technologies font leur apparition telles que :

La production d'embryons *in vitro* et les "manipulations génétiques" (First, 1990). La production d'embryons *in vitro* présente un intérêt sur le plan commercial mais surtout sur le plan fondamental pour l'étude du développement embryonnaire précoce. Ces embryons sont issus d'ovocytes immatures prélevés sur des ovaires d'animaux abattus. Les ovocytes sont maturés, fécondés et cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyte. La congélation des ovocytes, quand elle sera maîtrisée, permettra de constituer des banques au même titre que les banques de sperme et l'on aura ainsi la possibilité de choisir les croisements à effectuer. Cette réserve de gamètes femelles pourra être utilisée également pour le clonage des embryons par transfert de noyaux dans des ovocytes énucléés. Enfin, les oeufs fécondés, au stade des pronoyaux, seront stockés pour servir aux expériences de transferts de gènes par microinjection.

Le terme "manipulation génétique" est largement utilisé aujourd'hui pour désigner deux types d'interventions différentes :

- l'une concerne le clonage c'est-à-dire l'obtention à partir d'un seul embryon, de plusieurs individus génétiquement identiques ;

- l'autre, nommée "transgénèse" consiste à modifier les caractéristiques génétiques d'un animal en greffant dans son génome des fragments d'ADN étranger.

La production de jumeaux identiques constitue un premier pas vers le clonage. Elle consiste à couper en deux un embryon précoce avant le stade blastocyste ou au stade blastocyste (Fig.1) : les deux moitiés sont capables de conduire chacune un développement normal et les résultats satisfaisants permettent leur application (Nibart, 1991). Avant la première différenciation des cellules en amas interne et trophoblaste les embryons peuvent éventuellement être dissociés en blastomères individuels ou groupes de blastomères pour obtenir des triplés ou des quadruplés (Walladsen, 1982). Les résultats insuffisants de cette dernière technique empêchent cependant toute application.

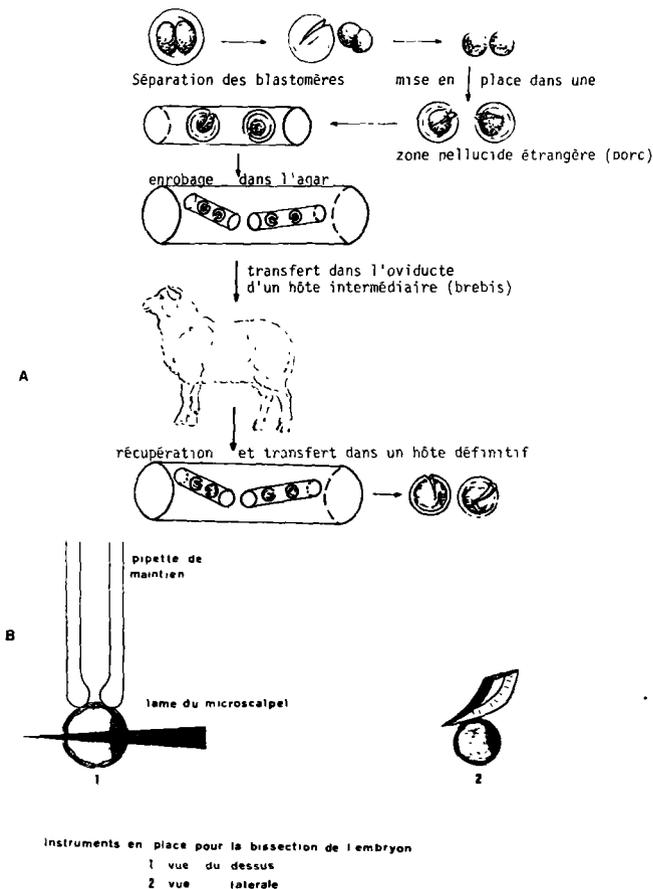


Fig. 1 : Méthodes de production de jumeaux identiques
A) par séparation de blastomères
B) par bissection de blastocystes

Un deuxième pas vient d'être franchi avec une autre méthode, le transfert nucléaire qui permet d'obtenir plusieurs animaux à partir d'un seul embryon. La technique consiste à prélever le noyau d'un embryon au début de son développement (4 à 16 cellules) et à le replacer dans un oeuf préalablement énucléé (Fig.2). Cette méthode délicate (Mc Grath et Solter, 1983) utilisée en laboratoire pour les études fondamentales, est appliquée actuellement aux espèces domestiques (Prather et First, 1990) avec des résultats notoirement insuffisants (Willadsen et al., 1991).

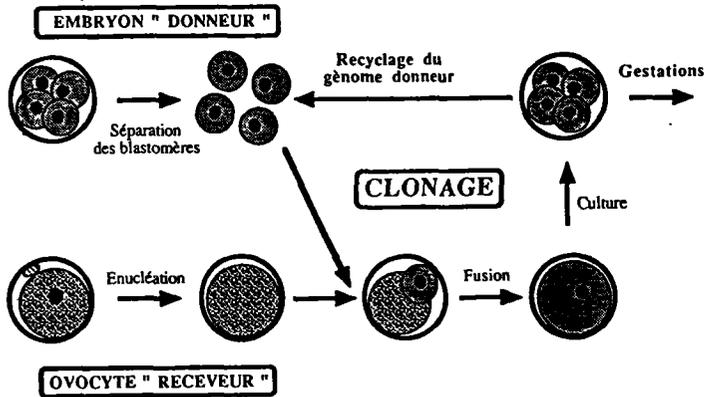


Fig. 2 : Transfert de noyaux de blastomères dans des ovocytes énucléés pour produire des clones.

Tout récemment des lapereaux clonés sont nés à partir d'embryons donneurs de noyaux et d'ovocytes préalablement congelés (Heyman et al., 1990). La congélation des embryons produits après scission ou transfert nucléaire permettra de prédire avant la décongélation le sexe et les caractéristiques zootechniques du futur animal dont un exemplaire aura été préalablement étudié. Si on complète par des analyses l'étude des caractéristiques génétiques des cellules de la fraction d'embryon qui n'est pas congelée, on pourra alors grâce à la congélation fournir aux éleveurs des animaux "sur mesure" en associant à son tour une autre technique : la transgénèse.

La transgénèse consiste à modifier artificiellement le génome des animaux et permet, en laboratoire, d'étudier l'expression des gènes au cours du développement directement sur l'animal. Les résultats les plus spectaculaires datent de 1982 (Palmiter et al., 1982). Ce sont les fameuses souris devenues géantes parce qu'ayant intégré dans leur patrimoine génétique les gènes commandant la croissance de rats. Le développement que connaît aujourd'hui la biologie moléculaire permet d'analyser de façon très précise les séquences de nucléotides de l'ADN : cette molécule qui porte l'information contenue dans les milliers de gènes qui définissent les caractéristiques d'un organisme, constitue une partie des chromosomes du noyau des cellules. Grâce au génie génétique, on sait maintenant maîtriser les manipulations de ces gènes dans les bactéries. Mais pour comprendre quels sont les messages chimiques qui interviennent dans la mise en activité ou en sommeil des gènes d'un organisme, il faut pouvoir "greffer"

ces gènes directement dans les cellules animales. Actuellement plusieurs méthodes sont expérimentées en laboratoire et l'on cherche à définir les conditions qui permettraient un taux élevé d'expression des gènes dont on souhaite percer les mécanismes de fonctionnement. Dans ces méthodes la congélation intervient à plusieurs niveaux et permet surtout d'organiser l'ensemble des interventions que nécessite la fabrication de ces animaux transgéniques.

En se combinant l'une à l'autre, les méthodes de reproduction artificielle que nous venons de décrire dessinent les contours de ce que pourra devenir la sélection animale. Celle-ci, de plus en plus, bénéficiera du contrôle croissant des processus biologiques de la reproduction. Dans ce contrôle, la conservation des gamètes et des embryons occupe une place importante qui implique une bonne maîtrise des techniques de congélation.

2. EXEMPLES DE METHODES DE CONGELATION D'EMBRYONS BOVINS

Les méthodes de conservation des gamètes et embryons des animaux de ferme ont été passées en revue par Renard (1984), Massip et al. (1987), Niemann (1991). Nous nous intéresserons uniquement ici à deux d'entre elles, mises au point dans un souci de simplicité et d'utilisation pratique.

2.1 Méthode classique

La première dérive des méthodes classiques basées sur l'élimination d'une partie de l'eau cellulaire (Fig. 3). Elle utilise le conditionnement individuel de l'embryon en minipaillette dans une goutte de mélange 1,36 M glycérol - 0,25 M Sucrose dans du PBS (phosphate Buffered Saline) contenant 10% de sérum foetal de veau. Cette goutte est séparée par deux bulles d'air d'une solution de sucrose 0,5 M dans du PBS qui servira de dilueur après décongélation. (Fig.4). Après 10 minutes à température ambiante (phase d'équilibration) la paillette est déposée horizontalement dans l'enceinte d'un congélateur biologique programmable prérefroidie à 7°C. La cristallisation est amorcée à cette température maintenue constante pendant 10 minutes après quoi une vitesse de refroidissements de 0,3°C./min. est appliquée jusqu'à - 25°C. et la paillette est ensuite plongée et stockée dans l'azote liquide à - 196°C. Le dégel se fait en agitant la paillette dans de l'eau à 20°C. pendant quelques secondes suivi du transfert direct.

Le rôle du sucrose incorporé au milieu de congélation est essentiellement osmotique. Ne pénétrant pas à l'intérieur des cellules, il entraîne une déshydratation partielle de l'embryon à température ambiante ce qui permet de raccourcir la durée du refroidissement lent. Après décongélation, sa présence limite les mouvements de l'eau à travers les membranes empêchant ainsi une augmentation de volume excessive de l'embryon pendant que le glycérol sort ce dernier.

La paillette présente l'avantage de n'occuper qu'un volume minime (0,25 ml) ce qui permet de stocker un grand nombre d'embryons dans un volume restreint d'azote liquide. De plus ce conditionnement permet de replacer l'embryon directement dans l'utérus de la vache receveuse par une technique aussi simple que celle utilisée en insémination artificielle. Cet aspect est très intéressant du point de vue pratique mais il implique que seuls des embryons de très bonne qualité soient congelés étant donné qu'il n'y a plus de sélection après décongélation. Dans nos conditions de travail, nous avons obtenu un taux de gestation de 55,6% (44 gestations confirmées à partir de 79 embryons congelés et transplantés (Touati et al., 1990).

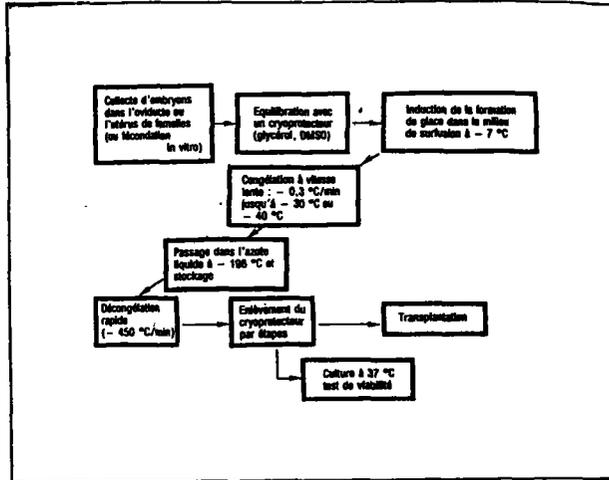


Fig 3 : Principales étapes de la technique de congélation des embryons bovins.

2.2. Vitrification

La deuxième est une méthode de vitrification basée sur la transformation d'un liquide en un état amorphe ou vitreux par augmentation de sa viscosité. Elle implique d'utiliser de très fortes concentrations ou des mélanges de cryoprotecteurs qui peuvent devenir toxiques pour les embryons et des vitesses de refroidissement et de réchauffement très rapides mais ceci est un atout puisqu'il suffit d'immerger directement la paillette contenant l'embryon dans l'azote liquide. Nous avons proposé une technique très simple où deux cryoprotecteurs, le glycérol et le 1,2 propanediol sont mélangés dans des proportions différentes à savoir :

- un mélange contenant 10% de glycérol et 20% de 1,2 propanediol dans du PBS additionné de 20% de sérum de veau foetal (SVF). Ce mélange n'est pas toxique pour les embryons et vitrifie au cours du refroidissement,

- un mélange contenant 25% de glycérol et 25% de 1,2 propanediol comme milieu de vitrification extracellulaire car il ne dévitrifie pas lors du réchauffement contrairement au précédent. Ce mélange est toxique à température ambiante, et il faut éviter d'y exposer les embryons trop longtemps.

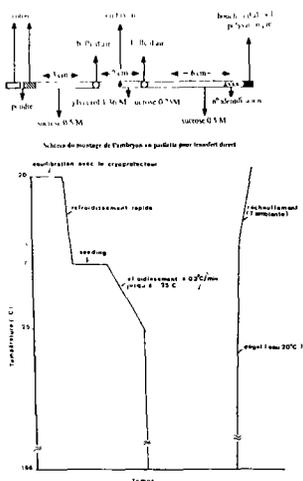
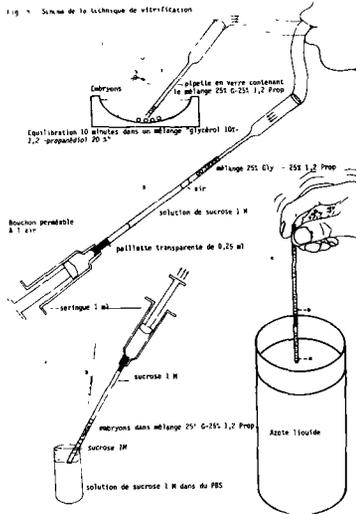


Fig. 2 Schéma de la technique de congélation en glycérol-sucrose pour les blastocystes après le transfert.

Le protocole de vitrification est le suivant (Fig.5) :

1. Les embryons sont placés pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution de PBS 20% - sérum de veau foetal additionnée de 10% de glycérol et 20% de 1,2 propanediol.
2. Après ces 10 minutes ils sont aspirés dans la partie effilée d'une pipette contenant un mélange 25% glycérol - 25% 1,2 propanediol et introduits à l'intérieur d'une minipaillette transparente (0,25 ml/IMV, L'Aigle, France) dans une colonne de ce même mélange mesurant 1 cm.
3. Cette colonne est isolée par deux bulles d'air du reste de la paillette qui est remplie avec une solution de sucrose 1M.
4. Dès que le remplissage de la paillette est terminé, celle-ci est aussitôt plongée progressivement dans l'azote liquide pour y être stockée. Dans l'azote, la colonne de mélange 25% glycérol - 25% propanediol reste transparente alors que la solution de sucrose cristallise et prend un aspect laiteux. Le réchauffement se fait en immergeant délicatement la paillette dans de l'eau à 20°C. Dès que la glace a disparu dans la partie contenant la solution de sucrose, la paillette est retirée de l'eau et son contenu expulsé dans une cupule. Après 10 minutes, les embryons sont lavés 1 à 3 fois dans du PBS + 20% de sérum de veau foetal et transplantés par voie non chirurgicale à des receveuses au cours de cycles naturels. Seize gestations confirmées ont été obtenues sur 42 embryons transplantés (38,1%). Il s'agissait de morulas avancées et de très jeunes blastocystes. Par contre aucune gestation n'a résulté du transfert de blastocystes et nous avons du trouver les

Fig. 4 Schéma de la technique de vitrification



conditions qui permettent leur survie. Ces conditions sont les suivantes (Van der Zwahlen et al., 1989).

- Déposer les blastocystes pendant 13 minutes à température ambiante dans une solution de PBS + 20% de sérum de veau foetal contenant 25% de glycérol puis pendant 7 minutes dans la même solution additionnée de sucrose 0,25M.

- Placer ensuite les embryons en paillette dans le mélange 25% glycérol - 25% 1,2 propanediol prérefroidi à 4°C. et remplacer la solution de sucrose 1M par ce mélange de part et d'autre de la goutte contenant l'embryon. Ceci évite l'éclatement de la paillette lors du réchauffement.

- Plonger délicatement la paillette dans l'azote liquide.

- Le réchauffement se fait en immergeant doucement et en agitant la paillette dans de l'eau à 20°C. suivi de la dilution du contenu dans 1 ml d'une solution de sucrose 1M pendant 10 minutes à température ambiante, puis du lavage des embryons dans 3 bains successifs de PBS + 20% de sérum de veau foetal. Dans ces conditions 7 receveuses ont été gestantes après transfert de 14 embryons et 20 blastocystes sur 35 ont repris leur développement en culture. Ces résultats sont encourageants et rendent la méthode de vitrification attrayante puisqu'elle ne nécessite aucun appareillage. Toutefois elle est assez délicate à manipuler étant donné que l'on utilise des concentrations élevées de cryoprotecteurs donc toxiques d'où la nécessité de définir avec précision et de respecter la température et le temps d'équilibration. Outre la vitrification, il existe aussi des méthodes de congélation ultrarapides où interviennent également des concentrations élevées de cryoprotecteurs (3 à 4 M ou plus) auxquels on associe du sucrose 0,25 à 0,5M. Dans ce cas seul le milieu intracellulaire vitrifie. Dans le milieu extracellulaire de fins cristaux de glace apparaissent mais ils sont inoffensifs si la vitesse de dégel est très rapide.

3. CONCLUSION

La congélation des gamètes et des embryons des animaux domestiques joue un rôle important dans l'économie des productions animales et principalement de la plus importante d'entre elle, la production bovine.

Plusieurs causes ont présidé au large développement des banques de sperme chez les bovins. Au plan technique la technologie de l'insémination artificielle a dans les années 40, réussi à être bien maîtrisée. Ceci a permis à la semence ainsi mise en place de faire jouer successivement ses trois atouts majeurs : sanitaire, génétique et amélioration de l'efficacité de la reproduction, contribuant ainsi à améliorer significativement le revenu des éleveurs (Thibier, 1987). Au plan sanitaire, le remplacement du coït, c'est-à-dire le contact entre reproducteurs mâles (souvent dans le passé, communal ou tout au moins servant dans plusieurs cheptels) et femelle, par l'insémination artificielle a de facto supprimé la source de propagation des maladies vénériennes. Cette substitution a aussi contribué à réduire la contamination des femelles par divers agents pathogènes plus généraux que contribuaient à disséminer les mâles "vagabonds". L'efficacité de l'insémination artificielle pour contribuer à améliorer le niveau génétique d'une population bovine n'est plus à démontrer. L'insémination artificielle a concouru d'une façon décisive à modifier radicalement le paysage de la production bovine, laitière en particulier. Cette action bénéfique a pu s'exercer grâce au pouvoir de multiplication d'un éjaculat en saillie naturelle) permettant donc successivement de choisir, sélectionner les reproducteurs d'élite sur des observations objectives effectuées sur un échantillon limité mais représentatif de la population (inséminations dites de testage pour sélection sur descendance) puis une fois ces derniers éprouvés et reconnus comme étant améliorateurs, diffuser massivement ces gènes. Le troisième atout de l'insémination artificielle est celui de contribuer à améliorer l'efficacité de la reproduction. Ce nouveau concept (Thibier, 1987) est parfaitement d'actualité. Il repose sur les autres technologies de la reproduction présentées au début de ce chapitre et la technologie de la manipulation de l'embryon sera ultérieurement capable de modifier le mode de reproduction dans l'élevage.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. AGUER, D. : Les progestagènes dans la maîtrise des cycles sexuels chez les bovins. *Rec. Med. Vét.* 1981, 157, 53-60.
2. BECKERS, J. F. : Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle. *Theriogenology*, 1987, 27, 213.
3. FIRST, NL : New animal breeding techniques and their application. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 41, 1990, 3-14.
4. HEYMAN Y. CHESNE P et RENARD J.P. : Reprogrammation complète de noyaux embryonnaires congelés après transfert nucléaire chez le lapin. *C.R. Acad. Sci. Paris* 1990, 311, 321-326.

5. **INSKEEP E.K. et PETERS J.B.** : Economic benefits of reproductive management, synchronization et estrus, and artificial insémination in beef cattle and sheep. In "New technologies in animal breeding" Ed. B.J. Brackett, G.E. Seidel et Sarah M. Seidel, Acad. Press. 1981, pp.224-253.
6. **JORDT. MAHON GD. TOURAY BN. NGULO W.K. MORISON M. IRAWLE J. et MURRAY M.** : Successful transfert of NDama embryos into Boran recipients. Vet. Rec. 1986 119, 246-247.
7. **LEFEVRE. P.C.** : Les biotechnologies aux pays des vaches maigres Biofutur, Special Elevage 1988, Nr. 69, 123-127.
8. **MASSEY J.M.** : Animal production industry in the year 200 A.D. J. Reprod. Fert., Suppl. 41 1990, 199-208.
9. **MASSIP A. VAN DER ZWALMEN P. et ECTORS F.** : Cryoconservation de l'embryon bovin ; techniques résultats. Ann. Méd. Vét. 1987, 131, 515-528.
10. **McGRATH.J. et SOLTER D.** : Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science 1983, 220, 1300-1302.
11. **NIBART M. et BOUYSSOU B.** : Le transfert embryonnaire chez les bovins. Rec. Méd. Vét. 1981, 157, 71-87.
12. **NIBART M.** : Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées : bissection et sexage. In : Spécial Reproduction des Ruminants, Rec. Méd. Vét. 1991, 167, 261-290.
13. **NIEMAN H.** : Cryopreservation of ova and embryos from livestock current status and research needs. Theiogenology, 1991, 35, 109-124.
14. **PALMITER RD. BRINSTER RL. HAMMER RE. TRUNBAUER MG. ROSENFELD M. BIRNBERG NC et EVANS RM.** : Dramatic growth of mice that develop from egges microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes. Nature, 1982, 300, 611-615.
15. **POLGE G. SMITH AU. PARKES AS.** : Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949, 164, 666.
16. **PRATHER RS et FIRST NL.** : Cloning embryos par nuclear transfert. J. Reprod. Fert. Suppl. 41, 1990, 125-134.
17. **RENARD JP.** : Methods of conserving gametes and embryos of farm animales. Livest. Prod. Sci. 1984, 11, 49-59.
18. **STEFFAN J.** : Applications thérapeutiques et zootechniques de la prostaglandine F2α chez les bovins. Rec. Méd. Vét. 1981, 157, 61-69.
19. **THIBIER M.** : Quelques aspects récents de la maîtrise des cycles sexuels de la femelle chez les bovins. Rec. Méd. Vét. 1976, 152, 433-442.
20. **THIBIER M.** : L'Insémination Artificielle dans l'espèce bovine, moyen privilégié d'améliorer l'efficacité de la Reproduction. In Annuel de l'Elevage - ITEB - Paris. 1987, 7-18.
21. **THIBIER M.** : Le développement du transfert embryonnaire. Biofutur, Special Elevage 1988, N°69, 109-113.
22. **TOUATI K. BORMANS. M. ECTORS FJ. DELVALA. BECKERS JF. et ECTORS F.** : Effet d'une prestimulation ovarienne en début de cycle sur la réponse au traitement de superovulation chez la vache. Ann. Méd. Vét. 1989, 133, 609-612.

23. **TOUATI K. BORMANS M. ECTORS F. et MASSIP A.** : Congélation d'embryons bovins par la méthode au glycérol-sucrose pour transfert direct, après décongélation. Ann. Méd. Vét. 1990, 134, 249-251.
24. **TOUATI K. BECKERS JF et ECTORS F.** : Hormonal control of folliculogenesis in the bovine : better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment. Theriogenology, 1991, 35, 285. (Abst.).
25. **VAN DER ZWALMEN P. TOUATI K. ECTORS FJ. MASSIP A. BECKERS JF et ECTORS F.** : Vitrification of bovine blastocysts. Theriogenology, 1989, 31, 270 (abstract).
26. **VAN VLECK LD.** : Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning and selfing in dairy cattle. In "New technologies in Animal Breeding". Ed. B.J. Brackett. GE Seidel et Sarah M. Seidel, Acad. Press. 1981, pp. 221-242.
27. **WILLADESEM SM.** : Micromanipulation of embryos of the large domestic species, 1982. In "Mammalian Egg Transfert" pp. 185-210. Ed. C.E. Adams CRC Press Boca Raton.
28. **WILLADSEN SM, JANZEN RE, Mc ALISTER RJ, SHEA BR, HAMILTON G et Mc BERNAND D.** : The Viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. Theriogenology 1991, 35, 161-170.
29. **WHITTINGHAM DG. LEIBO SP et MAZUR P.** : Survival of mouse embryos frozen to - 196°C. and - 269°C. Sciences, N.Y. 1972, 178, 411-414.

ETUDE DES PROTEINES PRESENTES DANS LE LIQUIDE DU RETE TESTIS (RTF) ET DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CELLULES DE SERTOLI CHEZ DES CROISES BOORoola F+ ET ++

M. SECK Département de Biologie animale, Faculté des Sciences, Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, Sénégal.
M.A. DRIANCOURT, C. PISSELET, C. PERREAU, M.T. HOCHEREAU-de REVIERS INRA, Station de Physiologie de la Reproduction, URA CNRS 1291, 37 380 Nouzilly, France.

1. INTRODUCTION

Chez la femelle, l'expression du gène Booroola est mesurée par le taux d'ovulation (Bindon et al. 1982). Chez le mâle, les marqueurs du gène "F" ont été peu étudiés. L'utilisation, comme critère de tri des porteurs et des non porteurs du gène, des différences de concentrations en gonadotrophines et stéroïdes est inopérante. Les observations histologiques des testicules n'ont pas révélé de différences numériques ou morphométriques des cellules somatiques ou germinales entre les béliers F+ et les ++ (SECK 1987 ; PISSELET et al. 1991). Cependant, les sécrétions des cellules de Sertoli qui participent au rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire ont fait l'objet de très peu d'études chez les béliers porteurs ou non du gène. Après les études de Purvis et al. (1991) faites sur les concentrations plasmatiques d'inhibine O au cours de la période prépubère chez des agneaux F+ et ++, on ne peut que conclure que les différences observées sont temporaires. Aussi, le but de ce travail est (1) de caractériser in vitro, chez des béliers F+ et ++, les protéines sécrétées par les cellules de Sertoli en culture in vitro et (2) de comparer les protéines présentes dans le liquide du reste testis (RTF). Le liquide du reste testis est sécrété par l'épithélium séminifère et particulièrement par les cellules de Sertoli sous l'influence des cellules germinales.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Les animaux

Les mâles croisés Booroola x Romanov (BooRo) ou Booroola x Mérinos d'Arles (BooMa) utilisés sont de génotype connu (par les tests sur les descendances femelles pour BooMa ou par des inséminations avec des semences de béliers FF et ++ pour les BooRo). Des mâles âgés de trois mois et adultes ont

été utilisés chez les BooRo et seulement des adultes chez les BooMa. Ces animaux sont issus de différents pères : BooRo = 4 FF et 2 ++ ; BooMa = 3 F+.

2.2. La collecte du liquide du rete testis

8 béliers BooMa âgés de 5 ans (4 F+ et 4 ++) et 8 béliers BooRo âgés d'un an (4 F+ et 4 ++) ont reçu une cannule implantée dans le rete testis à la sortie du testicule vers l'épididyme, selon la méthode de Dacheux et al. (1981). Le liquide sécrété par le testicule (RTF), collecté journalièrement par animal pendant 4 jours, a été séparé de ses spermatozoïdes par centrifugation (20 mn à 1.200g et à 4°C) et stocké à - 20°C jusqu'au moment des dosages. Dans cette expérience, seules les récoltes du premier jour ont été utilisées et le débit d'écoulement du liquide durant la récolte a été calculé. A la fin de la période de cannulation, les mâles ont été castrés et un morceau de parenchyme testiculaire a été fixé et évalué histologiquement pour déterminer le nombre de cellules de Sertoli par testicule (Attal & Courot 1963 ; Pisselet et al., 1991).

2.3. La culture de cellules de sertoli

Les cellules de Sertoli ont été obtenues à partir de testicules de six jeunes mâles BooRo âgés de trois mois (3 F+ et 3 ++). Elles sont mises en culture selon la technique de Dorrington et al. (1975) et de Tung et al. (1987). Le milieu de culture est un mélange de MEN et HAM F12 (v/v), supplémenté avec des amino-acides, vitamines, insuline et transferrine (5µg/ml) et sans sérum. Les préparations de cellules de Sertoli (3 x 10⁵ cellules/cm²) ont été mises en culture dans des boîtes de culture plastiques (FALCON). Les cellules ont été soumises à un des 4 traitements suivants : (1) témoins, (2) testostérone 25 ng/ml, (3) PMSG 20 UI/ml, (4) PMSG + testostérone. Les milieux ont été dialysés 48 h à 4°C pour éliminer les sels présents dans le milieu de culture.

2.4. Electrophoreses sur gel de polyacrylamide mono et bidimensionnelles

Les concentrations en protéines ont été estimées selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976). Les échantillons de liquide de rete testis ont été lyophilisés pour atteindre des concentrations qui conviennent à l'électrophorèse. En outre, les concentrations protéiques des échantillons sont standardisées. Les protéines présentes dans le RTF et les milieux de culture de cellules de Sertoli ont été séparées par électrophorèses monodimensionnelles avec 100 µg de protéines par échantillon et par animal.

Les électrophorèses monodimensionnelles sur gel de polyacrylamide ont été réalisées en utilisant le système tampon Tris (Trizma ; Sigma) de Laemmli (1970). Les protéines ont été séparées sur des gels de polyacrylamides T (30g acylamide Serva + 0,2g méthylène bis-acrylamide Serva/100ml d'eau distillée) 12,5% (p/v) en présence ou non de 2-B- mercaptoéthanol (Sigma) 5% (v/v). Des électrophorèses bidimensionnelles, selon la méthode de Roberts et al. (1984), ont

été réalisées avec 300 µg de protéines par échantillon de RTF, résultant soit d'un regroupement des échantillons (3 par génotype) soit d'échantillons individuels (2 par génotype aussi bien chez les BooMa que chez les BooRo). Les protéines ont été séparées dans la première dimension par électrofocalisation dans des colonnes de gel de polyacrylamide (14,19g d'acrylamide + 0,81 g méthylène bis-acrylamide) à 4% (p/v) contenant 250 mM de Tetraméthyléthyldiamine (Serva), 8,0 M d'urée (Merk), du détergent non-ionique 2% (v/v ; Nonidet NP-40-Sigma) et 5,1% (v/v) d'ampholines (Ph 3-10, 5-7 Résolytes ; Merck : 2/3 et 1/3 par volume respectivement). Les colonnes de gel sont équilibrées dans 50 mM de Tris-HCL à pH 6,8, contenant 1% (p/v) de dodécylsulfate de sodium (Serva) et 1% (v/v) de 2-β mercaptoéthanol. La deuxième dimension a été réalisée sur gel de polyacrylamide 12,5% (p/v) en présence de 0,5% (p/v) de SDS. Les gels ont été calibrés avec une série de protéines de poids moléculaires connus (Bio-Rad) allant de 14 à 97 KD et ont été colorés à l'argent (Morrissey, 1981).

2.5. Statistiques

Les résultats sur les paramètres testiculaires ont été obtenus par analyse de variance selon les programmes ANOVA de CSS. Statsoft.

3. RESULTATS

3.1. Caractéristiques testiculaires

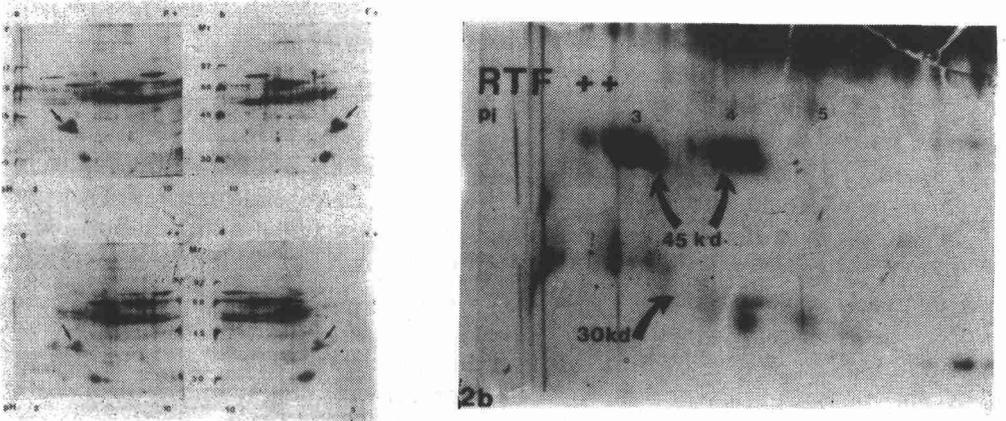
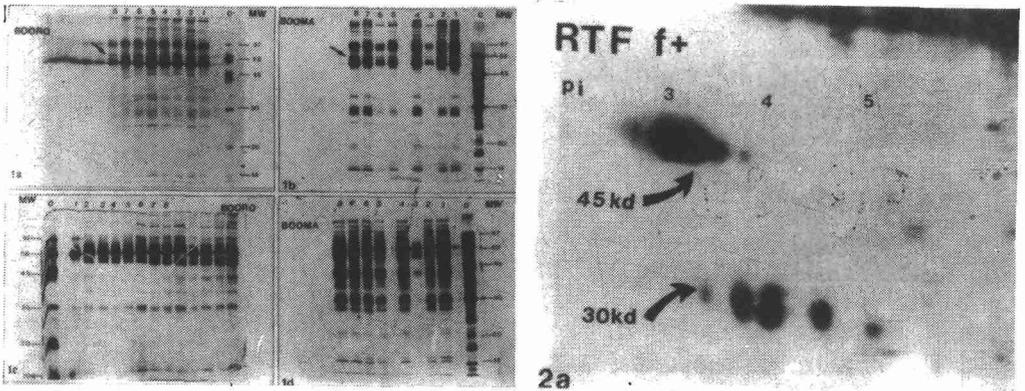
Le poids testiculaire des béliers F+ ou ++ ne diffère pas dans chaque croisement alors qu'il apparaît une différence significative entre BooRo plus légers et BooMa plus lourds. Ceci provient d'une différence en nombre de cellules de Sertoli par testicule, plus important chez les BooMa que chez les BooRo (tableau I).

3.1.1 Analyse des protéines du liquide du reste testis

L'analyse des concentrations en protéines contenues dans le RTF révèle un effet hautement significatif ($P < 0,02$) du type génétique (BooMa : 0,81 ; BooRo : 1,08 mg/ml), mais il n'y a pas d'effet significatif du gène "F" et du génotype. Dans les mêmes échantillons, le débit du liquide du reste testis par heure est plus élevé chez les BooMa que chez les BooRo, ce qui donne une production horaire en protéines relativement constante (5,4 à 6,10 mg/h/10¹⁰ cellules de Sertoli), indépendamment du génotype et du croisement (Tableau 1).

Les électrophorèses monodimensionnelles ont été réalisées avec ou sans β-mercaptoéthanol et les résultats sont indiqués à la Fig. 1 (a, b, c,d). En absence de β-mercaptoéthanol pour une (ou des) protéine(s) aux environs de 68 KD. Cependant, ce polymorphisme n'est pas lié au gène "F" (Fig. 1a, 1b). Par ailleurs, chez les BooMa et en présence de βmercaptoethanol, aucune différence évidente entre les porteurs et non porteurs du gène F n'a pu être observée [Fig. 1 (c, d)].

Pour mieux séparer les protéines, deux électrophorèses bidimensionnelles ont été réalisées avec des mélanges de RTF provenant de 3 béliers BooRo soit F+ soit ++ (Fig. 2a, 2b). La comparaison de ces gels montre un groupe de protéines acides qui diffère clairement entre les béliers F+ et ++ (Fig. 2a, 2b). Il est constitué de deux sous-groupes de protéines, un avec un poids moléculaire de 45 KD et un $pI = 3$ et une série de protéines aux environs de 30 KD et $pI = 4$. Deux isoformes du poids moléculaire le plus élevé (45 KD) ont été observées chez les béliers ++ alors qu'il en existe une seule chez les F+. Par contre, en ce qui concerne les protéines 30 KD, le nombre de sous-unités est plus important chez les béliers F+ que chez les ++ (Fig. 2a, 2b). Des échantillons individuels de RTF issus de béliers F+ ou ++, BooRo ou BooMa ont ensuite été comparés. Dans les échantillons individuels de RTF, quelque soit le croisement, la principale différence se situe dans l'intensité et la taille de la tâche fournie par la coloration à l'argent des protéines 45 KD et à un degré moindre pour celle de 30 KD (Fig.3).



3.2.2 Analyse des protéines secrétées par les cellules de sertoli *in vitro*.

Des différences dans la carte protéine entre les mâles F+ et ++ ont été identifiées sur les mélanges de milieux de culture sur les électrophorèses monodimensionnelles (Fig. 4). cependant, aucune d'entre elles n'a pu être confirmée sur les échantillons individuels. L'électrophorèse bidimensionnelle n'a pas été réalisée avec les échantillons individuels.

On observe également, quelque soit la supplémentation, qu'aucune différence n'apparaît au niveau des protéines secrétées par les cellules de Sertoli.

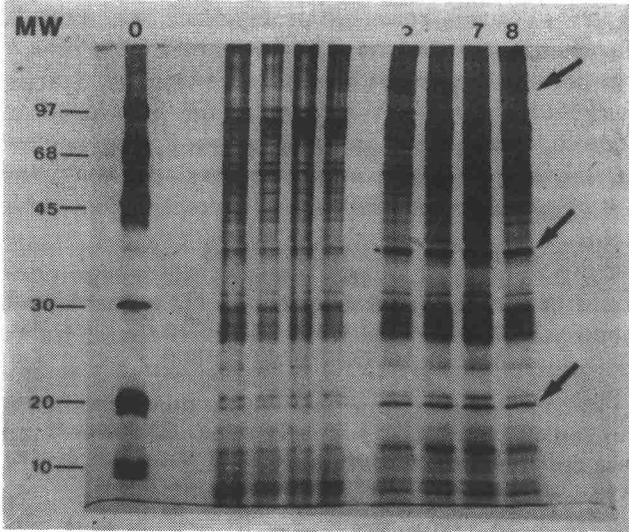


Tableau 1 : Caractéristiques du testicule et du liquide du rete testis des béliers croisés Booroola ($m \pm sem$; 4 animaux / génotype / croisement).

	BooRo		BooMa	
	F+	++	F+	++
Poids testicule(g)	170 \pm 12	165 \pm 13	201 \pm 14	210 \pm 13
cell.Sertoli x10 ⁸	25,7 \pm 1,8	21,6 \pm 1,6	28,5 \pm 3,7	27,4 \pm 3,1
Débit du RTF(ml/h)	1,36 \pm 0,15	1,06 \pm 0,24	1,88 \pm 0,37	1,95 \pm 0,40
Prot.du RTF (mg/ml)	1,07 \pm 0,12	1,10 \pm 0,14	1,45 \pm 0,06	0,82 \pm 0,03
Prot./test.(mg/h)	1,26 \pm 0,09	1,35 \pm 0,28	1,45 \pm 0,19	1,56 \pm 0,32
Prot./10/10 Sert(mg/h)	5,59 \pm 0,85	5,38 \pm 1,43	5,28 \pm 0,25	6,12 \pm 1,32

Prot. : quantité de protéines ; Sert. : Cellule de Sertoli.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez les béliers adultes quelque soit le croisement, nous n'observons pas de différence du poids testiculaire comme cela avait déjà été observé par Walker et al. (1985), ni du nombre de cellules de Sertoli et de la production de liquide du reste testis en fonction du génotype ; par contre les béliers BooRo qui sont donc 1/2 Romanov ont comme ceux-ci un poids testiculaire plus faible qui provient d'un stock plus faible de cellules de Sertoli (Hochereau-de Reviers et al. 1985). Le débit de liquide du reste testis est plus élevé chez les croisés BooMa que chez les BooRo et c'est l'inverse pour la concentration en protéines de ce liquide. Cette production de protéines par heure, en fonction du nombre de cellules de Sertoli, est relativement constante quelque soit le génotype ou le croisement.

Chez les mâles prépubères BooMa ou BooRo, il a été observé précédemment des concentrations plasmatiques en FSH plus élevées chez les F+ que chez les ++ (SECK et al., 1988) qui ne persistent pas chez l'adulte. Ces variations liées à l'âge pourraient refléter des modifications de la sécrétion des cellules de Sertoli.

L'analyse des milieux de culture des cellules de Sertoli devrait permettre une évaluation plus spécifique des sécrétions sertoliennes que l'approche plus générale que nous offre celle du liquide du reste testis. Cependant, avec le parenchyme testiculaire du bélier adulte, la séparation des cellules de Sertoli entières est réalisée avec une efficacité faible, à cause de leur morphologie très branchue qui leur permet d'englober la plupart des cellules germinales. La récolte de liquide du rete testis par cannulation est relativement plus facile et permet, finalement, une bonne comparaison des sécrétions de cellules de Sertoli de béliers adultes. En fait, le liquide du rete testis (Rosenior et al., 1987) : grâce à l'existence de la barrière hémato-testiculaire, il y a très peu de protéines sériques dans le liquide du rete testis. En utilisant le 1D-PAGE, les différences observées dans les milieux de culture des cellules de Sertoli, groupées en fonction des génotypes F+ et ++, au niveau des bandes protéiques, ne subsistent pas lorsque les échantillons individuels sont testés. Ceci reflète probablement une variation dans la précocité d'apparition de la spermatogenèse, puisque un des trois agneaux mâles F+ avait un testicule plus lourd (30g) que celui des autres (10g). Egalement chez les mâles adultes, ni l'analyse du liquide du rete testis par 1D-PAGE ni les concentrations en protéines ne montrent de différences majeures entre les mâles F+ et ++ dans les deux croisements. Les différences observées au niveau des bandes de protéines 68 KD ne sont pas liées à la présence du gène mais sont simplement le fait de variations individuelles. Chez les mâles BooRo F+ (Fig. 1a) l'électrophorèse monodimensionnelle du RTF indique que la protéine 68 KD est composée de deux sous-unités chez les autres béliers soit celle du dessus (bélier 8) ou celle du dessous (bélier 7). Ces béliers 5, 6, 7 et 8 étant du même génotype, ++. Des variations identiques ont été obtenues chez mâles BooRo de génotype F+ et chez les mâles BooMa (Fig. 1b). Aucune relation avec la production spermatique par testicule ou par cellule de Sertoli n'a été observée.

La seule différence observée entre les mâles F+ et ++ au niveau des protéines du RTF l'ont été par électrophorèses bidimensionnelles des protéines des échantillons de RTF groupés ou individuels. Dans les échantillons groupés de mâles BooRo ++, la (ou les protéine (s) 45 KD apparaît composée de deux sous-unités contre une, de taille plus grande, pour les mâles F+. Dans les échantillons individuels de béliers F+ ou ++, les différences en intensité et en taille de la tâche 45 KD plus importantes chez les F+ que chez les ++, persistent. Il est à noter que la différence est indépendante du croisement (Romanov ou Mérionos d'Arles) et du père. On peut observer chez les BooMa que le même père a donné naissance à des agneaux F+ et ++ chez lesquels les différences notées ci-dessus existent.

Le groupe de protéines acides 45 KD apparaît identifiable comme les deux sous-unités de clustérine décrites par Blaschuk et al. (1983) dans le liquide du rete testis d'ovin et à la glycoprotéine sulfatée (SPG2) décrite dans les sécrétions de Sertoli de rat par Kissinger et al. (1982), Sylvester et al. (1984) et Collard de Griswold (1987). Cette protéine pourrait correspondre à celle observée dans les échantillons groupés de mâles BooRo ++. La clustérine est une protéine majeure est une protéine majeure du liquide du reste testi et elle représente environ 20% du total des protéines ; c'est un dimérique, chacun des dimères faisant 45 KD ; elle est fortement glycosylée (36% de sucres, incluant 14% de glycosamine : Blaschuk et Fritz, 1984). Les deux dimères sont immunologiquement identiques, mais leurs séquences N-terminal différent (Cheng et al., 1988). La clustérine est aussi présente dans le sérum, mais dans une forme beaucoup moins glycosylée (Cheng et al. 1988). la présence de deux isoformes avec des points isoélectriques différents chez ces béliers ne pourrait être liée à la contamination par le sang dont on a dit qu'il contenait une forme déglycosylée de clusterine. Au contraire, chez un des mâles F+ où une isoforme est absente, une légère contamination sanguine est suspectée. La clustérine ovine provoque l'agrégation de cellules de différents types *in vitro* (Blaschuk et al., 1983) et la SPG2 chez le rat est liée aux membranes des spermatides allongées (Sylvester et al., 1984). Cependant, le rôle biologique de la SPG2, sa présence chez la femelle, ses effets sur la qualité des gamètes mâles ou sa fonction au niveau du RTF sont encore inconnus. On a pu observer la présence en quantité importante de ces protéines 45 KD dans le plasma séminal ovin.

Par ailleurs, dans un milieu de culture de cellules de Sertoli de rat, une protéine liant le calcium (rat SPARC, Cheng, 1990) connue aussi sous le nom d'ostéonectine (Howe et al., 1988) a été identifiée ; son poids moléculaire est aux environs de 43 KD et c'est une protéine acide. Son identification dans le liquide du rete testis ovin n'a pas encore été faite. Dans nos échantillons, elle pourrait aussi contribuer aux variations observées au niveau de ces protéines acides.

Le groupe de protéines acides 30 KD diffère principalement par la taille de la tâche donnée par la coloration à l'argent ; on pourrait l'identifier à la forme non réductible de l'inhibine ovine (Leversha et al., 1987).

En conclusion, l'analyse des protéines du rete testis par électrophorèse bidimensionnelle révèle des différences au niveau des protéines 45 KD et 30 KD

qui sont très acides. Leurs rôles sont mal connus aussi bien que leur liaison avec le gène "F".

5. REMERCIEMENTS

Nous remercions tout le personnel des domaines expérimentaux du Merle (Salon de Provence 13) et de la Sapinière (Bourges 18) pour les soins donnés aux animaux, le personnel du laboratoire de Physiologie de la reproduction pour l'aide technique et Mr. A. Beguey pour les photographies illustrant cet article. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une AIP INRA. Le séjour de M.SECK a été financé par une bourse AUPELF.

6. REFERENCES

- ATTAL J., COUROT M. 1963.** : Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le taureau. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 3. 219-241.
- BINDON B.M., PIPER L.R. EVANS R. 1982.** : Reproductive biology of the Booroola Merino. In "The Booroola Merino", pp 21-33 L.R. Piper, B.M. Bindon & R.D. Nethery eds. CSIRO. Australia.
- BLASCHUK O., BURDZY, FRITZ I.B. 1983.** : Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J. Biol. Chem.* 258. 7714-7720.
- BLASCHUK O., FRITZ U.B. 1984.** : Isoelectric forms of clusterin isolated from rete testis fluid and from secretions of primary cultures of ram and rat Sertoli cell-enriched preparations. *Biochem. Cell. Biol.* 62. 456-461.
- BRADFORD M.M. 1976.** : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72.248-254.
- CHENG C.Y. 1990.** : Purification of a calcium binding protein (rat SPARC) from primary Sertoli cell-enriched culture medium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167. 1393-1399.
- CHENG C.Y., CHEN C.L.C., FENZ Z.M., MARSHALL A., BARDIN C.W. 1988.** : Rat clusterin isolated from primary Sertoli cell-enriched culture medium. *Biochem. Biophys. Res comm.* 155. 398-404.
- COLLARD M.W., GRISWOLD M.D. 1987.** : Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochem.* 26. 3297-3303.

- DACHEUX JL, PISSELET C, BLANC MR, HOCHEREAU-DE REVIERS MT, COUROT M 1981.** : Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *J. Reprod. Fert.* 61. 363-371.
- DENNY J.R., FITZGERALD I.A., BADELYN S.F., HORST M.MN. 1984.** : Analysis of membrane polypeptides by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In "Molecular and chemical characterization of membranes receptors" pp 61-113. C.J. Venter & L.C. Harrison Eds. A.R.Liss. New York.
- DORRINGTON H.H., ROLLER N.F., FRITZ I.B. 1975.** : Effects of Follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. *Mol. Cell. Endocrin.* 3. 57-70.
- HOCHEREAU-DE REVIERS M.T., BLANC M.R., COLAS G., PELLETIER J. 1985.** : Parameters of male fertility and their genetic variation in sheep. In "Genetics of Reproduction in sheep", pp 301-314. R.B. LAND & D.W. Robinson eds. Butterwoths. London.
- HOWE C.C., OVERTON G.C., SAWICKI J., SOLTER J., STEIN P., STRICKLAND S. 1988.** : Expression of SPARC/Osteonectin transcript in murine embryos and gonads. *Differentiation.* 37.20-25.
- KISSINGER C., SKINNER M.K., GRISWOLD M.D. 1982.** : Analysis of Sertoli cell secreted proteins by two dimensional gel electrophoresis. *Biol. Reprod.* 27. 233-240.
- LAEMMLI U. 1970.** : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. 680-685.
- LEVERSHA L.J., ROBERTSON D.M., DE VOS F.L., MORGAN F.J., HEARN M.T.W., WETTENHALL R.E.H., FINDLAY J.K., BURGER H.G., DE KRETZER D.M. 1987.** : Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J. Endocr.* 113. 213-221.
- MORRISSEY J.H. 1981.** Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117. 307-310.
- PISSELET C, PERREAU C, HOCHEREAU-DE-REVIERS MT, BOOMAROV. 1991.** : Testicular parameters of adult Booroola x Merinos d'Arles or Booroola x Romanov F+ or ++ rams. in "Second international Workshop on Major genes for Reproduction in Sheep. "Toulouse (France) Ed. INRA. 23. 256-269.

- PURVIS I.W., FORD J.R., MARTIN G.B., MCNEILLY A.S. 1991.** : Plasma inhibin and FSH concentrations in young Merino rams with and without the Booroola F gene. In "Second International Workshop on Major genes for Reproduction in Sheep" Toulouse (France). Ed. INRA. 23 p. 201-205.
- ROSENIOR J., TUNG P.S., FRITZ I.B. 1987.** : Biosynthesis and secretion of clusterin by ram rete testis cell-enriched preparations in culture. Biol. Reprod. 36. 1313-1320.
- SECK M.M, 1987.** : Comparaisons de paramètres endocriniens (LH, FSH et Testostérone) et testiculaires entre des mâles ovins Merinos d'Arles et croisés BOO x MA porteurs ou non porteurs du gène (F) de prolificité. Thèse Doct. Univ. USTL. Montpellier II.
- SECK M., HOCHEREAU-DE-REVIERS M.T., BOORMAROV. 1988.** : Comparaisons des teneurs plasmatiques en hormone gonadotrope FSH, durant les trois premiers mois de la vie, chez des agneaux mâles, porteurs ou non du gène "F" de prolificité. C.R. Acad. Sci. Paris. 307. (série III) 433-437.
- SYLVESTER S.R., SKINNER M.K., GRISWOLD M.D. 1984.** : A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. Biol. Reprod. 31. 1087-1101.
- TUNG P.S., ROSENIOR J., FRITZ I.B. 1987.** : Isolation and culture of ram rete testis epithelial cells : structural and biochemical characteristics. Biol. Reprod. 36. 1287-1312.
- WALKER S.K., PONZONI R.W., WALKLEY J.R.W., MORBEY A.S.C. 1985.:** The effect of the "F" gene on male reproductive traits in Booroola x South Australian Merino rams. Anim Reprod. Sci. 9. 137-144.

ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE GLYCOPROTEINE PLACENTAIRE BOVINE : MISE AU POINT D'UN DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE SENSIBLE ET SPECIFIQUE*

A.P. ZOLI, J.F. BECKERS, W. BENITEZ-ORTIZ et F. ECTORS.

Département d'Endocrinologie et de Reproduction Animales (Unité de Recherche de l'IRSIA) ; Faculté de Médecine Vétérinaire ; Boulevard du Colonster, Sart-Tilman 4.000 Liège. Université de l'Etat à Liège ; Belgique.

* Ce travail a été financé par l'IRSIA et l'AGCD (Belgique) et par le Centre Universitaire de Dschang (Cameroun).

1. INTRODUCTION

Le placenta des mammifères synthétise une large gamme de protéines et d'hormones dont certaines sont identiques à des substances produites par des sujets adultes, normaux et non gestants : ex. la gonadotropine chlorionique (CG) et l'hormone lutéinisante (LH) ; l'hormone placentaire lactogène (PL) et l'hormone de croissance (GH) + la prolactine (PRL) ; les hormones stéroïdiennes ; les prostaglandines (1). En 1970 Tatarinov et Masyukevich mettent en évidence dans le sérum de femmes enceintes une nouvelle protéine absente chez les femmes non gestantes et chez les hommes (2). Plus tard cette protéine fut isolée et purifiée à partir d'extraits de placenta à terme (3), et fut dénommée Schwangerschafts-Spezifischen B1-glycoprotein ou encore Pregnancy-Specific B1-glycoprotein (SP1). Au départ la SP1 fut considérée comme strictement spécifique du placenta et par conséquent de la gestation. Mais des études ultérieures ont montré que d'autres cellules pouvaient la produire et que la SP1 était présente, en quantités plus faibles, non seulement chez la femme non gestante mais aussi chez les sujets mâles. Des recherches similaires effectuées chez les ruminants domestiques ont abouti en 1982 (4) à l'isolement à partir des enveloppes foetales bovines de 2 protéines de la gestation, les protéines A et B. Seule la protéine B s'est révélée spécifique de la gestation et fut dénommée PSPB du protéine spécifique B de la gestation. Les fonctions exactes des protéines SP1 et PSPB ne sont pas encore connues, cependant on leur reconnaît un rôle immunosupresseur (5,6).

A partir des cotylédons foetaux bovins nous avons isolé, purifié et caractérisé une glycoprotéine associée à la gestation et dénommée "bovin Pregnancy-Associated Glycoprotein" (bPAG) (7,8). Un antisérum, produit contre la protéine pure, a permis de développer un dosage radioimmunologique sensible

et spécifique (9) et de localiser le site de production de la protéine dans les placentomes bovins (8,10).

2. ISOLEMENT, PURIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE GLYCOPROTEINE BOVINE ASSOCIEE A LA GESTATION (bPAG)

2.1. Isolement

Des cotylédons foetaux frais collectés à l'abattoir sont finement broyés, mixés puis soumis à une extraction acide. Les étapes successives de l'isolement sont : les précipitations au sulfate d'ammonium, les chromatographies sur résine échangeuse d'anions (DEAE-Cellulose DE 52) et de filtration sur gel (Sephadex G75). La protéine est suivie pendant tout le processus d'isolement grâce au test d'immunodiffusion radiale (test d'Ouchterlony) et à un antisérum de première génération produit contre un broyat de cotylédons foetaux. Avant toute utilisation, l'antisérum est épuisé préalablement contre des extraits tissulaires de sujets mâles et de femelles non gestantes (foie, rein, muscle et sang).

2.2. Purification

Le processus de purification de la protéine isolée s'est poursuivi par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) réalisée sur des colonnes prépacktées de Mono SHR et de Mono P HR (Pharmacia). La protéine est suivie par dosage radioimmunologique semi-spécifique développé grâce à un antisérum de seconde génération produit sur lapin contre les fractions immunoréactives issues de la colonne de G75 (Fig.1A). Le chromatogramme sur Mono S présente un pic majeur (Fig.1B) très immunoréactif tandis que la Mono P présente un profil où se distinguent 4 pics majeurs également très immunoréactifs (fig. 1C).

2.3. Caractérisation

2.3.1 *Détermination des poids moléculaires et des points isoléctriques.*

Une électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) est réalisée avec ou sans B-mercaptoéthanol (2,5% v/v). Les gels sont ensuite colorés soit au Bleu de Coomassie R250, soit au nitrate d'argent. Le pic de Mono S donne 2 bandes : une bande majoritaire et une bande minoritaire de poids moléculaires (Mr) estimés à 67.000 et 35.000 daltons respectivement (Fig. 2A). Les 4 pics de la Mono P se se révèlent très homogènes, même en présence d'agent réducteur, et de Mr identiques à savoir 67.000 daltons (Fig. 2B) qui est le Mr de la bande majoritaire du pic de la Mono S. Ce qui démontre d'une part, de l'état de grande pureté des produits de la chromatofocalisation, et d'autre part, que les 4 pics sont issus de la bande majoritaire de la Mono S. Enfin, la présence de l'agent réducteur n'entraîne pas de modification du poids moléculaire de la molécule. Ce qui signifie

que celle-ci serait composée d'une seule chaîne polypeptidique. Le même phénomène fut également observé pour la SP1 (11).

Une électrofocalisation sur gel de polyacrylamide en couche mince (LKB) a permis de déterminer les points isoélectriques des 4 pics de la Mono P. Comparés à un standard des pI, les points isoélectriques sont estimés à 5, 4, 5, 2, 4, 8 et 4,4 respectivement pour les pics I à IV.

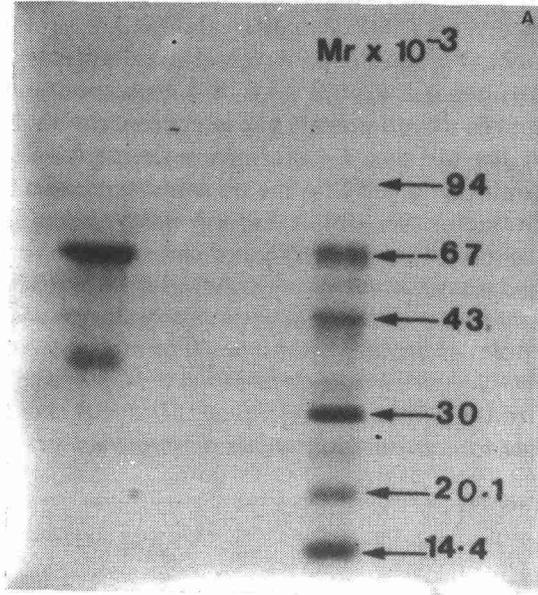


FIG 1 : Profils chromatographiques d'éluion de la bPAG. A : éluion sur gel Sephadex G75 de la fraction 0,05 M NaCl de la DEAE. Les protéines sont éluées avec le tampon Tris-HCl 0,01M (pH 7,8). La zone foncée indique les fractions immunoréactives. B : éluion sur une colonne de Mono S équilibrée en tampon acétate d'ammonium 0,01 M (pH 5). La ligne discontinuée représente la courbe du gradient de NaCl et la zone foncée, les fractions immunoréactives. C : éluion sur une colonne de Mono P équilibrée en tampon bis-Tri- HCL 0,025 M (pH 6,3). Les protéines sont éluées avec du PB74 dilué et de pH4. La ligne discontinuée représente le gradient de pH. Les fractions constituant les pics I à IV se sont révélées hautement immunoréactives.

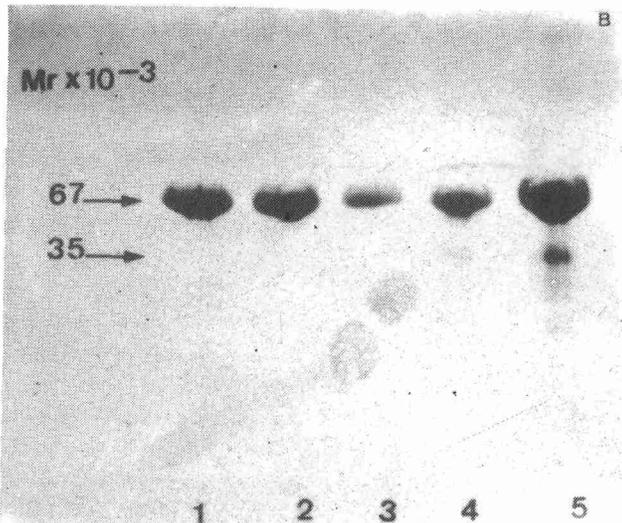


FIG 2 : A Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE). Trente μ g du pic majoritaire de la Mono S lyophilisés ont été chargés. La bande lourde (\approx 67.000 daltons) représente la BPAG. Le gel est coloré au Brillant Bleu de Coomassie R250. B. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et d'un agent réducteur (le β -mercaptoéthanol: 2,5% v/v) du pic de la Mono S (piste5) et des 4 pics de la Mono P (pic IV a1 = piste1 à 4). 2,5 μ g de protéine de chaque fraction ont été chargés et le gel est coloré au nitrate d'argent.

2.3.2 Détermination des concentrations de la bPAG en sucres et en acide sialique.

Les concentrations en sucres et en acides sialiques de la bande majoritaire de la Mono S, déterminées respectivement par les méthodes de Dubois (12) et de Warren (13) sont de $10,02 \pm 1,09\%$ et $0,97 \pm 0,1\%$ (moyenne plus ou moins SD.). Les 4 pics de la Mono P se distinguent par leur contenus en acide sialique. Ceux-ci sont de $0,29 \pm 0,06\%$, $0,65 \pm 0,08\%$, $0,83 \pm 0,08\%$ et $2,12 \pm 0,31\%$ pour les pics I à IV respectivement. Ce qui est en corrélation avec les différents points isoélectriques (pI) estimés à 5,4 ; 5,2 ; 4,6 et 4,4 pour les mêmes fractions. La variation des pI observée s'expliquerait par la concentration en acide sialique de chaque isoforme. Si les Mr des 4 isoformes sont identiques, par contre leur immunoréactivité diminue du pic I (le moins acide et le plus sensible) au pic IV (le plus acide et le moins sensible) (Fig.3). Cette immunoréactivité est en corrélation étroite, comme les pI, avec les concentrations en acide sialique (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et immunoréactives des 4 isoformes de la bPAG (les pics I à IV de la Mono P). On peut noter la relation qui existe entre les points isoélectriques (pI), les concentrations en acides sialiques et l'immunoréactivité de 4 isoformes.

Isoforme	PM	pI	Concentration en (%)		Immunoréactivité (%)
			Hydrates de carbones*	acides sialiques*	
I	67 000	5,4	$10,02 \pm 1,09$	$0,29 \pm 0,06$	100
II	67 000	5,2	"	$0,64 \pm 0,08$	40
III	67 000	4,8	"	$0,83 \pm 0,08$	20
IV	67 000	4,4	"	$2,12 \pm 0,31$	9

* Moyennes \pm DS de 3 dosages.

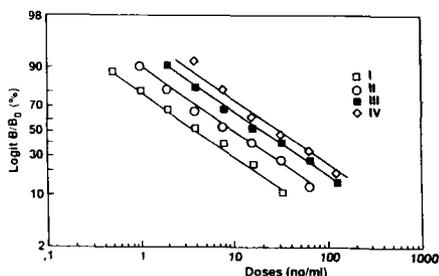


FIG 3. Dosage radioimmunologique de la bPAG. Courbe d'inhibition de la liaison de la ^{125}I -bPAG ("pool" des 4 isoformes) par les isoformes I à IV. Noter la décroissance de l'immunoréactivité de l'isoforme I (le moins acide et le moins sialisé) à l'isoforme IV (le plus acide et le plus sialisé).

2.3.3 Détermination de la séquence en acides aminés de la PAG

Un microséquençage direct a été réalisé par dégradations automatisées d'Edman et selon le programme de Hunkapiller et Hood (14). Il a permis d'identifier les 39 premiers acides aminés avec l'arginine comme acide aminé NH₂-terminal.

Le clonage moléculaire de bPAG et de son homologue ovine, également isolée dans notre laboratoire (15), a été réalisé de la façon suivante. Des cDNA de conceptus et de cotylédons bovins et ovins ont été sondés avec de l'antisérum R 498 produit sur lapin contre le pool des 4 isoformes. Deux clones ont été établis à partir du cDNA cotylédonnaire bovin, codant avec 2 polypeptides de 380 et 382 acides aminés respectivement pour la bovine et l'ovine (16). Ces deux polypeptides présentent une homologie de 86% sur le plan nucléotidique et de 73% au niveau des séquences des acides aminés. Des recherches réalisées dans le GenBank ont révélé que les PAG appartiennent à la famille des protéinases aspartiques. Elles possèdent, sur le plan nucléotidique, une identité de 60% avec les pepsinogènes humain (17), porcine (18), simien (19), avec la catépsine E (20), de 57% avec les chymosines (21) et de 50% avec la cathepsine D humaines (22). Ces similitudes se retrouvent au niveau des séquences respectives des acides aminés (50% d'identité avec les pepsinogènes), et plus spécialement au niveau des régions du site actifs des protéinases aspartiques où les résidus voisins des acides aspartiques sont hautement conservés (Fig.4.) Les PAG sont cependant dépourvues d'activité protéolytique (8).

	NH ₂ -TERMINAL	COOH-TERMINAL
Pepsine (Humaine)	Val Phe ASP Thr Gly Ser Ser	Ile Val ASP Thr Gly Thr Ser
Cathepsine E (Humaine)	Ile Phe ASP Thr Gly Ser Ser	Ile Val ASP Thr Gly Thr Ser
Cathepsine D (Humaine)	Val Phe ASP Thr Gly Ser Ser	Ile Val ASP Thr Gly Thr Ser
Chymosine (Humaine)	Leu Phe ASP Thr Gly Ser Ser	Ile Val ASP Thr Gly Thr Ser
Renine (Humaine)	Val Phe ASP Thr Gly Ser Ser	Leu Val ASP Thr Gly Ala Ser
bPAG (Bovine)	Val Phe ASP Thr <u>Ala</u> Ser Ser	Leu Val ASP Thr Gly Thr Ser
oPAG (Bovine)	Val Phe ASP Thr Gly Ser Ser	Leu Val <u>Gly</u> Thr Gly Thr Ser

FIG 4. Comparaison des séquences des acides aminés de la bPAG et de l'oPAG avec celles de certaines protéinases aspartiques au niveau des régions qui encadrent les résidus d'acides aspartiques considérés comme essentiels pour l'activité catalytique de la pepsine. Les NH₂-Terminal et COOH-Terminal font référence respectivement aux lobes NH₂-terminal et COOH-terminal.

3. LOCALISATION IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Des microsections de placentomes bovins prélevés sur des placentas de vaches Pie-Noire et Blanc Bleu Belge en mi ou en fin de gestation sont traités par la méthode de peroxydase antiperoxydase (PAP) en utilisant l'antisérum R498.

Le marquage immunohistochimique est limité au cytoplasme d'une population de grandes cellules binuclées situées quasi exclusivement au niveau du trophoblaste (Fig.5). Le marquage immunologique est spécifique de la bPAG. En effet il disparaît si l'antisérum est préalablement épuisé contre de la bPAG pure (10). Utilisant la méthode "Immunogold" suivie d'un examen en microscopie électronique, on constate que ce sont certaines granules des cellules binuclées qui se marquent. Ce qui suggère que la bPAG synthétisée par les cellules binuclées est d'abord stockée dans ces granules qui seront ensuite déversées par exocytose dans la circulation maternelle après la migration des cellules binuclées (10).

3.1 Mise au point d'un dosage radioimmunologique sensible et spécifique

Grâce à l'antisérum R498 produit sur lapin contre de la bPAG pure, un dosage radioimmunologie sensible et spécifique fut développé. L'antisérum a un titre opérationnel de 1/1.500.000 (dilution finale) qui lie 35 à 40% de la protéine marquée à l'iode 125 (traceur), avec une liaison non spécifique (NSB) inférieure à 2%. Pour augmenter la sensibilité du dosage, l'antisérum est utilisé en routine à une dilution finale de 1/2.500.000 qui lie 20-25% du traceur. La sensibilité est alors de 20 pg par tube.

Les extraits cotylédonnaires bovin et ovin, le sérum de vaches gestantes et les liquides foetaux (amniotique et allantoïdien) dosés en dilutions sérielles présentent des courbes d'inhibition de la liaison de la 125I-bPAG parallèles à la courbe standard (Fig. 6A). Par contre les sérums de vaches non gestantes et de génisses ne présentent aucune réaction croisée. De même les gonadotropines hypophysaires et placentaires (PMSG, bLH et pFSH) ainsi que d'autres protéines placentaires (bPL et SP₁) et sériques (BSA et AFP), même à des concentrations de 10ug/ml, ne montrent aucune réaction croisée (Fig. 6B & C).

3.2 Profil sérique de la bPAG pendant la gestation

La bPAG est détectée dans le sang de certaines vaches à partir du 22e jour après la conception et chez plus de 98% des vaches gestantes à partir du 30e jour. La concentration sériques'élève d'abord progressivement, ensuite beaucoup plus rapidement pour atteindre des valeurs maximales de l'ordre de $2462 \pm 1017,8$ ng/ml 1 à 5 jours avant le vêlage. Après celui-ci la concentration sérique de bPAG décroît régulièrement et revient en-dessous du seuil de détection (< 0,2 ng/ml) entre le 80e et le 120e jour post-partum (Fig 7). L'augmentation très rapide de la concentration de la bPAG dans la circulation périphérique pendant les 10 jours qui précèdent la mise-bas pourrait être liée aux modifications physiologiques relatives au déclenchement de la parturition. Elle pourrait être à l'origine des changements chimiques préparant l'expulsion du placenta après la parturition.

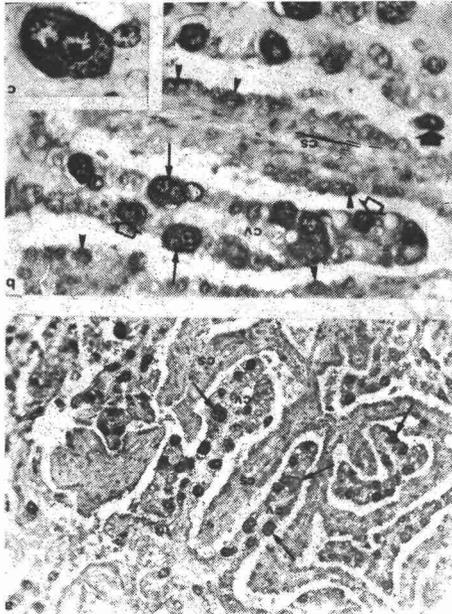


FIG 5. a & b. Localisation immunohistochemique de la bPAG dans le placentome bovin. La réaction spécifique est limitée à certaines cellules (binuclées) réparties au niveau de l'épithélium des villosités chorioniques (VC) qui s'engrènent avec les cryptes caronculaires (SC). Ces cellules sont toutes binuclées même si certaines d'entre elles paraissent mononuclées (grosses flèches ouvertes). On peut remarquer une cellule isolée (grosse flèche) en pleine migration. (a=x387 et b = x 992). c. Une cellule immunoréactive à un plus fort grossissement. Noter les 2 noyaux et la réaction spécifique intense limitée au cytoplasme. c=x 2650.

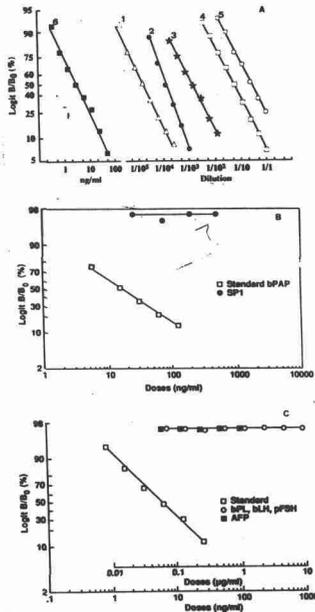


FIG. 6. Spécificité de l'antisérum anti-bPAG produit contre le "pool" de la mono P.A. : les extraits cotylédonnaires bovin (1) et ovine (2), le sérum de vache gestante (3), les liquides amniotique (4) et allantoïdien (5) présentent des courbes d'inhibition de la liaison de la 125 I-bPAG presque parallèles à celle du standard (6). On n'observe aucune réaction croisée avec la SP1 (B), ni avec les hormones placentaires (bPL), gonadotropes hypophysaires (bLH, pFSH) et ni avec l'alphafetoprotéine (AFP) (C).

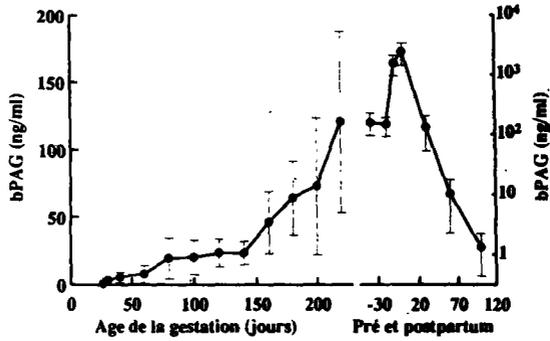


FIG. 7 Profil des concentrations sériques (moyennes + SD) de la bPAG chez des vaches (n = 20) auxquelles des prises de sang ont été réalisées du J.20 après la conception au J.100 postpartum.

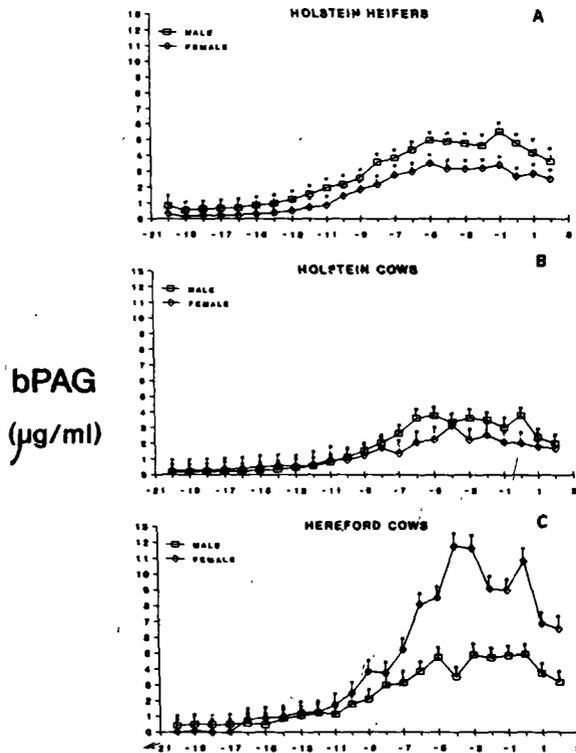


FIG. 8. Profils des concentrations sériques de la bPAG autour du vêlage : A chez des génisses Holstein (n = 14), B des vaches Holstein (n=12) et C des vaches Hereford toutes porteuses de foetus Holsteins de race pure.

Une étude réalisée sur des receveuses Holstein (vaches et génisses) et Hereford (vaches) auxquelles on a transféré des embryons Holstein (race pure) a permis la mise en évidence des influences de la race des receveuses, du sexe et de la famille du foetus sur la concentration périphérique de la bPAG (9,15). Des

prises quotidiennes de sang ont eu lieu du jour - 20 au jour + 2 (Jour 0 = vêlage). Les concentrations moyennes péripartum de bPAG (3,5 vs 2,3 et 1,5 µg/ml, SE = 0,4 ; p < 0,003) étaient plus élevées chez les vaches Hereford que chez les génisses et les vaches Holstein respectivement. De même, le profil de croissance péripartum des concentrations de bPAG est plus élevé (P < 0,01) chez les vaches Hereford que chez les génisses Holstein et les vaches Holstein. Les concentrations maximales atteintes 1 à 5 jours avant le vêlage sont de 7,6, 4, 2 et 3 µg/ml respectivement chez les vaches Hereford, les génisses Holstein et les vaches Holstein. Les receveuses Holstein porteuses de foetus mâles ont des profils prépartum de bPAG plus élevés que celles porteuses de foetus femelles. A l'inverse, les receveuses Hereford portant des foetus femelles ont des profils prépartum plus élevés que celles portant des foetus mâles (Fig.8 A, B et C). Comme l'ont montré d'autres auteurs pour la production laitière et concernant le profil de certaines hormones placentaires (23), la race du foetus influence de façon importante le profil péripartum de la bPAG. Ceci implique que des effets potentiels du foetus affectent la fonction endocrine du placenta. En conséquence ils ne peuvent pas être négligés dans les cas de transfert d'embryons et plus spécialement lorsque le foetus et la receveuse appartiennent à des races différentes.

Tableau 2. : *Diagnostic de gestation par dosage radioimmunologique de la bPAG dans le sérum (J.35 postœstrus) et par la palpation rectale (J.45 postœstrus) chez 430 génisses porteuses Françaises Holstein-Friesian.*

RIA (j.35)	Méthode de diagnostic		Total
	Palpation rectale (j.45)		
	+	-	
+	267(93,03%)*	20 (6,97%)	287
-	3 (2,1%)	140 (97,9%)	143
Total	270	160	430

* Les nombres entre parenthèses représentent l'exactitude du diagnostic. L'exactitude totale du diagnostic est de 94,65%.

3.3 Dosage radioimmunologie de la bPAG : un test de diagnostic de gestation ?

Le dosage radioimmunologique (RIA) de la bPAG mis au point a une assez bonne répétabilité. En effet, les coefficients de variation interdosage et intradosage sont respectivement de $11,6 \pm 0,6\%$ et $6,9 \pm 2,5\%$ (moyennes \pm DS).

En raison de sa sensibilité, de sa spécificité, de sa précocité et de sa répétabilité, le dosage de la bPAG peut être utilisé comme test de diagnostic précoce de la gestation. A cet effet un troupeau de génisses Françaises Holstein Frisian (n = 430) sur lesquelles des embryons sont transférés ont subi une prise de sang au jour 35 post-oestrus (po) (28e jour après le transfert) et la bPAG dosée. Sur les 430 génisses 287 ont un taux de bPAG supérieur ou égal à 0,5 ng/ml et 143 un taux inférieur à 0,5 ng/ml. Une palpation rectale réalisée au 45e jour po (38e jour après le transfert) indique que 267 des 287 génisses (93,03%) avec un taux de bPAG supérieur à 0,5 ng/ml et 3 des 143 génisses (2,09%) dont le taux de bPAG est inférieur à 0,5 ng/ml sont gestantes. Compte non tenu des éventuelles mortalités embryonnaires survenues entre les deux tests, le dosage de la bPAG permet de diagnostiquer la gestation et l'absence de gestation avec une exactitude de 93,03% et 97,91% respectivement. L'exactitude totale du test est de 94,65% (Tableau 2). Ces résultats suggèrent que le dosage de la bPAG peut être efficacement utilisé comme méthode sérologique alternative pour le diagnostic de la gestation chez les ruminants domestiques. C'est une méthode relativement simple et précoce qui n'exige pas une connaissance précise de la date de la saillie ou de l'insémination artificielle comme c'est le cas pour la progestérogène.

4. SOURCES ACCESSOIRES DE PRODUCTION DE bPAG.

Afin de valider le dosage radioimmunologique de la bPAG, des serums de mâles et de femelles non gestantes sont investigués en vue de mettre en évidence la protéine placentaire. Avec un seuil de sensibilité de 0,2ng/ml, la protéine fut détectée chez les certaines femelles non gestantes et certains taureaux. Si les taux de bPAG ou de la protéine bPAG-like sont faibles chez les femelles non gestantes (<0,5 ng/ml), ils sont relativement élevés chez les mâles. Ces résultats assez surprenants nous ont conduit à de plus amples investigations chez ceux-ci. C'est ainsi que des extraits de testicule de taureaux et de béliers ont été dosés de façon sérielle. Une importante inhibition de la liaison de la 125I-bPAG a été observée (24). Des coupes immunohistochimiques réalisées sur le testicule de taureaux ont montré des réactions de coloration spécifique au niveau des cellules de Sertoli. Ces résultats démontrent l'existence, voire la production par le testicule, de la bPAG ou d'une protéine immunologiquement apparentée.

5. CONCLUSION

Le bPAG, isolée à partir des cotylédons foetaux, a été purifiée et caractérisée. La protéine est principalement d'origine placentaire et peut ainsi être considérée comme un bon témoin de la viabilité du fœtus. Cependant les réactions croisées de l'antisérum spécifique de la bPAG avec le sérum de certains sujets mâles et au niveau des cellules de Sertoli semblent indiquer, à l'instar de la SP₁ (25), que la synthèse de la protéine ne serait pas limitée au placenta, voire aux sujets femelles. Elle pourrait également être produite, en quantités relativement faibles, par les mâles.

Le rôle biologique exact de la bPAG reste à déterminer.

6. REFERENCES

1. **Gordon YB, Chard T.** - The specific proteins of the human placenta : some new hypotheses. In : Klopper A, Chard T (ed.), *Placental proteins* Springer-Verlag 1979 ; 1-21.
2. **Tatarinov YS, Masyukevich VN.** - Immunochemical identification of new betal-globulin in blood serum of pregnant women. *Biull Eksp Biol Med.* 1970, 69 : 66-68.
3. **Bohn H.** - Nachweis und charakterisierung von schwangerschaftsprotein in der menschlichen plazenta, sowie ihre quantitative immunologische Bestimmung in Serum Schwangerer Frauen. *Arch. Gynäkol* 1971, 210 : 440-457.
4. **Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, William RJ.** - Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod.* 1982, 26 : 925-933.
5. **Cerni C, Tatra G, Bohn H.** - Immunosuppression by human placental lactogen (hPL) and pregnancy-specific β 1-glycoprotein (SP1). *Arch Gynäköl* 1977, 223 : 1-7.
6. **Dunbar MM, Wong TS, Ruder-Montgomery CA, Chew BP, Sasser RG.** - Partial characterization of the immunosuppressive properties of pregnancy-specific protein B (PSPB). *Theirogenology* 1990, 33 : 1. Abstract 220.
7. **Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F.** - Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol. Reprod.* 1991, 45 : 1-10.
8. **Xie S, Low BG, Nagel RJ, Kramer KK, Anthony RV, Zoli AP, Beckers JF, Roberts RM.** - Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991, 88: 10. 247 - 10.251.
9. **Zoli AP, Delahaut P, Benitez-Ortiz W, Beckers JF, Ectors F.** - Radioimmunoassay of a bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in serum and its possible application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod.* 1991, 46 : 83-92.

10. **Zoli AP, Demez P, Beckers JF, Reznik M, Beckers A.** - Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in bovine placentome. *Biol Reprod.* 1992 46 : 623-629.
11. **Bohn H.** - Isolation and characterization of placental proteins with special reference to Pregnancy-Specific β 1 glycoprotein and other proteins specific to the placenta. In : Klopper A, Chard, T (Eds), *Placental proteins.* Springer-Verlag. 1979 ; 71-88.
12. **Dubois M, Gilles KA, Hamilton, Rebers PA, Smith F.** - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956, 28 : 350-356.
13. **Warren L.** - The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol Chem* 1959; 234 : 1971-1975.
14. **Hankapiller MW, Hood LE.** - Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and High Pressure Liquid Chromatography. *Biochem* 1978, 17 : 2124-2133.
15. **Zoli AP, Beckers JF, Ectors F.** - Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenology* 1900 ; 33 : Abstract 366.
16. **Xie S, Low B, Zoli AP, Beckers JF, Anthony RV, Roberts RM.** - Molecular cloning of pregnancy-associated glycoproteins from cattle and sheep : Identity with the aspartate protease family. *Biol Reprod.* 1991 (suppl1). Abstract 194.
17. **Von Heijne G.** - *Nucleic Acids Res.* 1986, 14 : 4682-4690.
18. **Lin XL, Wong RNS, Tang J.** - Synthesis, purification and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen. *J. Biol Chem* 1989, 264: 4482-4489.
19. **Kageyama T, Takahashi K.** - The complete amino acid sequence of monkey pepsinogen A. *J. Biol Chem* 1986, 216 : 4395-4398.
20. **Azuma T, Pals G, Mohandas TK, Couvreur JM, Taggart RT.** - Human gastric cathepsin E. *J. Biol Chem* 1989, 264 : 16 748-16 21.
21. **Hidaka M, Sasaki K, Uozumi T, Boppu T.** - Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene*, 1986, 46 : 197-203.

22. **Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM.** - Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 1985, 82 : 4910-4914.
23. **Guilbault LA, Becker JF, La pierre S, Zoli AP, Benitez W, Roy GL.** - Peripartum concentrations of placental protein hormones (bPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying purebred Holstein fetuses. Theriogenology 1991 ; 35 : Abstract 208.
24. **Guilbault LA, Rev GL, Beckers JF, Dufour JJ.** - Influence of breed of fetus on periparturient endocrine responses and subsequent milk production of Ayrshire dams. J. Dairy Sci 1990 ; 73 : 2766-2773.
25. **Zoli AP, Beckers JF, Ectors F.** - Ruminant gonads as accessory sources of Pregnancy-Specific protein ? In Program of the 72nd Annual Meeting of the Endocrine Society, 1990 ; Atlanta, GA. Abstract 373.
26. **Chan WY, Tease LA, Borjigin J, Chan PK, Renert OM, Srinivasan B, Shupert WL, Cook RG.** - Pregnancy-specific β 1 glycoprotein mRNA is present in placental as well as nonplacental tissues. Hum Reprod. 1988; 3 : 677-685.

FOLLICULOGENESE ET ENDOCRINOLOGIE CHEZ DES TAURES HOLSTEIN SUPEROVULEES

DIOP (P.E.H.)¹ ; BOUSQUET (D.)² ; KING (W.A.)³

¹. Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires- BP 5077 Dakar (SENEGAL)

². Centre d'Insémination Artificielle du Québec, 3500 SICOTTE SAINT-HYACINTHE (P.Q.), Canada

³. Département Biomédical Sciences, Ontario Vét. Collegue, Université de Guelph, GUELPH, ONTARIO, Canada.

1. INTRODUCTION

Les objectifs sont d'une part de vérifier l'utilité de l'échographe comme outil de recherche dans l'étude de la croissance folliculaire et la détection du début de l'ovulation, d'autre part d'évaluer la relation entre deux paramètres endocriniens et les résultats obtenus.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Les animaux

Dix huit (18) taures Bos indicus cycliques, de race Holstein, âgées en moyenne de 3 ans furent utilisées pour cette expérience qui s'échelonna sur une période d'un an. Leur poids moyen était de 570 kg. Leur alimentation était distribuée deux fois par jour et se composait de 8 kg de foin mélangé, 1,5 kg de concentré (moulée laitière à 14% de protéines brutes sans urée) ; l'abreuvement se faisait à volonté.

2.2 L'échographie

L'appareil utilisé était un échographe Equisonic 310 (Equisonic Inc., Illinois, USA) de 5 mgh de mode B doté de deux pages d'image. Il était relié d'une part à un magnétoscope portatif Panasonic qui permettait l'enregistrement des différentes images obtenues sur des cassettes vidéo de type VHS et d'autre part à une caméra photo Nikon 35 mm qui assurait la photographie.

Pour chaque ovaire, les plus gros follicules, de plus de 10 mm de diamètre, étaient photographiés. L'appréciation de la croissance folliculaire et aussi de la détection du début de l'ovulation était effectuées par comparaison entre deux séries successives d'enregistrement ou de photographie.

2.3 La suroovulation

Elle consistait en l'administration par la voie intramusculaire de huit (8) injections de 5 mg d'hormones stimulante de la folliculogénèse (FSH-P) (Schering Canada IC., Pointe-Claire, Québec), chacune à 12 heures d'intervalle.

Les chaleurs des taures étaient observées à l'extérieur dans un enclos deux fois par jour dès le lendemain de l'administration de la PG. Le surlendemain, elles étaient observées toutes les 4 heures. La première période d'acceptation du chevauchement de la taure par une de ses congénères était considérée comme le début des chaleurs (T0).

2.4 Prélèvement de sang

Pour étudier la courbe de l'hormone lutéinisante (LH) ainsi que de la progestérone (P_4), environ 7 ml de sang étaient prélevés au niveau des vaisseaux coccigiens à l'aide d'aiguilles numéro 20 montées sur des tubes de verre sous vide (Becton Dickinson and Co., Mississauga, Ontario) contenant de l'EDTA comme anticoagulant. Aussitôt après la récolte, le sang était centrifugé, le plasma était recueilli et transvasé dans les fioles de 4 ml (Fisher Scientific Co., Pittsburg, USA) en vue de sa congélation et de sa conservation à -20°C . La fréquence de prélèvements sanguins figure dans le schéma 1.

2.5 Dosages radio immunologiques

2.5.1 Le dosage de la LH

La LH était dosée au département des sciences animales du Collège mac Donald de l'Université McGill. L'anticorps utilisé était celui de lapin. Il était préparé par le Professeur N. RAWLING de Saskatoon. Le dosage s'était fait selon les méthodes de NISWENDER et coll. (1969) et HOWLAND (1972). La valeur minimale détectable était de 0,116 ng/ml avec 95% de Bo. Le coefficient de variation intra dosage était de 5,9%.

2.5.2 Le dosage de la progestérone

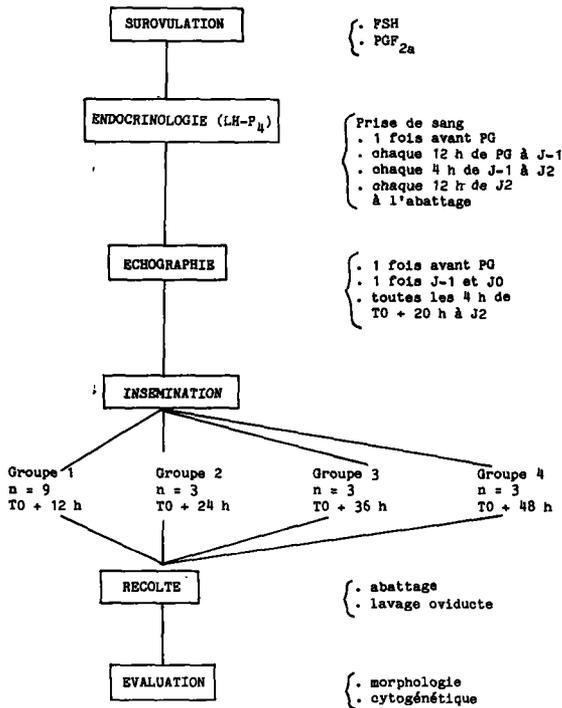
La P_4 était dosée au CRRA dans le laboratoire d'endocrinologie selon la méthode RIA. Les coefficients de variation étaient de 5,19% entre les dosages et de 3,34% dans un même dosage.

2.6 L'insémination artificielle

Les taures étaient inséminées une fois seulement avec de la semence congelée d'un même taureau dont la fertilité est connue, à différentes périodes après le début de l'oestrus, ce qui déterminait les groupes de cette expérience.

Toutes les inséminations ont été effectuées par le même inséminateur. (Schéma n°1).

Schéma 1 : Représentation schématique du protocole général utilisé dans la présente recherche.



3. RESULTATS

Les résultats seront analysés sous deux aspects :

- la suroovulation
- l'endocrinologie

3.1 La suroovulation

Toutes les taures utilisées dans cette expérience ont montré des signes caractéristiques d'oestrus. Les premiers signes de chaleur se sont manifestés en moyenne à 44h24 ± 5h24 après l'administration de la PG avec des variations allant de 33 à 54 heures. La répartition circadienne des chaleurs nous montre que sur les 18 taures de cette expérience, une est venue en chaleur entre 0 et 4 heures, soit 5,5%, 9 l'ont été entre 4 et 8 heures soit 50%, 4 entre 8 et 12 heures soit 22,2%, 3 entre 12 et 16 heures soit 16,6% ; aucune entre 16 et 20 heures et enfin 1 entre 20 et 24 heures soit 5,5%.

Le début de l'ovulation détectée par échographie a eu lieu en moyenne 28h6 +4h18 par rapport au début des chaleurs avec des variations de 24 à 39h30 (schéma n°2).

Par rapport à l'administration de la PG, l'ovulation a débuté en moyenne 73h9+6h18 avec des variations de 60h30 à 87h30. Les différentes images obtenues par échographie nous montrent que l'ovulation débuté par les follicules de plus de 10 mm de diamètre. Dans notre expérience, dans la majorité des cas, le début de l'ovulation s'est manifesté par la rupture de plus de 2 follicules à la fois. L'image de l'échographie de la rupture folliculaire se traduit par des structures dont les contours sont les mêmes que les follicules intacts. La différence réside dans la densité de coloration du liquide folliculaire. En effet pour le follicule intact, le liquide folliculaire apparaît très noir, alors qu'il est gris noirâtre après l'ovulation (photos 1 & 2).

Chez 12 taures(12/18), le début de l'ovulation s'est davantage manifesté sur l'ovaire droit que sur l'ovaire gauche, soit 66,6%.

Par ailleurs, le nombre d'ovulations obtenus par suroovulation est en moyenne de 14,5 + 8,3 par vache avec des variations allant de 1 à 34 points d'ovulation.

ECHOGRAPHIE D'UN OVAIRE DE TAURE SUROVULEE EFFECTUEE A 25 ET 29 HEURES APRES LE DEBUT DES CHALEURS

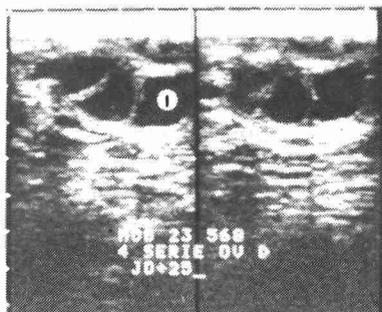


Photo 1 : (25 heures après le début des chaleurs)



Photo 2 : (29 heures après le début des chaleurs)

(1) Follicule intact - (2) Corpus hemorrhagium

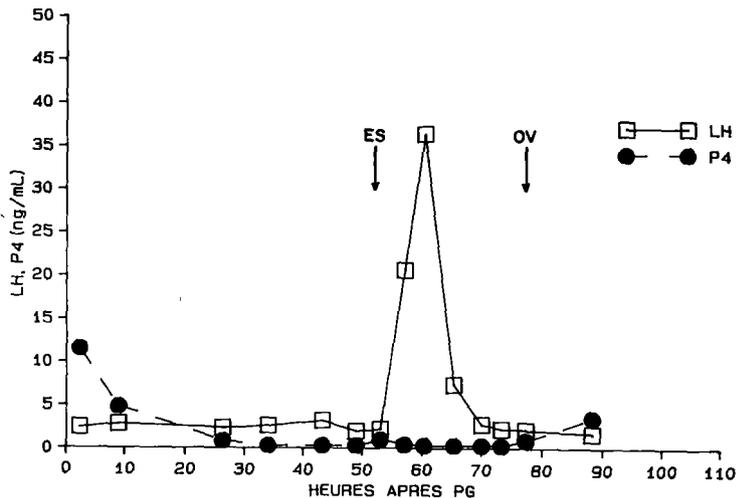
3.2 L'endocrinologie

Une concentration maximale de LH est observée chez toutes les taures. La concentration moyenne pour les valeurs maximales observées est de $20,9 \pm 9,5$ ng/ml. Les variations individuelles s'étalent en moyenne $47h30 \pm 7h$ après l'administration de la PG. Les variations individuelles sont de 36h35 à 60h55. Cependant, par rapport à l'apparition des premiers signes de chaleurs, 3 taures sur 18, soit 16,6% ont eu leur pic de LH avant à (-5h30 à -2h), 3 l'ont eu en même temps soit 16,6% et les 12 en moyenne 6 heures après, soit 66,6%. La moyenne de l'intervalle des premiers signes de chaleur et la concentration maximale de LH est de $3h7 \pm 4h42$. Les ovulations ont débuté en moyenne $24h40 \pm 5h42$ après la concentration maximale de LH avec des variations individuelles de 16 à 39h30.

Au moment de l'administration de la prostaglandine, les taures avaient en moyenne un taux de P_4 de $12,4 \pm 4,8$ ng/ml avec des variations de 2,3 à 22,2 ng/ml. Cependant, 22 heures en moyenne après l'injection de PG, le taux de P_4 chute de plus de 90% de sa valeur originale. A l'oestrus, le taux moyen de P_4 est de 0,9 à 0,3 ng/ml avec des variations de 0,3 à 1,4 ng/ml. Par rapport à l'observation de la concentration maximale de LH, le taux moyen de P_4 reste bas, de l'ordre de $0,9 \pm 0,4$ ng/ml avec des variations de 0,3 à 1,6 ng/ml.

Enfin, par rapport à l'observation du début de l'ovulation, le taux moyen de P_4 est de $0,70 \pm 0,38$ ng/ml avec des variations de 0,3 à 1,4 ng/ml (schéma n°3).

Schéma 3 : Profil endocrinien d'une taure superovulée



4. DISCUSSION

4.1 La suroovulation

Le traitement de suroovulation a favorisé l'apparition des premiers signes de chaleurs en moyenne $44h24 \pm 5h54$ après l'administration de la prostaglandine. Ces résultats sont supérieurs à ceux de YADAV et coll. (1986a) soit $41,3 \pm 1,95$ heures et sont par contre inférieurs à ceux de ALCIVAR et coll. (1992) qui sont 59 heures. Cependant, ils sont en accord avec ceux de GOFF et coll. (1986) et à ce qui s'obtient généralement dans l'industrie du transfert d'embryons (44 à 52 heures).

Le rythme circadien des chaleurs au cours de cette expérience montre une fréquence d'apparition majoritairement nocturne, ceci concorde bien avec les résultats de HACKETT et McALLISTER (1984), qui ont trouvé que plus de 85% des vaches Holstein débutent l'oestrus pendant la nuit.

Le début de l'ovulation détecté par échographie s'est manifesté à $73h9 \pm 6h18$ par rapport à l'administration de la prostaglandine ou encore $28h6 \pm 4h18$ après l'apparition des premiers signes de chaleurs. A part une vache qui a ovulé $60h30$ après l'administration de la PG, ces résultats sont comparables à ceux obtenues par YADAV et coll. (1986a). Ce dernier n'a observé aucune ovulation avant $64h50$ après l'administration de la PG.

Les résultats obtenus au moment de l'ovulation par rapport au début de l'oestrus s'accordent avec les observations de THAYER et coll. (1985) qui ont observé le début de l'ovulation chez les taures suroovulées qu'à partir de 24 heures après le début des chaleurs. La détection du début de l'oestrus d'une façon assez précise constitue un paramètre assez fiable pour déterminer le début de l'ovulation chez la vache en autant de périodes d'observation se rapprochant l'une de l'autre, et d'autre part que le critère utilisé pour déterminer le début de l'oestrus, soit l'acceptation par la vache du chevauchement par une de ses congénères.

Par le biais de l'échographie, la croissance des follicules a été observée ; ce sont les follicules de plus de 10 mm de diamètre qui sont impliqués en premier dans le processus de l'ovulation. Ces observations confirment celles de GRASSO et Coll. (1989) qui ont trouvé que le diamètre des follicules ovulatoires variait de 9,8 à 12,7 mm et que leur nombre était en corrélation positive avec le nombre de corps jaunes détectés par laparoscopie ou après ovariectomie.

D'autre part, l'asynchronie des ovulations chez les vaches suroovulées relatée par YADAV et Coll. (1985) qui ont trouvé que 75% des ovulations avaient lieu dans les 18 heures suivant la première ovulation, a été observée par THAYER et Coll. (1985) avec l'échographie. Ils ont trouvé que les ovulations s'étaient étalées sur une période de 24 à plus de 30 heures. Au cours de cette expérience, nous avons décelé que le début des ovulations pouvait intéresser quelquefois plus de 2 follicules à la fois.

Du fait du délai d'abattage des taures qui avait lieu 24 heures après l'insémination, nous n'avons que des données partielles sur la durée des

ovulations pour les groupes 3 et 4. Ces résultats nous montrent que la durée des ovulations pouvaient varier de 24 heures à plus de 26 heures.

D'autre part, l'échographie a permis d'observer que 66,6% des ovulations débutaient au niveau de l'ovaire droit. Ceci se rapproche des travaux de HAFS (1978) qui a trouvé que l'ovaire droit d'un animal non surovlulé était responsable de 60% des débuts d'ovulation.

La fiabilité des résultats obtenus au cours de cette expérience est en tous points comparable à celle qui s'est associée aux travaux de GRASSO et Coll. (1983) et ZALESKY et Coll. (1986) pour l'étude de la croissance folliculaire et du début de l'ovulation. Si ces auteurs ont trouvé une corrélation positive avec la laparoscopie, il faut cependant reconnaître que l'échographie nécessite surtout un bon repérage de tous les plans de l'ovaire contenant des follicules prêts à ovuler.

De ce fait, il est souhaitable d'adjoindre à l'échographie un système d'enregistrement des données et une caméra photo. Avec ces accessoires, les résultats obtenus ont rencontré les objectifs établis pour cette expérience.

4.2 L'endocrinologie

L'intervalle moyen de $47h34 \pm 7h$ entre l'administration de la PG et le pic de LH est dans les mêmes variations observées par d'autres auteurs tels que ALCIVAR et Coll. (1992) $47h \pm 3$.

La concentration moyenne de LH au pic de préovulation est de $20,98 \pm 9,5$ ng/ml de LH. Cette valeur se rapproche de celle qui est obtenue par YADAV et coll. (1986b) qui est de $24,2 \pm 1,02$ ng/ml et SCHALLENBERGER et Coll. (1988) $20,0 \pm 7,8$ ng/ml. L'intervalle moyen entre le début de l'oestrus et la concentration maximale de LH est de $3h7 \pm 4h42$ se rapproche de celui de YADAV et coll. (1986a) qui est de 2 heures et de celui 0 à 6 heures rapporté par BARNES et Co. (1982). Cependant, il diffère de celui de GREVE et coll. (1983) qui est de 8h30. Par ailleurs, nous constatons qu'il est pratiquement le même que celui des vaches non surovlulées. En effet, CHENAULT et coll. (1975) et CHRISTENSON et coll. (1975) ont observé un intervalle de 2h48 chez les vaches cycliques non surovlulées. Par ailleurs et YADAV et coll. (1986a) ont observé, au cours de cette expérience, des pics de LH survenant avant ou en même temps que l'oestrus.

Par rapport à l'ovulation, la concentration maximale de LH est observée en moyenne $24h40 \pm 4h42$. Cette observation s'accorde avec celle de CALLESSEN et coll. (1986) et celle de YADAV et coll. (1986a) qui est de 22 heures. Par ailleurs le délai de 24 heures observé au cours de cette expérience est identique à celui qui est observé chez des vaches non surovlulées d'après les travaux de BERNARD et Coll. (1983). Comme l'a affirmé YADAV (1986a,b) ces résultats ne permettent pas d'appuyer les hypothèses qui mentionnent que l'ovulation débute plus tôt chez les vaches surovlulées, en prenant le pic de LH comme référence. Si on se réfère à la définition de CALLESSEN et Coll. (1986) qui considèrent qu'un profil de LH est normal si le pic de LH survient dans les 22 à 54 heures après l'administration de prostaglandine. Dans cette expérience, 2 vaches (VI et XXI) ne répondent pas à ce critère car leur intervalle de PG-LH est respectivement de 60h55 et 60h30.

Les concentrations de LH durant le pic préovulatoire sont respectivement de 15,90 et 36,33 ng/ml. La première taure n'a eu qu'un seul point d'ovulation pour 1 seul embryon collecté et la seconde, 8 points d'ovulation pour 3 embryons et ovocytes ont été collectés. CALLESSEN et Coll. (1986) mentionnent que 80% des vaches à profil de LH anormal se caractérisent par une absence de pic de LH. Il est donc suggéré que seul le délai dans l'apparition du pic de LH pourrait être impliqué dans les problèmes ovulatoires.

La chute de plus de 90% des taux de P_4 de toutes les taures dans les 22 heures suivant l'administration de la PG confirme l'effet lutéolytique de la prostaglandine comme l'ont démontré les travaux de CALLESSEN et coll. (1986), DIOP et coll. (1992). Dans tous les cas rapportés par ces auteurs, l'action lutéolytique de la $PGF_2\alpha$ se traduit par une chute de la P_4 jusqu'à des valeurs inférieures à 1 ng/ml dans les 16 à 20 heures qui suivent son administration. Un tel taux se maintient jusqu'après l'apparition des signes d'oestrus pour augmenter par la suite. La présente expérience permet de mettre en évidence 3 sous-groupes de taures : un sous-groupe de taures (10/18) soit 55,5% dit normal avec des valeurs de P_4 inférieures à 1 ng/ml, un deuxième sous-groupe avec des valeurs oscillant autour de 1 ng/ml (1/18) soit 5,5% et enfin un troisième sous-groupe (7/18) soit 38,8% avec des valeurs supérieures à 1 ng/ml. Les deux derniers groupes sont caractérisés par un profil de P_4 dit dévié. Cependant, comme pour le premier sous-groupe, les animaux présentent une concentration maximale de LH et un nombre d'ovulation très variable.

Les résultats obtenus au cours de cette expérience peuvent avoir plusieurs explications : la première serait une action lutéolytique insuffisante de la prostaglandine ; la seconde est la relativité des valeurs obtenues de la P_4 selon les laboratoires de dosage radioimmunologique. Enfin les travaux de GOFF et coll. (1986) et DIOP et coll. (1992) ont montré que des taures ayant un taux de P_4 de 1,2 et 1,7 ng/ml au moment de l'oestrus sont capables d'avoir des pics de LH et que, d'autre part, l'absence de pic de LH observé n'entraîne forcément pas une absence de maturité des ovocytes. Une corrélation entre la concentration périovulatoire de LH et le nombre d'ovulation n'a pu être mise en évidence au cours de cette expérience.

Comme l'ont observé JANSEN et coll. (1982) ; GREVE et coll. (1983) ; GOFF et coll. (1986), la réponse et les profils obtenus à partir de cet échantillon de taures pourraient être représentatifs de ceux de la population des donneuses suroovulées.

5. CONCLUSION

Combinés à des moyens d'enregistrement des différentes images de l'ovaire, l'échographie s'avère être un bon outil pour l'étude de la croissance folliculaire et la détection du début des ovulations chez des femelles superovulées.

Les profils endocriniens de LH et de P_4 obtenus au cours de cette expérience sont assez représentatifs des données retrouvées dans la population de vaches superovulées.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. **ALCIVAR (A.H.), MAURER (R.R.), ANDERSON (L.L.), 1992.**
Endocrine changes in beef heifers superovulated with Follicle Stimulating hormones (FSH-P) or Human Menopausal Gonadotropin. *J. Anim. Sci.* : 70, 224-234.
2. **BARNES (M.A.), CASTELLANO (A.M.) KAMER (G.W.), WADE (R.J.) et HALMAN (R.O.), 1982.**
Effect of exogenous FSH ou oestrus, ovulation and endogenous hormone release in dairy cows. *Theriogenology*, 18 : 311-323.
3. **CALLESEN (H.), GREVE (T.) et HYTTEL (P.), 1986.**
Preovulatory endocrinology and ovocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25 (Suppl. 1) : 71-85.
4. **CHENAULT (J.R.), TCHATCHER (W.W.), KALRA (P.S.), ABRAMS (R.M.) WILCOX (C.J.), 1975.**
Transitory changes in plasma progestins, estradiol and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. *J. Dairy Sci.*, 58 (suppl. 5): 709-717.
5. **CHRISTENSON (R.K.), ECHTERNE KAMP (S.E.), LASTER (D.B.), 1975.**
Oestrus, LH, ovulation and fertility in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 43: 543-546.
6. **DIOP (P.E.H.), TRAORE (E.), ALLAIRE (F.), DIOP (M.), SOW (R.) MBAYE (M.), 1992.**
Endocrinologie et efficacité de 2 types de prostaglandine: le Fenprostalène et le Dinoprost chez la femelle zébu Gobra. A paraître dans *Rev. Méd. Vét.*
7. **GOFF (A.K.), GREVE (T.), BOUSQUET (D.), KING (W.A.), 1986.**
Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as ovocyte donors. *Theriogenology*, 26 : 577-548.
8. **GRASSO (F.), GUILBAULT (L.A.), ROY (G.L.), LUSSIER 5J.G.), 1989.**
Ultrasonographic determination for ovarian Follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. Theriogenology, 6, 31 : 1290-1220.
9. **GREVE (T.), CALLESEN (H.), HYTTEL (P.), 1983.**
Endocrine profiles and egg quality in superovulated cows. *Nord. Vet. Med.*, 35 : 408-421.

10. HAFS (H.O.), 1978

Ovigenesis, ovulation and fertilization; In : G.W. Salisbury, n N.L. Van Demark & J.R. Lodgs (Eds). Physiology of reproduction ans artificial insemination of cattle, : 91-129, W.H. Freeman and Company, San Francisco.

11. HOWLAND (B.E.), 1972

Effect of restricted feed intake levels in female rats. J. Am. Sci., 34 : 445-447.

12. NISWENDER (G.D.), REICHERT (L.E.), MIDGLEY (A.R.) Jr & NALBANDOV (A.V.), 1969.

Radio immunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. Endocrinology, 84 : 1144-1173.

13. SCHALLEERGER (F.), VON VEH (F.), KNOPF (L.), TENHURBERG (H.) AUMULLER (R.), 1988.

Endocrine profiles and ultrasonic evaluation of ovarian reponse after stimulation of superovualtion in cattle by continous FSH administration or repeated FSH injections.(proc.) of 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin (Ireland), 16-30 juin 1988, vol. 1 p. 189.

14. THAYER (K.M.), FORREST (D.W.) & WELSH (T.H.), 1985.

Real time ultrasound of evaluation of follicular development in superovulated cows. Theriogenology, 23(1) : 233.

15. YADAV (M.C.) LESLIE (K.E.) & WALTON (J.S.), 1985.

The onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. Theriogenology, 21(1) : 237.

16. YADAV (M.C.), WALTON (J.S.) and LESLIE (K.E.) 1986a.

Timing of the onset and duration of evolutation in superovulated beef heifers. Theriogenology, 26(4) : 509-522.

17. YADAV (M.C.), WALTON (J.S.) and LESLIE (K.E.) 1986b.

Plasma concentrations of luteinizing hormone and progesterone during superovulation of dairy cows using follicle stimulating hormone or pregnant mare serum gonadotropin. Theriogenology, 26(4) : 509-522.

18. ZALESKY (D.D.), THAYER (K.M.), FORREST (D.W.), WELSH (T.H.), BOUDIOLI (K.R.), LOONEY (C.R.) & HILL (K.G.), 1986.

Relationships between endocrine and ultrasound evaluation of ovulation in superovulated cows. Theriogenology, 25(1) : 220.