

Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés

Y. LOCATELLI^{1,2}, P. MERMILLOD²

¹ Muséum National d'Histoire Naturelle, Département des Parcs et Jardins Botaniques et Zoologiques,
Réserve Animalière de la Haute Touche, F-36290 Obterre

² INRA, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly

Courriel : ylocatel@tours.inra.fr

L'extraordinaire diversité taxonomique de la famille des cervidés se caractérise par des différences marquées entre les espèces (répartitions géographiques, morphologies ou encore caractéristique de la physiologie de la reproduction). La préservation de cette diversité repose aujourd'hui sur la réalisation de programmes conservatoires qui nécessitent d'approfondir nos connaissances de la physiologie de la reproduction de ces ruminants sauvages.

De par le monde, le nombre d'espèces de mammifères menacées d'extinction est en augmentation. La diminution de populations dans le milieu naturel résulte souvent d'activités humaines entraînant la modification de l'écosystème (Ceballos et Ehrlich 2002). L'industrialisation, l'agriculture intensive, le braconnage, les pollutions ou encore les guerres sont autant de facteurs favorisant l'extinction d'espèces. L'extraordinaire diversité de la famille des cervidés est directement touchée par ce phénomène. Parmi la quarantaine d'espèces que comptent les cervidés, plus d'une trentaine de sous-espèces (sur un total de près de 200) figurent sur la liste rouge des animaux menacés d'extinction de l'IUCN ou International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (tableau 1). Les cerfs sika de Formose (*Cervus nippon taiouanus*), du Viêt-Nam (*Cervus nippon pseudaxis*), le cerf de Duvaucel (*Cervus duvaucelii*) ou encore le daim de Mésopotamie (*Dama dama mesopotamica*) figurent parmi les plus menacés. Certains cervidés, comme le cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*), ont totalement disparu de leur habitat naturel et leur sauvegarde ne dépend plus que de programmes conservatoires *ex situ*, menés, pour la plupart, dans des parcs zoologiques. Les faibles effectifs de géniteurs, la consanguinité, la faible prolificité ou l'inadéquation des conditions de vie en captivité sont souvent un obstacle à l'obtention de descendants.

Chez les mammifères domestiques, les nombreuses recherches dans le domaine du contrôle et de la conduite de la reproduction ont permis l'acquisition de connaissances et le développement d'outils biotechnologiques performants, notamment chez les ovins et caprins (Chemineau *et al*

1999). Chez les cervidés, la cryoconservation de gamètes, la superovulation, l'insémination artificielle (IA), la fécondation *in vitro* (FIV) et le transfert d'embryons permettraient l'augmentation des effectifs à partir d'un faible nombre de géniteurs. La constitution de banques cryogéniques

Tableau 1. Répartition des sous espèces menacées d'extinction au sein de la famille des cervidés (sources IUCN 2000).

Genre	Nombre d'espèces	Nombre de sous-espèces (dont éteintes)	Nombre de sous-espèces menacées d'extinction
<i>Alces</i>	1	6	1
<i>Axis</i>	4	4	3
<i>Blastocerus</i>	1	-	1
<i>Capreolus</i>	1	3	-
<i>Cervus</i>	9	65 (2)	20
<i>Dama</i>	1	2	1
<i>Elaphodus</i>	1	3	-
<i>Elaphurus</i>	1	-	1
<i>Hippocamelus</i>	2	-	1
<i>Hydropotes</i>	1	2	2
<i>Mazama</i>	4	26	1
<i>Moschus</i>	3	4	-
<i>Muntiacus</i>	5	17	1
<i>Odocoileus</i>	2	49	3
<i>Ozotoceros</i>	1	3	3
<i>Pudu</i>	2	2	2
<i>Rangifer</i>	1	9 (2)	1
	40	195 (4)	41

de gamètes et d'embryons, en plus de son aspect conservatoire, faciliterait les échanges de matériels génétiques entre les différents sites de conservation *ex situ* et diminuerait ainsi le phénomène de consanguinité. Pour développer des programmes conservatoires basés sur ces techniques chez les cervidés, il conviendrait d'améliorer les connaissances fondamentales de la physiologie de la reproduction afin d'adapter les techniques de procréation assistée déjà utilisées avec succès pour les mammifères domestiques. Depuis une trentaine d'années, suite à l'essor de l'élevage de daims et de cerfs élaphe (en Nouvelle-Zélande notamment), de nombreux travaux de recherches ont porté sur la caractérisation de la physiologie de la reproduction des cervidés et plus récemment sur la mise au point et l'utilisation des méthodes de procréation assistée. Ils concernent le plus souvent le cerf élaphe ou cerf rouge (*Cervus elaphus*), le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), le Wapiti (*Cervus canadensis*) ou encore le daim (*Dama dama*). Trois difficultés majeures se présentent dans l'application des outils biotechnologiques chez les cervidés. La première est liée au fait que la plupart des cervidés présentent un cycle saisonnier très marqué de leur fonction de reproduction, avec une période d'inactivité sexuelle profonde. La conduite de protocoles d'assistance à la procréation en dehors de la saison sexuelle a de ce fait peu de chances de succès. De plus, la très grande diversité de la famille des cervidés ne se limite pas à une diversité taxonomique ou de répartition géographique mais concerne également les caractéristiques de la physiologie de la reproduction. Enfin le caractère sauvage de ces animaux rend leurs manipulations extrêmement difficiles voire dangereuses pour les expérimentateurs comme pour les animaux eux-mêmes. Le stress associé ne doit pas être négligé car il peut être la cause d'échecs (Asher *et al* 1996b, Carragher *et al* 1997).

Dans cette revue bibliographique, nous traiterons des caractéristiques générales de la fonction de reproduction chez les cervidés et notamment de l'aspect saisonnier de cette reproduction. Nous traiterons également de l'avancée des connaissances concernant les méthodes de procréation assistée appliquées à ces espèces sauvages.

1 / Caractéristiques de la fonction de reproduction des cervidés

1.1 / Aspects saisonniers : généralités

Comme de nombreux mammifères originaires des zones tempérées, la plupart des cervidés présentent un caractère très saisonné de leur fonction de reproduction qui se traduit par une alternance entre des périodes d'activité et d'inactivité sexuelles, dictée par les rythmes photopériodiques (variation de la durée du jour). Sous nos latitudes, la période du rut ainsi que le maximum de fertilité sont généralement observés en automne (septembre-octobre) pendant les jours courts et sur une très courte période (Lincoln 1971, Lincoln 1998). Dans le cas du cerf élaphe, la période d'accouplement ne dépasse pas trois semaines. Ainsi, compte tenu de la durée de gestation, les naissances ont lieu au printemps, période favorable à la croissance des jeunes. Au contraire, la mise en sommeil de la fonction de reproduction empêche la conception de jeunes dont les naissances interviendraient dans une période défavorable.

Chez les mammifères, le signal photopériodique doit cheminer depuis l'œil vers les gonades et son intégration fait intervenir des mécanismes complexes, impliquant les systèmes nerveux et endocrinien (Malpaux *et al* 1996). Le signal lumineux est perçu par la rétine puis transmis par voie nerveuse vers les noyaux supra-chiasmiques, les noyaux hypothalamiques paraventriculaires et les ganglions cervicaux supérieurs. Le signal atteint ensuite la glande pinéale qui sécrète la mélatonine. Chez les ovins et caprins, la mélatonine est sécrétée pendant la nuit alors que les niveaux diurnes sont faibles (Arendt 1986). Ainsi, la durée quotidienne (durée de présence), l'amplitude (différence entre niveaux diurnes et nocturnes) et la phase (moment de présence) de sécrétion de mélatonine sont modifiées au cours de l'année suite aux variations de la durée du jour et sont susceptibles de réguler la fonction de reproduction en agissant au niveau central sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Chez les ovins, comme chez le cerf élaphe, des sites spécifiques de liaison de la mélatonine ont été identifiés dans la *pars tuberalis*, au niveau des *colliculus* supérieurs, des plexus choroïdes et dans l'hippocampe (Lincoln 1998).

Chez le cerf élaphe, la *pars distalis* est également un site de liaison spécifique (Williams *et al* 1996). Toutefois, les structures précises et les mécanismes impliqués dans le contrôle de la saisonnalité restent à déterminer. Il semble que la mélatonine agisse au niveau de l'hypothalamus medio basal sur les sécrétions pulsatiles de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Ainsi les sécrétions en hormones sexuelles ou hormones gonadotropes LH et FSH (Luteinizing and Follicle Stimulating Hormone) sont elles modifiées par la mélatonine au cours de l'année *via* le GnRH. Les variations de sécrétions d'hormones gonadotropes ont pour conséquence de moduler l'activité des gonades (ovaires et testicules).

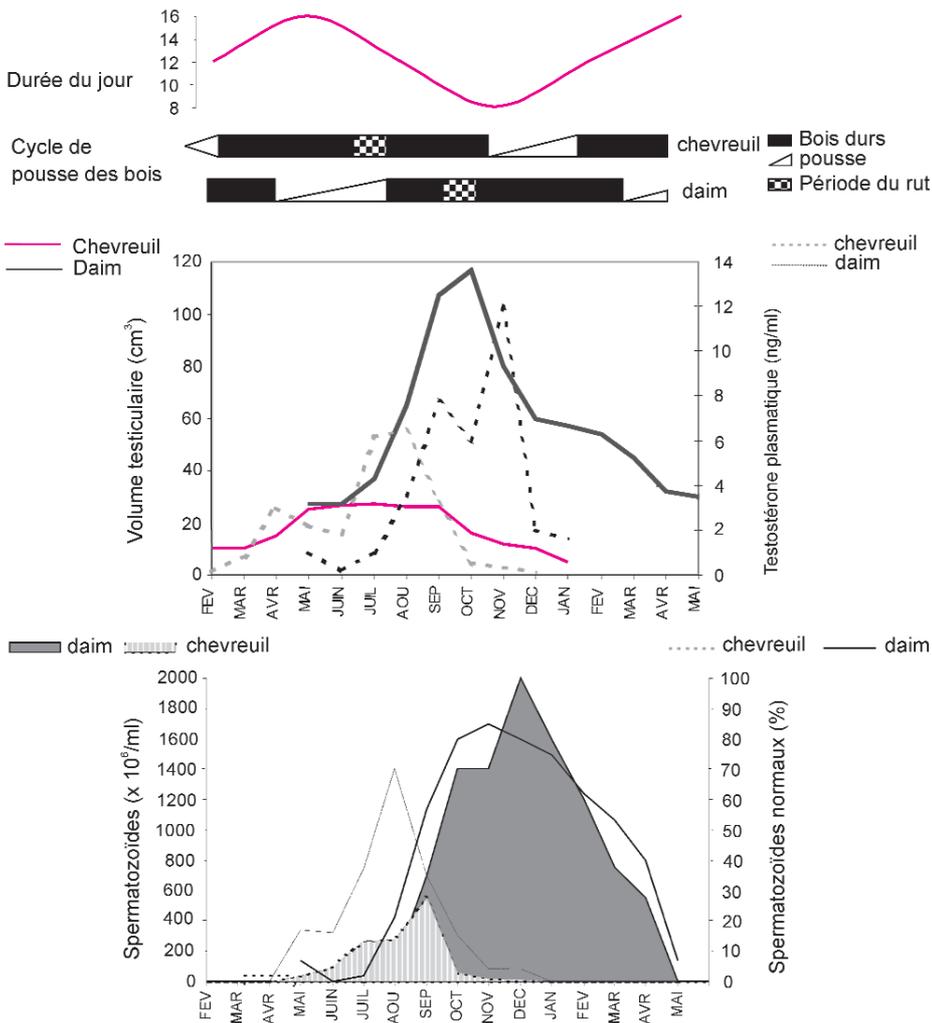
1.2 / La fonction de reproduction chez le mâle

Chez le bélier ou le bouc sous nos latitudes, des variations saisonnières du poids et volume testiculaire ainsi que de production spermatique quotidienne sont observées. Ainsi, la production spermatique quotidienne chez le bélier Ile-de-France est quatre fois plus élevée en automne qu'au printemps (Dacheux *et al* 1981). Chez les cervidés originaires des zones tempérées (cerf élaphe, daim, chevreuil notamment) ces variations prennent des proportions plus importantes que celles décrites chez les animaux domestiques. Nous traiterons ici du cas général et nous verrons que la variété des répartitions géographiques et des stratégies évolutives ont généré un certain nombre d'exceptions, avec des espèces au profil reproductif particulier.

a) Activité sexuelle

Chez les cervidés originaires des zones tempérées, il est possible d'observer des cycles annuels de pousse des bois ainsi que des variations de volume testiculaire et de testostéronémie. L'association de ces cycles chez le daim d'Europe et le chevreuil adulte sont représentés dans la figure 1. Sous nos latitudes, la période du rut se situe en juillet-août pour le chevreuil, septembre-octobre pour les cerfs élaphe et sika et en octobre-novembre pour le daim (sika : Hamasaki *et al* 2001, Kameyama *et al* 2002, daim : Gosch et Fischer 1989). Le volume testiculaire, les concentrations de testostérone plasmatique et de spermatozoïdes dans l'éjaculat ainsi que la proportion de spermatozoïdes normaux augmentent fortement dans la période qui précède le rut et atteignent un maximum durant celui-ci (figure 1). La fertilité des mâles est

Figure 1. Comparaison de l'influence de la durée du jour sur la pousse des bois, le volume testiculaire, la testostéronémie, la quantité et la morphologie des spermatozoïdes entre le daim d'Europe et le chevreuil (adapté de Gosch et Fischer 1989 et de Goeritz et al 2003).



alors remarquable puisque dans les élevages, il n'est pas rare de voir utiliser un mâle pour saillir plus d'une cinquantaine de biches sur une période ne dépassant pas trois semaines avec un taux de mise bas au printemps de l'ordre de 90 %. Dans la période qui suit le rut, les différents paramètres précités diminuent plus ou moins progressivement jusqu'au printemps. Chez le chevreuil, il est à noter que les types d'anomalies observés sur les spermatozoïdes diffèrent en proportions au cours de la saison sexuelle. Les anomalies prédominantes concernent la tête en début de saison sexuelle et la flagelle en fin de saison (Goeritz *et al* 2003). La taille testiculaire fait l'objet d'une régression spectaculaire puisqu'elle est près de 4 fois moins importante au printemps au moment de la chute des bois que lors du rut (élaphe : Hochereau-de Reviers et Lincoln 1978). Chez l'élaphe, le daim ou le chevreuil, la production spermatique chute jusqu'à une aspermie complète pendant la phase de repousse

des bois (élaphe : Haigh *et al* 1984, daim : Gosch et Fischer 1989, Asher *et al* 1996, chevreuil : Goeritz *et al* 2003). L'aspermie observée est assez caractéristique des cervidés, proposant un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes hormonaux de la régulation de la spermatogenèse. Chez le chevreuil, ni spermatides ni spermatocytes ne peuvent être observés en dehors de la période allant d'avril à octobre (Schon *et al* 2004). La production de spermatozoïdes semble donc cesser en dehors de cette fenêtre d'activité sexuelle. Par contre, le nombre total de spermatogonies (A1 à A4) par testicule ainsi que leur proportion relative semblent augmenter durant les mois de novembre et de décembre (Roelants *et al* 2002). Ceci suggère que pendant la période de quiescence, les divisions continuent à un niveau suffisant pour permettre l'accumulation de spermatogonies pendant l'hiver, qui seront à la source de l'intense production de spermatocytes au printemps suivant.

b) Hormones gonadotropes

Chez le daim, des différences notables de concentration et de pulsativité de LH peuvent être observées au cours de l'année et plus particulièrement durant la transition de la phase d'inactivité vers la phase d'activité sexuelle (Asher *et al* 1989a, Asher et Peterson 1991). Les niveaux de LH sont très faibles du mois de décembre au mois de juin et élevés de juillet à octobre. La pulsativité de LH augmente de 0-2 pulses / 24 h à environ 5-7 pulses / 24 h entre les mois de juillet et août. En septembre et octobre, bien que la pulsativité de LH diminue (0-1 pulse par 24 h) les concentrations restent élevées et les niveaux de testostérone sont alors fortement augmentés. Chez le mâle castré, la sécrétion pulsatile de LH est également plus élevée durant la transition vers la phase d'activité sexuelle. Les concentrations et la pulsativité de LH observées chez les mâles castrés sont toujours plus élevées que chez les mâles entiers. Les modifications de sécrétions d'hormones gonadotropes semblent influencées par la saison sexuelle de façon dépendante des stéroïdes testiculaires.

c) Contrôle de la saisonnalité

L'influence de la photopériode sur le cycle des bois et sur les variations hormonales associées a été clairement démontrée chez le daim, le sika ou l'élaphe puisqu'il est possible d'induire des cycles inversés ou accélérés de pousse de bois et de variations testiculaires au cours d'une même année en soumettant des mâles de ces espèces à un régime photopériodique inversé ou accéléré (Goss 1969a, Suttie *et al* 1989, Rolf et Fischer 1996). Cependant, dans certaines conditions d'accélération du régime photopériodique, il est possible d'observer un décalage du cycle des bois, permettant chute, croissance et minéralisation pendant la phase de diminution de la durée du jour (Rolf et Fischer 1996). Chez le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), la pinéalectomie provoque une désynchronisation du cycle d'activité sexuelle. En comparaison d'animaux témoins, un retard de trois mois environ peut être observé dans les variations de diamètre scrotal, la date de début de croissance, de minéralisation et de chute des bois. Dans ce cas, les variations de prolactine dans le sang périphérique suivent un profil identique au regard du cycle des bois mais pas au regard de la photopériode (Snyder *et al* 1983). De même, l'exposition de cerfs sika à des jours longs ou courts dont la durée est constante per-

met la croissance et la chute de bois mais à des intervalles irréguliers (Goss 1969b). Ainsi, chez les cervidés comme chez les ovins, les variations photopériodiques semblent permettre d'induire et de synchroniser un rythme endogène de variation d'activité sexuelle *via* les sécrétions de mélatonine par la glande pinéale. Chez l'élaphe, l'administration d'implants de mélatonine à des mâles, ayant subi ou non une ablation des ganglions cervicaux supérieurs au mois de mai, permet la minéralisation précoce des bois, signe de modifications des sécrétions d'hormones gonadotropes. Un rappel d'immunisation active contre le GnRH, immédiatement après cette minéralisation précoce provoque la chute des bois environ 30 jours plus tard. Chez ces cervidés, il semble que le principal mécanisme d'entrée en saison sexuelle soit dépendant des variations photopériodiques et de sécrétion de mélatonine qui, à l'instar des caprins ou ovins, modifieraient les sécrétions d'hormones gonadotropes par action sur le système à GnRH (Lincoln *et al* 1984).

Si le mécanisme d'entrée en saison sexuelle a été relativement bien étudié chez les cervidés, peu de données concernent la transition vers la période d'inactivité sexuelle. Il est probable que les variations photopériodiques (augmentation de la durée du jour) soient responsables de ce phénomène. Cependant, il est possible que d'autres facteurs hormonaux tels que les hormones thyroïdiennes puissent jouer un rôle important. En effet, chez la brebis ou le bélier, la thyroïdectomie abolit les variations saisonnières d'activité sexuelle ou de sécrétions de LH (Moenter *et al* 1991). Chez le mâle élaphe, en fin de saison sexuelle, une élévation des concentrations d'hormones thyroïdiennes peut être observée (Loudon *et al* 1989, Shi et Barrell 1994). Chez l'élaphe, la thyroïdectomie retarde la période de repos sexuel ou empêche celle-ci d'avoir lieu. L'administration quotidienne d'hormones T4, permet de rétablir la régression testiculaire et la chute des bois. Il est toutefois à noter que l'administration précoce de T4 ne permet pas d'avancer la fin de la saison sexuelle (Shi et Barrell 1994).

d) Les bois, un caractère sexuel secondaire qui reflète les variations d'activité sexuelle

Chez les cervidés, les bois sont un caractère sexuel secondaire caractéristique du mâle, exception faite pour le renne (*Rangifer tarandus*) dont la

femelle porte également des bois. Pour ces femelles, le fait de porter des bois est un avantage puisqu'elles les utilisent comme moyen de défense contre les prédateurs (période coïncidant avec la gestation) mais également comme outils pour atteindre leur nourriture dans le sol gelé. Les bois sont des prolongements des os frontaux, ramifiés et caducs. Chez les mâles et au moment du rut, les bois sont utilisés dans les combats engagés pour l'établissement d'une hiérarchie. Le bois de cerf est une structure qui doit être solide (jusqu'à 8 kg d'os compact chez l'élaphe) pour répondre à la violence des combats et permettre ainsi aux mâles dominants d'accéder à la reproduction. Il est probable de ce point de vue qu'au cours de l'évolution, la solidité des bois ait été un critère sélectif déterminant. Le cycle annuel des bois comprend des phases de pousse (bois en velours), de minéralisation (bois durs ou secs) et de chute. Ces modifications influencent les habitudes territoriales du mâle qui préférera les zones de plaines lors de la fragile phase de pousse des bois et les sous-bois, après la minéralisation.

Chez le cerf élaphe, lors de la première année et au moment de la puberté, se développent deux excroissances depuis l'os frontal de la boîte crânienne : les pivots. L'âge auquel débute la croissance des pivots varie entre le 5^e et le 8^e mois de vie. Il est influencé par l'état nutritionnel de l'animal (retardé en cas de restriction alimentaire), mais semble également dépendre de l'entraînement photopériodique (Suttie *et al* 1984, Fennessy et Suttie 1985, Suttie *et al* 1989, Suttie *et al* 1991, Webster *et al* 1999). Le développement des pivots est associé à l'augmentation du volume testiculaire et des niveaux de testostérone plasmatique (Suttie *et al* 1984, Suttie *et al* 1991). En effet, la castration du mâle pré pubère empêche le développement des pivots qui peut alors être rétabli grâce à l'administration de testostérone exogène (Wislocki *et al* 1947). De même, il est possible d'induire la formation et la pousse de bois chez la femelle par un apport de testostérone exogène (Li *et al* 2003). Si la testostérone est nécessaire à la formation des pivots, l'administration d'une forte dose exogène inhibe la croissance des bois (Goss 1968). Durant cette phase de formation des pivots, l'amplitude des pulses de LH diminue quelque peu mais leur fréquence augmente (3,37 vs 7,67 pulses / 24 h) entraînant une hausse de la fréquence des pulses de testostérone et

donc une élévation importante des niveaux plasmatiques (Lincoln 1971, Suttie *et al* 1991).

Les premiers bois (dagues, non ramifiés et dépourvus de meules) débute leur pousse une fois les pivots formés (9^e mois). Ils sont recouverts du velours, qui assure vascularisation et protection. Après 12 semaines de pousse, ils atteignent une taille moyenne de 40 cm (Fennessy et Suttie 1985). Durant cette phase de croissance, on observe une diminution des niveaux plasmatiques moyens de testostérone entraînée par la chute en fréquence et amplitude des pulses de LH (7,67 vs 4,73 pulses / 24 h) (Suttie *et al* 1991). La croissance du velours terminée, la fréquence des pulses de LH double et la testostéronémie augmente alors fortement, provoquant le dessèchement du velours et sa minéralisation. Au 15^e mois, les bois sont alors dits secs ou durs et sont, en définitive, un tissu osseux mort solidement rattaché au pivot. Les bois durs sont donc le reflet de l'activité testiculaire, traduisant l'augmentation de la testostéronémie du fait de l'androgéno-dépendance de leur minéralisation (Fennessy et Suttie 1985, Suttie *et al* 1984, Li *et al* 2003). Signes de l'importance de la testostérone dans ce phénomène, la minéralisation peut être empêchée en procédant à la castration du mâle qui conserve alors des bois de velours (Wislocki *et al* 1947, Lincoln et Kay 1979). Si elle est réalisée après la minéralisation, la castration provoque la chute des bois tandis que l'administration de testostérone permet leur maintien (Wislocki *et al* 1947). Dans ces deux cas, il est possible de rétablir respectivement la minéralisation et le maintien des bois secs par l'administration de testostérone exogène (Wislocki *et al* 1947, Li *et al* 2003). Toutefois, il semble que d'autres facteurs soient impliqués dans la régulation de la croissance et de la minéralisation des bois. Chez la femelle du renne, la testostérone d'origine surrénalienne ne semble pas être impliquée dans la régulation de la minéralisation des bois (Bubenik *et al* 1997). D'autres stéroïdes sexuels ou facteurs de croissance semblent pouvoir intervenir dans ce phénomène tels que l'oestradiol, l'androstenedione ou l'IGF1 (Insulin like Growth factor) (Goss 1968, Bubenik *et al* 1987, Lincoln et Tyler 1999).

La chute des bois intervient normalement au printemps, probablement sous l'effet de la photopériode (augmentation de la durée du jour) et de facteurs

nutritionnels entraînant une diminution progressive de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH et de testostérone. La résultante est une chute dramatique des niveaux de testostérone. Durant près de 2 semaines après la chute des bois, il n'est pas possible d'observer de pulses de LH ou de testostérone (Suttie *et al* 1992). Un nouveau cycle débute alors avec la croissance de nouveaux bois de velours. Les niveaux de testostérone sont faibles et n'augmentent ensuite que très progressivement jusqu'à la minéralisation.

e) Cas particulier : espèces subtropicales

Les cervidés originaires des zones subtropicales (20° S à 20° N) sont peu saisonnés voir non saisonnés dans leur habitat naturel et il est classiquement admis que ces espèces le restent une fois placées dans des zones tempérées. Mais en fait, plusieurs cas de figures se présentent, traduisant des adaptations différentes des espèces à leur environnement et témoignant de l'extraordinaire diversité de la famille des cervidés. Quelques exemples illustrent bien le phénomène :

– Le cerf axis (*Axis axis*), qui n'est pas saisonné dans son milieu d'origine (Inde, Sri Lanka...), ne le devient pas lorsqu'il est transporté sous des latitudes moyennes à élevées. En effet, quelque soit la latitude, on observe une répartition des mises bas des femelles assez homogène sur l'année (Loudon et Curlewis 1988). Individuellement, le mâle présente des changements de volume testiculaire et de testostéronémie qui sont bien associés avec le cycle des bois bien que ces variations soient moins marquées que pour l'élaphe ou le daim. Mais, contrairement aux espèces originaires des zones tempérées, le synchronisme du cycle des bois entre les individus semble moins prononcé, y compris sous des latitudes élevées (51° N). De plus, il est possible de collecter des spermatozoïdes motiles quelque soit le stade du cycle des bois y compris durant la période de repousse (Loudon et Curlewis 1988). Les mêmes auteurs ont suggéré qu'une capacité de stockage de l'épididyme pouvait expliquer le phénomène. Les récents travaux de Willard et Randel, bien que menés sous des latitudes moins élevées (28-32° N) suggèrent en fait une spermatogenèse continue (Willard et Randel 2002). Il est à noter que dans l'étude de Loudon et Curlewis, l'administration de mélatonine sous forme d'implants sous cutanés à des mâles dont les bois étaient en début de croissance (au mois de mai)

n'a eu aucun effet sur la croissance testiculaire ou sur le cycle des bois en comparaison des témoins. Ceci suggère que chez le cerf axis, l'entraînement de l'activité de reproduction par la photopériode et la mélatonine soit inexistant.

– A l'instar du cerf axis, le cerf muntjac (genre *Muntiacus*) se reproduit toute l'année. Les différentes sous-espèces sont principalement distribuées au sud de la Chine, en Malaisie, au Bangladesh ou dans les îles indonésiennes (Sumatra, Bornéo...). Une fois placés sous des latitudes élevées (52° N), les mâles présentent un synchronisme élevé dans le cycle de pousse des bois qui est assez similaire à ce qui est observé chez l'élaphe. La castration provoque également la chute des bois et empêche la minéralisation des bois en velours mais, chez le muntjac, les variations saisonnières du poids testiculaire ou de la testostéronémie sont nettement moins marquées que chez des espèces originaires des zones tempérées. Comme pour le cerf axis, la spermatogenèse semble rester continue (Chapman et Harris 1991).

– Le cerf d'Eld (espèce originaire d'Indochine et de Chine du Sud) montre dans son milieu d'origine un saisonnement très marqué avec une répartition des mises bas en octobre-novembre. Placé sous des latitudes élevées il conserve ces périodes de reproduction : le rut se déroule lorsque la durée du jour augmente, à savoir en fin d'hiver et au début du printemps avec des mises bas de septembre à novembre. Entre individus, le synchronisme du cycle des bois est élevé et bien associé à la taille testiculaire et à la testostéronémie (Monfort *et al* 1993b). Quelque soit la saison, il est possible de trouver des spermatozoïdes motiles dans les éjaculats puisque le cerf d'Eld ne semble pas présenter d'aspermatogenèse saisonnée. Par contre, on observe de fortes variations dans la qualité du sperme produit avec une forte proportion de spermatozoïdes anormaux en automne (Montfort *et al* 1993b).

1.3 / La fonction de reproduction chez la femelle

a) Activité sexuelle

Comme nous avons pu le voir chez le mâle, les femelles originaires des zones tempérées présentent également un cycle saisonnier marqué de leur fonction de reproduction. Chez la biche élaphe adulte, la période d'inactivité sexuelle est caractérisée par un état d'anoestrus associé à une absence d'ovula-

tion. L'entrée en saison sexuelle se traduit par une première ovulation silencieuse en septembre-octobre (début avril dans l'hémisphère Sud), suivie d'un premier oestrus 8,7 jours plus tard, synonyme d'une régression prématurée du premier corps jaune ou cycle court (Asher *et al* 2000a). Concernant le moment du premier oestrus saisonnier, un degré élevé de synchronisme peut être observé entre les femelles. Signe de l'association de ce synchronisme et d'une fertilité exceptionnelle, la plupart des femelles sont fécondées au premier oestrus puisque dans les élevages de l'hémisphère Sud, 91,4 % des adultes sont gestantes avec une date de conception antérieure au 1er mai (soit le 1er novembre dans l'hémisphère Nord) (Audige *et al* 1999). Il est à noter que, chez les bichettes, le moment du premier oestrus semble décalé d'environ trois semaines par rapport à celui des adultes. D'une manière générale, il est très difficile de mener des observations du comportement d'oestrus chez les cervidés. Plusieurs types de comportements peuvent être observés durant la séquence pré-copulatoire (Guinness *et al* 1971). Le premier signe de venue en chaleur chez la biche semble être la relative proximité du mâle qui se tient à moins de 15 m de la femelle. D'après Guinness et collaborateurs, le mâle semble « garder » la femelle. Progressivement, l'intérêt du mâle pour la femelle augmente. La biche réagit aux sollicitations du mâle par la fuite. Lorsque la femelle se couche, le mâle l'incite à se relever par des mouvements de tête sur l'arrière main. Progressivement, les réactions de fuite de la femelle diminuent et la biche au lieu de fuir, s'immobilise. L'accouplement suit généralement immédiatement. La durée de la période d'oestrus chez la biche élaphe est de l'ordre de 24 heures.

En absence d'accouplements, les femelles sont polyo-oestriennes. Le suivi de la progestéronémie montre que les femelles peuvent présenter 5 à 10 cycles ovulatoires dont la durée moyenne est d'environ 19 jours chez l'élaphe (Guinness *et al* 1971, Asher *et al* 2000, Garcia *et al* 2002). Par ailleurs, il semble que la durée des cycles puisse s'allonger au fur et à mesure de leur succession (Guinness *et al* 1971). Ainsi, chez la femelle élaphe et sous nos latitudes, une succession de cycles oestriens peut être observée sur une période allant de septembre à mars. L'entrée en saison sexuelle se caractérise par une augmentation discrète des niveaux de progestérone (< 1 ng/ml) suite à l'ovulation silencieuse. Les

cycles qui suivent le premier oestrus sont caractérisés par des niveaux de progestérone élevés (> 3 ng/ml) (figure 2a).

Entre les espèces, des variations du moment du rut, de la durée et du nombre de cycles ainsi que de la durée de gestation peuvent être observées (tableau 2). Chez les femelles sika, renne ou père David, les durées de cycles sont assez comparables à ce qui peut être observé chez l'élaphe (sika : Liu *et al* 2002, renne : Ropstad 2000, père David : Curlewis *et al* 1988). Chez le daim, la femelle présente des cycles quelque peu plus longs (22,4 jours). La durée de la saison sexuelle est influencée par l'âge des femelles et peut varier de 65 à 135 jours, ce qui correspond à 3 ou 6 cycles par femelle (Asher 1985).

b) Croissance folliculaire

– Période d'activité sexuelle

Chez de nombreuses espèces de cervidés, les femelles sont mono-ovulantes, c'est-à-dire que pendant la saison et au cours du cycle oestral, un seul follicule dit dominant parvient à l'ovulation. Chez la biche élaphe, l'étude de la croissance folliculaire par suivi échographique proposée par Asher et collaborateurs montre qu'en saison sexuelle, la taille moyenne de la population de follicules varie quotidiennement au cours du

cycle mais que par contre, le nombre total de follicules de plus de 3 mm de diamètre ne variait que de façon discrète (1,8 à 3,4). Cette étude montre également que sur une durée de cycle d'environ 19 jours, une à trois vagues d'émergence et de disparition d'un plus gros follicule (1 à 3 follicules dominants en croissance selon les animaux) pouvaient être observées (figure 3a). Suite à la régression ou ovulation de cet unique gros follicule, de nouveaux follicules émergent alors, suggérant un effet dit de « dominance » de ce follicule (figure 3a). Les petits follicules (3 mm de diamètre) sont donc présents surtout en début de cycle après disparition (ovulation) du précédent follicule dominant (Asher *et al* 1997). La dynamique de la croissance folliculaire semble similaire chez la daine (Asher *et al* 1999).

Les variations hormonales au cours du cycle ont été bien caractérisées chez la femelle du renne ou chez le daim et sont similaires à ce qui peut être observé chez la brebis (renne : Ropstad *et al* 1995, daim : Asher *et al* 1986, Asher *et al* 1988, Asher *et al* 1990). Le cycle oestral peut être caractérisé par la succession d'une phase folliculaire qui correspond au recrutement de follicules jusqu'à l'ovulation et d'une phase lutéale (lutéotrope et lutéolytique) qui débute après l'ovulation jusqu'à la régression du corps jaune. La phase folliculaire fait suite à la chute des concentrations de progestérone, et est

associée à une « reprise » de croissance folliculaire. Au cours de cette phase (environ 3 jours chez le renne), les niveaux d'oestradiol augmentent sous l'effet des gonadotrophines pour atteindre des valeurs maximales dans les 3 heures qui précèdent le pic pré-ovulatoire de LH (Ropstad *et al* 1995). Chez la biche élaphe, les niveaux d'oestradiol plasmatiques peuvent atteindre des valeurs très élevées (moyenne 89 pg/ml) le jour de l'oestrus (Kelly *et al* 1985). Chez la daine, l'augmentation d'oestradiol qui précède le moment de l'oestrus n'est pas significative et les valeurs maximales semblent atteintes 2 heures après ce dernier (Asher *et al* 1986).

Chez le cerf de Virginie dont la durée de cycle est plus longue, cette augmentation semble intervenir plus tôt (3-4 jours) vis-à-vis du moment d'oestrus (Plotka *et al* 1980). Il est à noter que chez la daine, une forte augmentation des concentrations d'androstènedione peut être observée au moment de l'oestrus reflétant probablement l'intensification de la stéroïdogenèse folliculaire sous l'effet de la LH (Asher *et al* 1986). Chez la biche élaphe supplémentée en progestérone par pose d'implants intra-vaginaux de type CIDR (Controlled Internal Drug Releasing, 0,3 g), il a été possible de caractériser la phase folliculaire à différents moments à partir du retrait de l'implant. Le moment d'apparition du pic préovulatoire intervient dans ce cas $44,5 \pm 6,6$ h après le retrait de l'implant (McLeod *et al* 2001a). Il semble dans ce cas que les niveaux d'oestradiol dans le fluide folliculaire, l'activité aromatasase des cellules de granulosa et leur production d'AMPC (mesurée *in vitro*) augmentent à partir du retrait du CIDR pour atteindre un maximum 24 h après celui-ci et diminuer ensuite (36 h).

La phase lutéale débute après la rupture folliculaire et est associée à une élévation de la progestérone. Chez l'élaphe, l'augmentation débute au 3-4^e jour après l'oestrus et atteint un maximum au 10-16^e jour (Asher *et al* 1997). Chez les biches élaphe dont l'oestrus est synchronisé, les niveaux de progestérone chutent à des valeurs inférieures à 1 ng/ml entre le 18^e et le 25^e jour suivant le retrait du traitement progestagène. Il est bien établi chez la plupart des ruminants que les sécrétions endogènes de prostaglandines produites essentiellement par l'utérus sont responsables de la lutéolyse en fin de cycle non fécond. Ceci a pu être confirmé chez la daine, puisque l'hystérectomie réalisée au 13^e jour du cycle

Figure 2. (a) Suivi saisonnier de l'activité lutéale chez une biche élaphe par mesure de progestérone sous une latitude élevée de l'hémisphère nord (adapté de Asher *et al* 2000). La flèche pleine désigne le moment de l'ovulation silencieuse. (b) Evolution des taux plasmatiques de LH chez la biche élaphe ovariectomisée (o) et ovariectomisée et supplémentée en oestradiol (o) (adapté de Meikle et Fisher 1996).

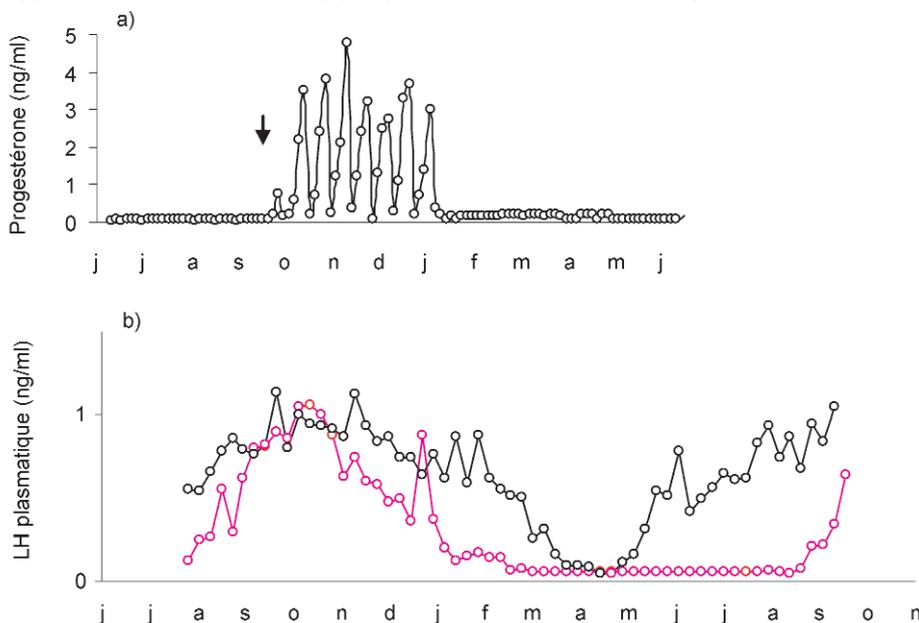


Tableau 2. Origines géographiques et caractéristiques de reproduction de différentes espèces ou sous-espèces de cervidés.

Nom scientifique Genre, espèces, sous-espèces	Origine géographique	Période du rut ¹	Durée du cycle chez la femelle	Durée de la gestation	Références
<i>Axis axis</i>	Inde	peu saisonnée	18 j 19,3 j	238-242 j 234,5 j	Loudon et Curlewis 1988 Chapple <i>et al</i> 1993 Mylrea <i>et al</i> 1999
<i>Capreolus capreolus</i>	Europe et Asie Mineure	Juil-Août	– *	290-300 j*	Aitken 1974
<i>Cervus elaphus scoticus</i>	Europe	Sept-Oct	19 j	231 j	De Vos 1982 Guinness <i>et al</i> 1971
<i>Cervus eldi thamin</i>	Birmanie, Tenasserim et partie adjacente de la Thaïlande	Fév-Mars	21,5 j	236-246 j	Prescott 1987 Yuan <i>et al</i> 1998 Montfort <i>et al</i> 1990
<i>Cervus nippon</i>	Japon, archipels adjacents, Corée, Chine...	Oct-Nov	19 j	226-234 j	Bing-Tsan, Liu <i>et al</i> 2002 Hamasaki <i>et al</i> 2001 Miura 1984
<i>Dama dama dama</i>	Europe et Asie Mineure	Oct-Nov	21-22 j	229-234 j 234 j	Gosch, Fischer 1989 Asher <i>et al</i> 1985
<i>Elaphurus davidianus</i>	Chine	Juil-Août	19,5 j	280-282 j	Curlewis <i>et al</i> 1988 Brinklow, Loudon 1993
<i>Odocoileus virginianus virginianus</i>	Virginie et Etats adjacents	Nov	28 j	200 j	Plotka <i>et al</i> 1977a
<i>Rangifer tarandus tarandus</i>	Norvège et Russie	Sept-Oct	19,4 j	225-235 j	Ropstad 2000
<i>Muntiacus reevesi</i>	Chine du Sud-Est, Taïwan	peu saisonnée	?	210 j	Chapman et Harris 1991

¹ Sous des latitudes élevées de l'hémisphère nord.

* Espèce mono-oestrienne présentant une diapause et implantation embryonnaire différée.

abolit la cyclicité (Asher *et al* 1988). Comme pour la vache ou la brebis, la lutéolyse est associée (au 18^e jour chez la biche) à des pulses synchrones d'ocytocine et de PGF2 α (Bainbridge *et al* 1996, Bainbridge et Jabbour 1997). Il est à noter que chez le daim, le synchronisme des pulses d'ocytocine et de PGF2 α (mesurée par les niveaux des métabolites de PGF2 α) n'est pas aussi évident (Asher *et al* 1988). Chez l'élaphe, l'injection d'ocytocine exogène provoque la sécrétion de PGF2 α (Flint *et al* 1994) et celle d'un analogue de PGF2 α libère l'ocytocine (Flint *et al* 1991) suggérant l'existence d'un feedback positif. Ce rétrocontrôle positif est activé en fin de cycle du fait de l'augmentation des niveaux d'oestradiol qui entraînent une sensibilité plus élevée de l'endomètre à l'ocytocine d'origine ovarienne et/ou extra-ovarienne (Bainbridge *et al* 1996, Bainbridge et Jabbour 1999). La progestérone et

l'oestradiol semblent intervenir au niveau des cellules de l'endomètre dans la régulation de l'expression des récepteurs à l'ocytocine et par conséquent moduler la sensibilité du système au cours du cycle (Spencer et Bazer 2004).

– Période de repos sexuel

Les observations faites en dehors de la saison sexuelle chez la femelle wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) ont confirmé des variations du nombre total de follicules observés sur l'ovaire. Des pics d'apparition et de disparition de follicules suggèrent une vague de croissance folliculaire tous les 7 jours associée à l'émergence d'un follicule dominant (McCorkell *et al* 2004). En comparaison, avec ce qui peut être observé en saison sexuelle, le nombre total de follicules n'est pas diminué durant l'anoestrus (figure 3b). Par contre, traduisant certainement les modifications des niveaux d'hormones gona-

dotropes, la durée de vie, la taille moyenne ainsi que la taille maximale atteinte par ces follicules sont sensiblement inférieures aux observations faites pendant la saison sexuelle (Asher *et al* 1997, Mac Corkell *et al* 2004).

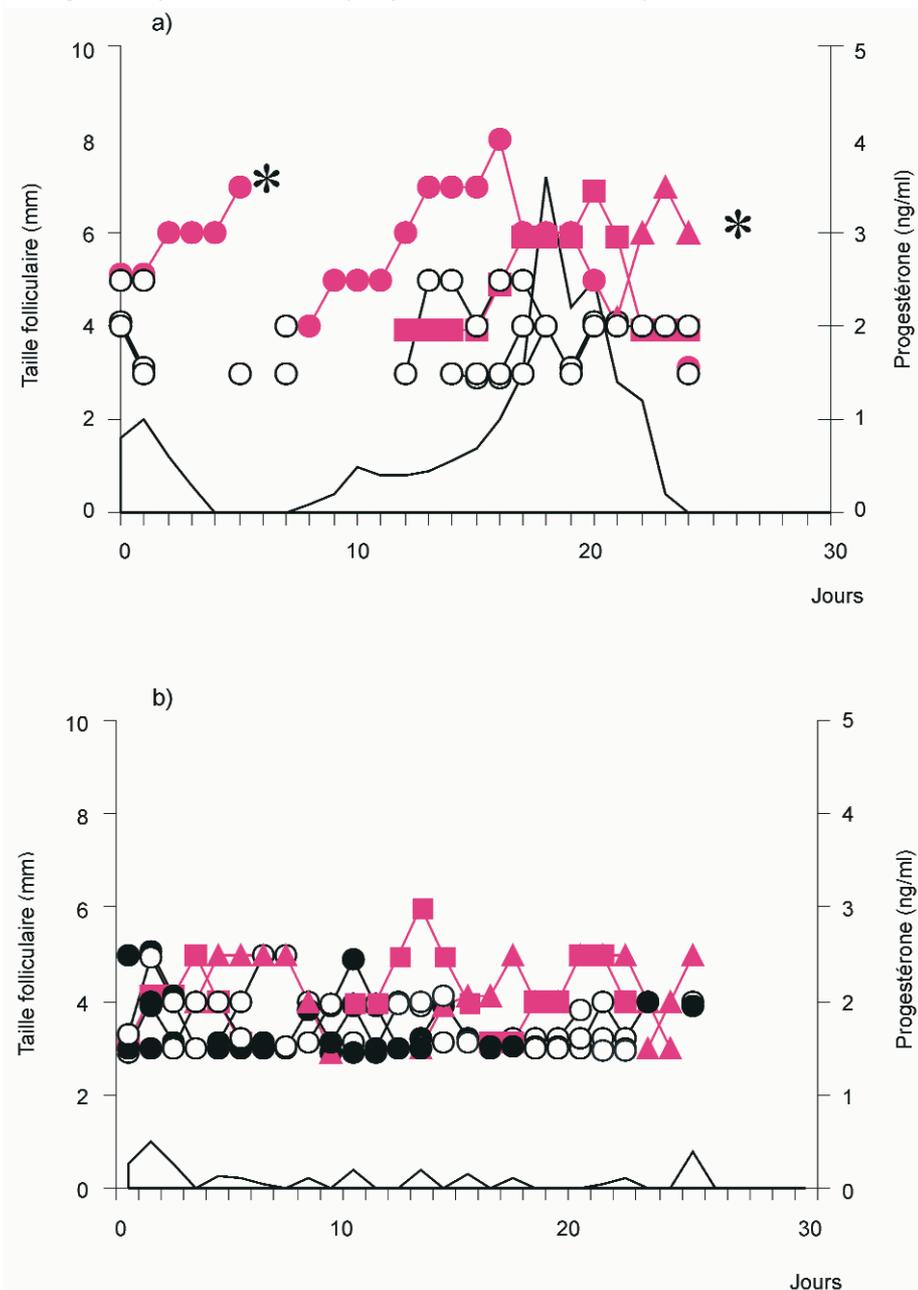
c) Hormones gonadotropes

Comme nous l'avons évoqué chez le mâle, les variations d'activité sexuelle résultent de changements de sécrétions d'hormones gonadotropes. Les études des mécanismes responsables de ces variations d'activité ont été réalisées principalement chez les femelles du cerf élaphe et du daim.

Chez les biches ovariectomisées et supplémentées ou non en oestradiol, des différences importantes peuvent être observées en fonction de la période de reproduction. La concentration de LH est élevée durant la période des jours courts et faible pendant les jours

Figure 3. Profils de croissance folliculaire déterminés par suivi échographique des follicules dominants (●▲■) ou subordonnés (○●) et niveaux de progestérone chez une biche élaphe durant le mois de (a) décembre et (b) mai.

*Désigne la rupture du follicule (adapté de Asher et al 1997).



longs et à plus forte raison en absence d'oestradiol (Meikle et Fisher 1996). La pulsatilité de LH chez les femelles ovariectomisées est significativement réduite entre la période d'activité et de repos sexuelle (4 vs 1 pulse/h respectivement, figure 2b). De même, l'amplitude des pulses semble réduite (Anderson et Barrell 1998a). Il semble que l'oestradiol exerce un effet inhibiteur sur la libération de LH (figure 2b). La réponse à l'administration de 10 µg de GnRH mesurée par les niveaux de LH en saison sexuelle est supérieure à celle observée en période d'anoestrus chez ces femelles. Il est à noter que les

femelles ayant reçu de l'oestradiol présentent en saison sexuelle des concentrations de LH en réponse au GnRH près de 2 fois plus élevées par rapport aux biches ovariectomisées (Meikle et Fisher 1996). Aussi il semble que des mécanismes à la fois dépendants et indépendants des stéroïdes soient impliqués dans les modifications saisonnières de sécrétion de LH.

d) Contrôle de la saisonnalité

A l'instar de ce que nous avons déjà décrit chez le mâle, les variations d'activité sexuelle sont influencées par la photopériode (Webster et Barrell

1985). Chez l'élaphe, il est par exemple, possible d'avancer le moment du premier oestrus d'un mois en soumettant les femelles à une photopériode courte (8 h de lumière par jour) à partir du solstice d'été. Un résultat identique peut être obtenu par administration de mélatonine. Dans ces deux cas, les niveaux de prolactine sont significativement diminués en comparaison d'animaux témoins et la mue du pelage est avancée (Webster et Barrell 1985). Chez la daine, l'administration de mélatonine sous forme d'implants sous cutanés en été permet également l'avancée de la saison sexuelle (Asher et al 1988). Il semble que l'entraînement photopériodique chez les femelles de cervidés soit assuré par des mécanismes similaires à ceux décrits chez le mâle.

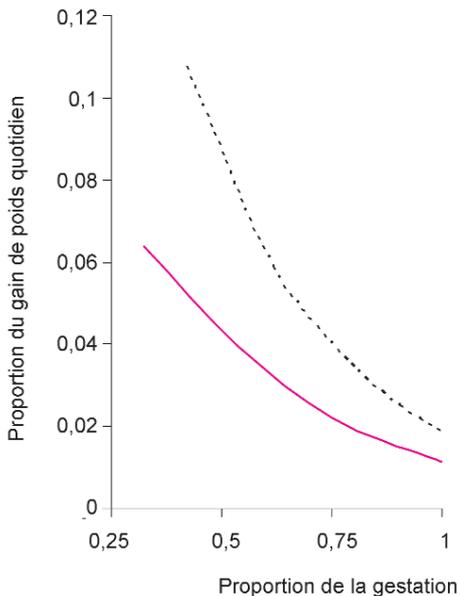
Le rôle des hormones thyroïdiennes en fin de la saison sexuelle a également fait l'objet d'études. Chez la femelle élaphe thyroïdectomisée, un allongement de la durée de la saison sexuelle peut être observé. La supplémentation en hormone T4 permet de rétablir une durée d'activité sexuelle comparable aux témoins. Comme nous l'avons vu plus haut, chez les femelles ovariectomisées supplémentées ou non en oestradiol, les niveaux et la pulsatilité de LH sont faibles en dehors de la saison sexuelle. En présence d'oestradiol, des profils de concentration de LH identiques peuvent être observés entre les femelles ayant subi une thyroïdectomie ou leur témoins. Par contre, en absence d'oestradiol, les concentrations de LH sont augmentées chez les femelles thyroïdectomisées à la période correspondant à la sortie de la saison sexuelle. Ainsi les hormones thyroïdiennes semblent nécessaires à l'expression de profils de reproduction saisonniers (fin de saison sexuelle) en exerçant un effet négatif sur les sécrétions de LH indépendamment de l'oestradiol (Anderson et Barrell 1998b).

e) Cas particulier : espèces subtropicales

Chez les femelles du cerf axis (*Axis axis*) placées sous des latitudes élevées, la cyclicité est observée tout au long de l'année. La durée moyenne des cycles est de 18 jours (Mylrea et al 1999). Pour cette espèce, à l'instar de ce qui a pu être décrit chez le mâle, il semble que le signal photopériodique n'influence pas la fonction de reproduction.

Dans son milieu d'origine (Philippines, Indonésie, Chine du sud, Birmanie, Inde...), le cerf sambar

Figure 4. Comparaison du taux de croissance fœtal au cours de la gestation chez l'élaphe (—) et chez la brebis portant 2 fœtus (---) (d'après les données de Robinson et al 1977, Adam et al 1988).



(*Cervus unicolor*) se reproduit toute l'année. Placée sous des latitudes élevées, la femelle présente un nombre très variable de cycles dont la durée moyenne est de 17 jours (Asher et al 1997). Si, chez la biche élaphe, les concentrations de prolactine dans le sang périphérique, montrent des variations annuelles marquées avec augmentation et diminution concomitantes des variations de la durée du jour (Asher et al 2000a, Garcia et al 2002) il n'en est pas de même chez la femelle sambar (Asher et al 1997). Étonnamment, en comparaison de ce qui peut être observé chez l'élaphe, ou d'autres espèces originaires des zones saisonnées ou non, les mesures de prolactine chez la femelle sambar sous des latitudes élevées ne présentent pas de variations annuelles marquées. Alors que ces variations annuelles sont fortes chez l'élaphe (2 ng/ml en hiver et 120-160 ng/ml en été), une augmentation discrète peut être observée chez le sambar (< 2 ng/ml en hiver et 10 ng/ml en été). Pourtant, la capacité de réponse à l'injection de TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) sur la libération de prolactine mesurée dans le sang périphérique semble similaire entre les deux espèces (Asher et al 1997). Ces données pourraient traduire des différences importantes de l'intégration du signal photopériodique pour cette espèce.

1.4 / Gestation

Il existe des variations relativement importantes de la durée de gestation au

sein de la famille des cervidés (tableau 2). La durée de gestation observée chez le chevreuil (de l'ordre de 300 jours) est un cas particulier puisqu'il s'agit d'une espèce présentant une implantation embryonnaire différée.

a) Développement embryonnaire

Après fécondation, l'embryon du cerf élaphe atteint le stade blastocyste éclos vers le 8^{ème} jour et semble rester sphérique au moins jusqu'au 11^{ème} jour (Peterson et al 1997, Demmers et al 2000). Au 14^{ème} jour les embryons sont toujours sphériques, localisés dans la corne ipsilatérale à l'ovulation et commencent leur expansion. Au 16^{ème} jour le trophoblaste s'étend en direction de la corne contra latérale, le disque embryonnaire devient proéminent. L'expansion du trophoblaste se poursuit formant un long filament de près de 30 cm vers le 21-22^{ème} jour. C'est à ce stade que l'accolement de l'embryon à la paroi semble intervenir. Le tube neural est alors déjà formé, restant ouvert à ses deux extrémités et des somites peuvent être visualisées. Le début de la placentation peut être observé avec la formation des caroncules puis de plaques trophoblastiques et enfin des cotylédons (41^{ème} jour) (McMahon et al 1997). La placentation des cervidés est de type synepitheliochoriale et oligocotylédonaire puis selon les espèces, le nombre moyen de cotylédons par placenta se situe entre 4 et 6 (8 chez l'élaphe), contrastant avec ce qui peut être observé chez les bovins, ovins ou caprins dont le nombre est supérieur à

10 (Benirschke non publié). Chez l'élaphe, le développement de l'embryon, apprécié par la croissance fœtale (gain de poids du fœtus, g/jour) au cours de la gestation est très inférieur à ce qui peut être observé chez la brebis (figure 4). Dans le cas de la brebis mettant bas 2 agneaux, la production fœtale en 145 jours est de près de 9 kg tandis que chez la biche, elle n'est que de 7,5 kg en 233 jours (Adam et al 1988). Le gain de poids atteint au maximum 86 g/jour en fin de gestation chez la biche contre 168, 217 ou même 250 g/jour chez la brebis selon le nombre de fœtus (2, 3, ou 4 respectivement) (Robinson et al 1977, Adam et al 1988). Il est à noter que chez la biche, le développement placentaire se poursuit tout au long de la gestation, atteignant 7 g/jour à l'approche de la parturition. Le sexe influence significativement le poids du fœtus et du placenta (Adam et al 1988). L'âge des reproductrices (figure 5) et leur distribution géographique (densité de population, richesse des pâtures...) influencent la fertilité mais également le poids des faons (Guinness et al 1978).

b) Modifications hormonales, corps jaune gestatif

Afin de permettre l'implantation de l'embryon (vers le 24^{ème} jour), il est nécessaire que les niveaux de progestérone demeurent élevés (hyperplasie de l'endomètre). Dans le cas de la gestation, les pulses synchrones de PGF2 α et d'ocytocine qui sont à l'origine de la régression fonctionnelle du corps jaune

Figure 5. Influence de l'âge des biches sur la fertilité et le poids de mise bas des faons (Guinness et al 1978).

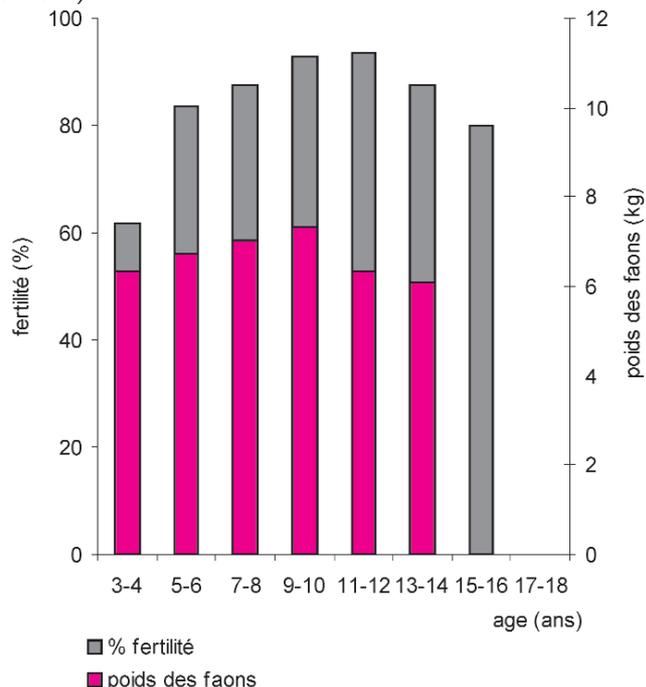
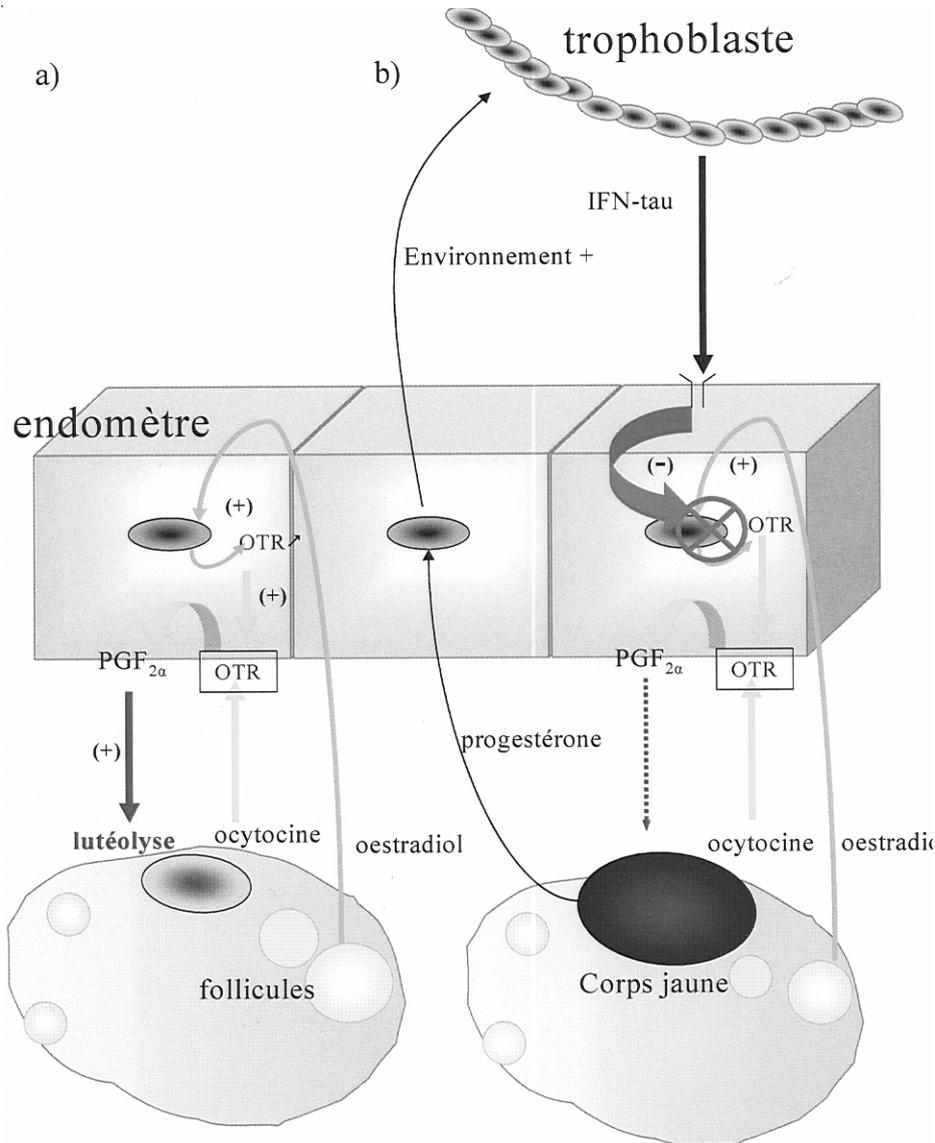


Figure 6. Représentation schématique illustrant la régulation hormonale de la lutéolyse par l'endomètre en absence a) ou présence b) de signal embryonnaire chez la biche élaphe. Chez la femelle du chevreuil, le corps jaune se maintient sans signal embryonnaire. PGF_{2α} : prostaglandine F 2 α ; IFN-tau : interféron tau ; OTR : récepteur à l'ocytocine.



(voir plus haut) ne sont pas observés en fin de cycle (Bainbridge et Jabbour, 1997). Des mécanismes antilutéolytiques permettant d'empêcher la libération de prostaglandines sont donc mis en place, en réponse aux signaux embryonnaires. Chez les ruminants, des sécrétions d'interféron sont produites par le trophoblaste de façon précoce et transitoire. Ces molécules possèdent des propriétés antilutéolytiques, antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices qui sont nécessaires au maintien de la gestation (Demmers *et al* 2001). Il semble qu'il en soit de même chez les cervidés puisque chez l'élaphe, l'injection d'interféron de type 1, permet la suppression des pulses de PGF_{2α} en fin de cycle (Bainbridge et Jabbour 1997, Bainbridge *et al* 1996).

Par ailleurs, la séquence codante du gène (obtenue à partir de blastocystes chez l'élaphe) a pu être identifiée. Cette dernière présente un fort pourcentage d'identité en comparaison des séquences bovines (85 %) ou ovines (Demmers *et al* 1999). L'activité antivirale est retrouvée chez les biches gestantes dès le 20^e jour dans l'environnement l'utérin et dans des cultures (24 h) d'embryons de 22 jours (Demmers *et al* 1999, Bainbridge et Jabbour 1999). Selon toute vraisemblance, son expression doit être relativement plus précoce et concomitante de l'allongement du blastocyste (14^e jour), comme le suggère les données de Flint et collaborateurs (Flint *et al* 1997). Comme pour les ovins ou les bovins, il semble en fait que l'IFN-tau agisse via des récepteurs

au niveau de l'endomètre entraînant la diminution de l'expression des récepteurs à l'ocytocine et par conséquent les sécrétions endométriales de PGF_{2α} (Demmers *et al* 2000, 2001). La lutéolyse est ainsi inhibée permettant le maintien des sécrétions de progestérone et l'implantation embryonnaire (figure 6).

Selon nos propres observations, les niveaux de progestérone sont plus ou moins constants pendant la gestation, variant de 3 à plus de 8 ng/ml selon les femelles élaphe (3 à 5 ng/ml selon Adam *et al* 1985). Les niveaux de progestérone ne diminuent que peu de temps avant la parturition (Kelly *et al* 1982, Adam *et al* 1985). Il est à noter que, selon les auteurs, des différences importantes de concentrations de progestérone peuvent être observées au sein d'une même espèce et pour les mêmes états physiologiques. A la lumière de l'étude menée chez le daim par Asher *et al* (1989b), il semble que ces différences puissent s'expliquer par les sécrétions de la glande corticosurrénale. En effet, l'injection d'un analogue d'ACTH (Adrenal Cortex Tropic Hormone) à des femelles impubères ou pubères, et ovariectomisées ou non, provoque l'augmentation de 4 à 10 fois de la concentration de progestérone périphérique. Il est donc probable que le stress et les sécrétions corticosurrénales associées soient un facteur important de variations de progestéronémie.

La contribution placentaire dans l'établissement de ces concentrations n'a pu être mise en évidence chez l'élaphe dans le premier tiers de la gestation. Il semble que les sécrétions lutéales de progestérone demeurent primordiales pour le maintien de la gestation au moins jusqu'au 75^e jour (Asher *et al* 1996a). En effet, l'ovariectomie ou la lutectomie réalisées au 30^e jour de gestation provoquent l'avortement dans les dix jours qui suivent. Quand elles sont réalisées au 75^e jour, l'avortement a également lieu mais peut être légèrement retardé (jusqu'à 25 jours plus tard). Une chute importante de progestéronémie est alors associée. L'injection d'un analogue de prostaglandine (500 µg cloprostenol) ne provoque pas systématiquement l'avortement, suggérant une inefficacité de cette molécule dans la lutéolyse complète du corps jaune durant cette période. Chez le cerf de Virginie, l'ovariectomie induit l'avortement quelque soit le stade de la gestation indiquant que la progestérone lutéale est également primordiale pour le maintien de la gesta-

tion chez cette espèce (Plotka *et al* 1982). Il n'en est pas de même chez le renne (Sjaastad *et al* 1990), ce qui suggère que des différences importantes dans les contributions lutéale, foeto-placentaire ou corticosurrénalienne de sécrétions de progestérone peuvent être observées entre les espèces.

Des variations de concentrations d'oestrogènes peuvent également être observées au cours de la gestation. Après synchronisation de l'oestrus, les niveaux d'oestradiol diminuent pour atteindre des valeurs de l'ordre de 5 à 10 pg/ml entre 160-190 jours de gestation (Kelly *et al* 1982). Il en est de même chez des femelles témoins (non gestantes, non cycliques). Il est probable que cette diminution reflète la baisse d'activité ovarienne, comme en témoignent les faibles concentrations de LH durant cette période. Par contre, dans le cas des femelles gestantes, une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'oestradiol (35 pg/ml) précède la parturition (Kelly *et al* 1982). Des observations similaires ont été reportées chez le cerf de Virginie (Harder et Woolf 1976, Plotka *et al* 1977b). Chez la brebis, les concentrations plasmatiques de sulfate d'oestrone augmentent à partir du 50^e jour de gestation pour atteindre un pic peu de temps avant la mise bas. Il semble en être de même chez les cervidés puisque chez le daim, les niveaux semblent augmenter de façon significative au 90^e jour de la gestation (Willard *et al* 1998). Chez le cerf d'Eld, les concentrations urinaires des conjugués d'oestrone varient également au cours de la gestation. Elles augmentent tout d'abord de façon précoce avec un pic entre la 29^e et la 19^e semaine qui précède le terme. Un second pic, plus important (40 fois les niveaux de base) peut être observé durant les 5 dernières semaines de la gestation (Monfort *et al* 1990). L'origine ovarienne ou foeto-placentaire de ces sécrétions n'a pas été déterminée chez les cervidés.

D'autres molécules sont exprimées précocement et spécifiquement dans le cas de la gestation. Chez la vache, la PAG-I (Pregnancy-Associated Glycoprotein) initialement dénommée PSPB (Pregnancy-Specific Protein B) ou encore PSP60 (Pregnancy Serum Protein of 60 kDa) est une glycoprotéine synthétisée par les cellules binucléées du trophoblaste. Plusieurs variants moléculaires des transcrits PAGs ont été identifiés chez les bovins ovins ou caprins. Il semble que l'expression de ces différentes formes varie

entre les cellules du placenta (trophectoderme / cellules binucléées) et dans le temps (Green *et al* 2000). La fonction précise des PAGs dont la structure est apparentée à la famille des protéinases à aspartate n'est pas connue (Xie *et al* 1997, Beckers *et al* 1999). Chez le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), 9 séquences de transcrits de PAG ont pu être identifiées dans le placenta (Vawter *et al* 2003, non publié). Si leur fonction n'est pas connue, l'immuno-réactivité de ces molécules peut être mesurée et permet le diagnostic précoce de gestation. Elle est détectée dès le 24^e jour chez la vache, et entre le 27^e et le 33^e jour chez les cervidés (Willard *et al* 1998). Le dosage des PAGs est un complément précieux au diagnostic de gestation par échographie et a pu être appliqué avec succès chez les cervidés comme le daim (Willard *et al* 1998, Willard *et al* 1999), le cerf sika (Willard *et al* 1996), ou encore le renne (Vahtiala *et al* 2004). Chez les cervidés, les niveaux périphériques décelés semblent toujours très inférieurs à ce qui peut être observé chez les caprins, ovins ou bovins. Bien que les PAGs possèdent une structure relativement conservée chez les mammifères, il est possible que l'immuno-réactivité des PAGs ou PSPB diffère quelque peu entre les espèces (Huang *et al* 1999) et que l'utilisation d'anticorps non spécifiques puisse fausser les niveaux détectés. De même, l'expression temporelle des molécules (expression précoce notamment) peut être différente d'une espèce à l'autre.

c) Un cas particulier, le chevreuil

Le chevreuil se distingue de la majorité des cervidés originaires des zones tempérées dans la mesure où la période du rut se situe en juillet et août. Durant cette période, la chevrette (femelle du chevreuil) ne présente qu'un cycle ovulatoire. L'ovulation est souvent multiple puisque le nombre moyen de corps jaunes par femelle s'élève à $2,13 \pm 0,13$ ($m \pm SEM$, $n = 15$ d'après Lambert *et al* 2001), permettant la mise bas très fréquente de 2 voire 3 faons par femelle (1,8 en moyenne). Cette espèce est par conséquent dite poly-ovulante mono-oestrienne. L'administration de mélatonine exogène sous forme d'implants sous cutanés (du mois d'avril au mois d'août) permet d'avancer le moment de l'ovulation de plus de 70 jours (45 jours après la pose de l'implant) et est associée à une diminution des niveaux de prolactine périphériques (Sempere *et al* 1995). Il semble que le début de la saison de reproduction ait lieu après que la femelle ait perçu la

diminution de la durée du jour. A l'inverse de ce qui peut être observé chez la brebis, la chevrette n'est pas totalement réfractaire aux jours longs (Sempere *et al* 1995). En effet, l'exposition à des jours longs depuis le solstice d'été n'empêche pas l'ovulation mais retarde son moment d'environ 46 jours (observé par mesure des concentrations de progestérone). Il est probable que le mécanisme d'entrée en saison sexuelle, dépendant de l'entraînement photopériodique, diffère sensiblement chez la chevrette en comparaison de ce qui peut être observé chez la biche élaphe ou la daine.

Le moment de l'ovulation et donc de la conception est nettement plus précoce chez le chevreuil en comparaison des autres espèces de cervidés originaires des zones tempérées. En revanche, l'existence d'un mécanisme de diapause embryonnaire chez le chevreuil a pour conséquence d'allonger la durée de gestation et de rétablir une période de mises bas proche de celle des autres espèces (mai). Chez les mammifères, la diapause embryonnaire se caractérise par un état de quiescence au stade blastocyste. La chevrette est la seule femelle chez les artiodactyles pour laquelle une implantation différée a pu être mise en évidence. Toutefois, chez la femelle père David, il est possible que des mécanismes d'implantation ou de développement différés existent car la durée de gestation de cette espèce est particulièrement longue (283 jours) en comparaison des autres cervidés (Brinklow et Loudon 1993).

Après fécondation, le développement embryonnaire cesse au stade blastocyste éclo une fois l'environnement utérin atteint. Il semble que le blastocyste n'ait aucune forme d'attachement avec la muqueuse utérine (Aitken 1974). Le blastocyste sphérique vit donc librement dans la lumière utérine durant une période d'environ 5 mois avant de reprendre son développement (élongation) puis de s'implanter. Durant la vie libre de l'embryon, le blastocyste est dans un état de quiescence durant lequel un taux faible de divisions cellulaires peut être observé, permettant une expansion très progressive. L'index mitotique est très faible sur les échantillons prélevés en décembre et semble augmenter progressivement jusqu'à la réactivation (0,14 à 1,67 % de cellules en divisions) (Aitken 1981). Lors de la réalisation de marquages de la réplication de l'ADN par incorporation de BrdU (Bromo deoxy Uridine) après incubation *in vitro*, une nette augmenta-

tion du pourcentage de cellules marquées peut être observée sur des embryons collectés d'octobre à janvier (Lengwinat et Meyer 1996). Ce marquage ne semble concerner que le trophodermes.

Les mécanismes de sortie de diapause chez le chevreuil sont peu connus. La coïncidence de la reprise du développement embryonnaire au moment où les jours commencent à s'allonger laissait supposer que la photopériode pouvait provoquer la réactivation. Cependant, la date de mise bas d'une femelle gestante soumise à un régime photopériodique modifié ne semble pas être modifiée (Lincoln et Guinness 1972). Le corps jaune reste pleinement actif et sécrète de la progestérone durant la diapause. Les sécrétions semblent augmenter au moment de l'élongation (Aitken 1974, Sempéré 1977). Il est à noter que chez les femelles non gestantes, le corps jaune reste également actif signe que son maintien semble indépendant d'un signal embryonnaire (Lambert *et al* 2001). Si l'administration de PGF2 α exogène provoque la lutéolyse (Sempéré *et al* 1992), l'effet de l'ocytocine sur les sécrétions utérines de PGF2 α n'a pu être démontré chez le chevreuil (Flint *et al* 1994). De même il semble que les sécrétions d'interféron par le trophoblaste soient inexistantes, et ce, quelque soit le stade du développement de l'embryon (Flint *et al* 1994). Chez les femelles gestantes, l'augmentation de progestérone semble en fait résulter de l'implantation embryonnaire plutôt que d'en être la cause, et l'origine lutéale ou placentaire des sécrétions responsables de cette augmentation n'a pu être déterminée. Néanmoins, l'augmentation des niveaux de progestérone périphérique décrite par Sempéré ou Aitken n'a pu être confirmée dans l'étude de Lambert et collaborateurs (2001). Les niveaux d'oestradiol ou de prolactine semblent demeurer constants durant la diapause et n'augmentent fortement qu'après l'élongation ou l'implantation (respectivement). Les niveaux d'oestradiol plasmatiques durant l'élongation sont près de 30 fois supérieurs à ceux observés durant la diapause (Lambert *et al* 2001). De même, les niveaux de PAG (Pregnancy-Associated Glycoproteins) ne sont décelables (avec des anticorps dirigés contre les PAG ovines) qu'après l'implantation. Il est possible que d'autres facteurs sécrétés par l'endomètre assurent la réactivation embryonnaire mais de récentes données suggèrent en fait un rôle propre de l'embryon. La synthèse *de novo* de protéines radio-

marquées (incorporation de leucine tritiée) est augmentée dans l'embryon en sortie de diapause et plus tard dans l'endomètre, au stade d'élongation (Lambert *et al* 2001). Il est donc possible que la réactivation de l'embryon précède et déclenche celle de l'endomètre. Quoiqu'il en soit les mécanismes d'entrée/sortie de diapause restent à déterminer chez le chevreuil et leur compréhension constitue un véritable enjeu en vue d'améliorer la conservation d'embryons chez les ongulés.

2 / Maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés

2.1 / Aspect mâle : collecte et caractéristiques de la semence

a) Semence éjaculée

Peu de travaux ont été effectués sur la semence éjaculée du fait du caractère sauvage des cervidés et de l'agressivité des mâles durant la période sexuelle. La collecte au vagin artificiel est cependant envisageable avec des mâles imprégnés, sélectionnés et entraînés (Krzywinski 1976, Gizejewski 2004). Les premiers travaux ont été réalisés chez le renne, espèce dont la domestication est plus aisée (Dott et Utsi 1971). Chez l'élaphe, Krzywinski a démontré qu'il était possible de collecter de la semence de qualité avec une telle approche. Le volume des éjaculats varie de 1,5 à 3 ml avec une motilité progressive des spermatozoïdes de 40-60 % (Krzywinski 1976). De même, la concentration en spermatozoïdes est hautement variable entre individus et entre répétitions (0,07 à 3,8 x 10⁹ spermatozoïdes / ml). D'après les récents travaux de Gizejewski et collaborateurs (séparation de fractions de l'éjaculat), il semble que cette grande variabilité soit imputable aux sécrétions des glandes annexes (Gizejewski *et al* 2003). Le volume total des sécrétions des glandes annexes, de l'éjaculat et sa concentration en spermatozoïdes varient significativement selon l'individu et la période de collecte (Gizejewski 2004). L'agressivité des mâles lors de la période du rut envers les manipulateurs est une cause d'échec. Pour collecter la semence des mâles refusant le vagin artificiel, il est possible d'utiliser des femelles en oestrus (qui peut être obtenu par synchronisation ou stimulation par l'oestradiol) et équipées de « vagins artificiels internes ». Cette technique est assez complexe à mettre en œuvre du

fait des manipulations répétées des animaux qu'elle nécessite (Jabbour et Asher 1991).

b) Semence électro-éjaculée

En raison de la somme de travail nécessaire à la collecte de semence éjaculée et de la nécessité de disposer d'animaux imprégnés ou apprivoisés, l'électro-éjaculation peut représenter une technique alternative chez les cervidés sauvages (Bierschwal *et al* 1970, Jaczewski et Jasiorski 1974). Il convient d'anesthésier les mâles afin d'éviter les souffrances, les risques d'accident et le stress pendant l'intervention, bien que l'utilisation d'anesthésiques représente elle-même un risque pour l'animal et qu'elle puisse éventuellement interférer avec le protocole d'électro-éjaculation. Il semble que les mélanges de kétamine-xylazine ou encore de zoletil®-xylazine soient les plus adaptés (Janovsky *et al* 2000). Pour notre part, nous avons retenu le mélange de zoletil® (1 mg/kg, tiletamine-zolazepam 1 : 1) et de xylazine (1,5 mg/kg). L'effet de la xylazine peut être bloqué rapidement par l'administration intramusculaire de tolazoline (3 mg/kg) afin de faciliter le réveil de l'individu. Le protocole d'électro-éjaculation (voltage, intervalles et nombre de stimulations) semble important pour l'obtention d'une semence de bonne qualité (Cameron 1977). De plus, et à l'instar des observations faites chez les hippotraginés, les sondes doivent être adaptées aux caractéristiques anatomiques des différentes espèces (Cassinello *et al* 1998). S'il est traditionnellement admis que l'électro-éjaculation sur-stimule les glandes annexes et entraîne de ce fait des modifications de la composition de l'éjaculat, pouvant être néfastes pour la survie des spermatozoïdes, les premières observations faites sur la semence électro-éjaculée de cervidés (cerf de Virginie) montrent des caractéristiques similaires à la semence ovine avec un volume moyen de 0,5 à 1,5 ml pour un nombre total de spermatozoïdes allant jusqu'à 4,7 milliards/éjaculat (Bierschwal *et al* 1970). Selon nos propres observations chez le cerf sika, il existe une grande variabilité entre les mâles et d'une séance à une autre pour le même individu. Par ailleurs, il n'est pas rare de voir les échantillons souillés par de l'urine. En saison sexuelle, le volume de l'éjaculat et sa concentration en spermatozoïdes varient respectivement entre 0,5 et 1,1 ml et 0,5 à 5 x 10⁹ spermatozoïdes/ml (tableau 3). En dépit de la grande variabilité de la qualité de la semence obtenue, cette technique permet de

Tableau 3. Caractéristiques de la semence électro-éjaculée en saison sexuelle lors de collectes successives de trois mâles de cerf sika du Japon (*Cervus nippon nippon*).

N° animal	Date de collecte	Volume de l'éjaculat (ml)	Couleur	Concentration (x 10 ⁶ spz / ml)	Spermatozoïdes motiles (%)
2888	18/10/02	0,8	Blanc crème	470	40
	21/10/02	0,8	Blanc crème	2500	60
	23/10/02	0,4	Blanc crème	1200	60
	12/11/02	0,4	Jaunâtre (Souillé)	470	40
	14/11/02	0,5	Blanc crème	1900	40
4197	18/10/02	1	Blanc crème	640	40
	21/10/02	Echec	-	-	-
	23/10/02	0,7	Blanc crème	625	80
	12/11/02	0,35	Jaunâtre (Souillé)	750	50
	14/11/02	1,1	Jaunâtre (Souillé)	1400	50
4284	18/10/02	0,5	Blanc crème	840	40
	21/10/02	0,8	Blanc crème	540	60
	23/10/02	0,6	Blanc crème	5400	70
	12/11/02	Echec	-	-	-
	14/11/02	Echec	-	-	-

procéder à la congélation d'une proportion importante des éjaculats. Les semences du cerf élaphe, du cerf d'Eld (*Cervus eldi thamin*) ou du daim présentent des caractéristiques similaires : volume de 1 à 2 ml, concentration de 2 à 5 x 10⁹ spz/ml, jusqu'à 80 % de spermatozoïdes motiles (élaphe : Asher *et al* 1987, Asher *et al* 1988, cerf d'Eld : Monfort *et al* 1993a, Monfort *et al* 1993b, Harnal *et al* 2001, Asher *et al* 1993, Asher *et al* 1996, Asher *et al* 2000). La technique d'électro-éjaculation semble particulièrement efficace chez le daim puisque le taux de succès de collecte de semence est proche de 100 % (Gosch et Fischer 1989, Asher *et al* 1993, Asher *et al* 1996).

c) Semence épидидymaire

La semence est obtenue par cannulation du canal déférent et rétroperfusion de la région caudale de l'épididyme. La technique a été employée post-mortem sur des animaux de chasse ou dans un but conservatoire par exemple lorsqu'un individu de haut intérêt génétique vient à mourir. Le sperme épидидymaire présente une forte concentration en spermatozoïdes dont le pouvoir fécondant est comparable à celui du sperme éjaculé. Le fluide épидидymaire assure une fonction de protection/préservation de la motilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes qui rend cette semence particulièrement intéressante en vue de la cryopréservation.

En saison sexuelle, cette technique appliquée à l'élaphe sur des animaux de chasse (octobre à novembre) entre 2 et

24 h post-mortem nous a permis de collecter des échantillons de semence contenant $7,9 \times 10^9 \pm 0,68 \times 10^9$ spermatozoïdes/ml dont $61,1 \pm 11$ % sont motiles (n = 9) (Locatelli, non publié). Ces données confirment les observations faites par Krzywinski (1981). Concernant la motilité, une grande variabilité entre individus matures est observée et il semble que ce soit la semence des individus de plus de trois ans qui présente la plus importante proportion de spermatozoïdes motiles (Garde *et al* 1998, Zomborszky *et al* 1999). Cette semence peut être conservée plusieurs heures à 4° C comme à température ambiante dans l'épididyme ou après perfusion sans trop nuire à sa qualité (élaphe : Garde *et al* 1998, Guérin *et al* 2003, sika : Hishinuma *et al* 2003). Il est donc possible, post mortem, de procéder à la cryopréservation des gamètes. Ainsi, un mâle de haut intérêt génétique peut avoir des descendants, longtemps après sa mort en recourant à l'IA ou à la FIV (Blash *et al* 2000, Guérin *et al* 2003). Cette technique est désormais utilisée dans un but conservatoire à la réserve animalière de la Haute Touche dès qu'un animal précieux vient à mourir (par exemple Cerf d'Eld, Muntjac...). La semence épидидymaire collectée post-mortem et utilisée en FIV s'est révélée comparable à la semence électro-éjaculée en terme de fécondance (Comizzoli *et al* 2001, Soler *et al* 2003). Peu de données concernent les autres espèces.

d) Méthode de cryoconservation

La cryoconservation de semence, si elle est effectuée lors de la saison

sexuelle, permet de disposer à tout moment de l'année, de gamètes fécondants. Une revue très complète, proposée par Asher, résume les techniques de cryoconservation de la semence développées pour les différentes espèces de cervidés (Asher *et al* 2000). Ces méthodes dérivent directement de celles mises au point pour la semence de bœuf ou de bouc. Les dilueurs les plus fréquemment utilisés sont ceux à base de jaune d'œuf (Tris/citrate/fructose ou lactose/lait/glycérol) avec comme agent cryoprotecteur le glycérol dans une proportion de 4 à 8 %. Pour la semence obtenue par électro-éjaculation chez l'élaphe, le taux de survie à la congélation est extrêmement variable d'un individu à l'autre et ce, quelques soient les méthodes, « dilueurs » ou agents cryoprotecteurs employés. La motilité au dégel est comprise entre 30 et 70 % de celle observée avant la congélation (Fennessy *et al* 1990). Selon nos propres observations, la semence épидидymaire collectée chez l'élaphe et cryoconservée selon une méthode ovine modifiée présente des caractéristiques similaires puisque la motilité au dégel représente 50 % de celle observée avant la congélation ($49,4 \pm 17,4$ % ; m ± sem, n = 7). En revanche, la semence du daim semble plus résistante aux rigueurs de la congélation puisque le taux de survie atteint ou dépasse souvent les 70 % (Asher *et al* 1990, Asher *et al* 2000).

2.2 / Aspect femelle

Les programmes de types MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) sont un outil de choix dans le

but d'augmenter la prolificité de femelles de haut intérêt génétique. Le MOET associe les techniques de synchronisation de l'oestrus, de stimulation de la croissance folliculaire, d'insémination artificielle (IA) et de transfert embryonnaire.

a) Détection de l'oestrus

D'une manière générale, il est très difficile de mener des observations du comportement d'oestrus chez les cervidés. Comme nous l'avons évoqué, chez la biche élaphe, le comportement d'oestrus est essentiellement caractérisé par les réponses de la femelle aux sollicitations du mâle. Bien qu'en début d'oestrus, il soit possible d'observer des écoulements vaginaux de mucus clair, ils ne constituent pas une méthode de détection de ce comportement (Guinness *et al* 1971). Les méthodes de détection d'oestrus reposent donc essentiellement sur l'utilisation de mâles vasectomisés et équipés de harnais « marqueurs » (élaphe : Guinness *et al* 1971, daim : Asher 1985). Il est également possible d'utiliser des détecteurs électroniques de pression indiquant la monte des mâles (HeatWatch™). L'efficacité semble très inférieure à celle du harnais marqueur lorsque le mâle utilisé est jeune. En revanche, la méthode électronique s'avère efficace lorsque le mâle utilisé est adulte (Bowers *et al* 2004). Il semble évident que les méthodes de détection de l'oestrus reposant sur l'activité de monte du mâle soient dépendantes de la saison (libido du mâle), de l'âge et du statut social du mâle. De même, il est possible que ces facteurs puissent influencer en retour la venue en oestrus des femelles. En effet, chez le cerf d'Eld (*Cervus eldi thamin*), la présence de mâles (avec ou sans contact) semble avancer significativement le moment d'oestrus (détecté par lordose en réponse à la pression) et du pic de LH (Hosack *et al* 1999).

b) Synchronisation de l'oestrus et de l'ovulation

Les méthodes de synchronisation du moment d'oestrus et de l'ovulation sont un pré requis pour conduire avec succès les protocoles de reproduction assistée (collecte d'ovocytes, moment d'insémination artificielle, collecte ou transfert embryonnaire...). Une fois encore, ces méthodes dérivent directement des techniques mises au point pour les mammifères domestiques et reposent sur l'administration de progestagènes exogènes sur une période de 12-14 jours à des niveaux comparables à ce

qui peut être observé en milieu de cycle. Ils exercent un effet inhibiteur sur les sécrétions de GnRH et par conséquent sur les sécrétions de gonadotrophines (Karsch *et al* 1977). Pour administrer ces progestagènes sur une durée de 12-14 jours, plusieurs dispositifs peuvent être utilisés comme les éponges vaginales d'acétate de fluorogestone, les CIDR (Controlled Internal Drug Release) ou encore les implants sous-cutanés. Les traitements progestagènes peuvent être associés à l'administration d'analogues de prostaglandines afin de provoquer la lutéolyse d'un éventuel corps jaune. A la suite du retrait de l'implant, une chute rapide des niveaux de progestagènes peut être observée et, en absence de corps jaune fonctionnel, il s'ensuit une levée d'inhibition et une augmentation des niveaux de gonadotrophines. Le retrait du traitement a pour conséquence la reprise de la croissance folliculaire et l'augmentation de l'oestradiol, qui en retour déclenche le pic pré ovulatoire de LH. Si l'administration d'une forte dose de benzoate d'oestradiol suffit à déclencher le comportement d'oestrus chez la brebis ovariectomisée (Robinson 1954, Moore et Robinson 1957), l'exposition préalable à la progestérone permet de diminuer le seuil de sensibilité à l'oestradiol (Karsch *et al* 1980). Cette exposition à la progestérone est essentielle à l'expression du pic préovulatoire de GnRH en réponse à l'oestradiol sans pour autant modifier le pic de LH (Caraty et Skinner 1999). Il est à noter que chez la daine ovariectomisée, la présence préalable de progestérone (6 ou 12 jours) est indispensable à l'expression de l'oestrus en réponse à l'oestradiol (Jabbour *et al* 1992). Un effet saisonnier a pu être observé sur l'incidence de l'oestrus en réponse à l'oestradiol, puisqu'en plein anoestrus, la plupart des femelles deviennent réfractaires au traitement, que ce soit chez l'élaphe ou la daine (Jabbour *et al* 1992, Meikle et Fisher 1990).

Chez la daine, l'utilisation de CIDR pour une durée de 13 jours permet de synchroniser l'oestrus chez 80-90 % des femelles environ 34 h (sem 2,5 h) après le retrait de l'implant (Asher *et al* 1990, Jabbour *et al* 1993). L'intervalle entre l'oestrus et le début du pic de LH est très faible et l'ovulation a lieu dans les 36 heures qui suivent l'oestrus. Chez l'élaphe, l'oestrus survient environ 44 h après le retrait du CIDR et précède le pic de LH d'une à deux heures et l'ovulation d'environ 24 h (Asher *et al* 1992). Cependant, de nombreux fac-

teurs peuvent nuire à l'efficacité de ces traitements tels que la période de la saison sexuelle ou le stress associé aux manipulations (Asher *et al* 1993). L'administration de faibles doses d'eCG (equine Chorionic Gonadotrophin) peu de temps avant ou au moment du retrait du traitement progestagène a été proposée pour réduire ce risque d'échec. En effet, il a été montré que l'administration d'eCG permet d'augmenter le nombre de follicules oestrogéniques ainsi que les niveaux d'oestradiol dans le fluide folliculaire (McLeod *et al* 2001b). Chez la biche élaphe, l'administration de 200-250 UI d'eCG augmente l'efficacité du traitement (taux de femelles exprimant oestrus et ovulation) et avance le moment de l'oestrus (tableau 4). En revanche, la variance du moment d'oestrus ou d'ovulation n'est pas diminuée et la fréquence des ovulations multiples semblent augmentées (Asher *et al* 1992). De même, l'eCG ne semble pas permettre de s'affranchir des effets de la composante saisonnière. En effet, en milieu de période d'anoestrus, si son utilisation permet l'expression du comportement d'oestrus associé à un pic de LH, l'ovulation n'est pas systématique (McLeod *et al* 2001b). Si l'eCG est administrée en routine chez la biche élaphe pour les programmes d'insémination Néo Zélandais notamment pour avancer d'une quinzaine de jours le premier oestrus saisonnier, son utilisation est déconseillée chez la daine. En effet, en comparaison de l'élaphe, il semble que la daine présente une sensibilité augmentée à cette gonadotrophine, entraînant une réponse ovarienne inadaptée dans deux nombreux cas (ovulations multiples ou follicules anovulatoires). Si la réduction de la dose administrée au retrait du traitement progestagène (50 UI) permet de réduire la variance du moment d'oestrus, elle est, contre toute attente, associée à une diminution de fertilité après IA (Jabbour *et al* 1993).

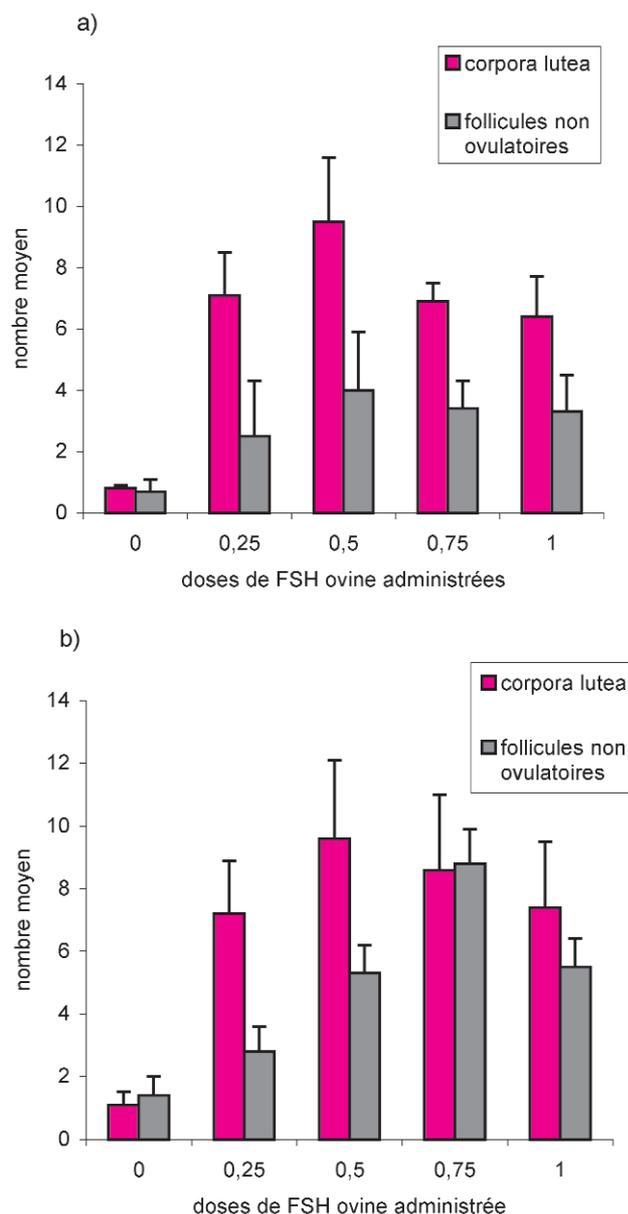
c) Ovulations multiples

Les traitements de stimulation reposent essentiellement sur l'administration en fin de traitement progestagène, de gonadotrophines exogènes telles que l'eCG ou la FSH ovine seules ou en association. Ces traitements avancent significativement le moment d'oestrus et d'ovulation (tableau 4). Une forte dose d'eCG (1000-1200 UI) peut être utilisée à des fins superovulatoires chez de nombreuses espèces de cervidés. Cependant, dans au moins 10 % des cas (chez l'élaphe), cette hormone semble provoquer une régression lutéale pré-

Tableau 4. Effets de différents traitements de stimulation sur les moments moyens d'oestrus, du pic de LH et d'ovulation chez la biche élaphe exprimés par rapport au retrait du CIDR (h \pm sem).

Traitements	N	Femelles exprimant oestrus et ovulation	Corps jaunes	Oestrus	Pic de LH*	Ovulation	Références
CIDR	12	7/12	0,6 \pm 0,1	44,6 \pm 1	45,1 \pm 1,3	69,3 \pm 1,2	Asher <i>et al</i> 1992
	7	6/7	1 \pm 0,2	43,6 \pm 2,6	ND	71,3 \pm 5,8	Jabbour <i>et al</i> 1994
CIDR eCG 200 UI	8	7/8	1 \pm 0,2	37,4 \pm 2	38,3 \pm 2,3	58 \pm 2,4	Asher <i>et al</i> 1992
CIDR eCG 1200 UI	7	6/7	8,4 \pm 2,7	16,6 \pm 2,7	ND	31 \pm 5,7	Jabbour <i>et al</i> 1994
CIDR eCG 200 UI FSH 0.5 UI	8	8/8	8,3 \pm 1,5	16,3 \pm 1,7	14 \pm 0,9	36,3 \pm 3,1	Asher <i>et al</i> 1992

maturée des corps jaunes (Jabbour *et al* 1994). Il est probable que ce phénomène soit associé à l'augmentation des niveaux d'oestradiol, qui potentialise la sécrétion de prostaglandines induite par l'ocytocine et provoque la lutéolyse (Bainbridge *et al* 1998, Bainbridge *et al* 1996, Bainbridge *et al* 1996). De même, il n'est pas rare d'observer des follicules non ovulatoires, kystiques ou lutéinisés (Thompson et Asher 1988). Lors de la réalisation de programmes d'insémination et de collecte d'embryons, il est possible que ce phénomène puisse altérer le transport des gamètes et des embryons et expliquer les faibles niveaux de fécondation et de collecte des embryons généralement observés (Argo *et al* 1994, Jabbour *et al* 1994, Asher *et al* 1995). Les traitements utilisant la FSH ovine très purifiée (peu d'activité LH) ont également été développés chez les cervidés (Fennessy *et al* 1994). Compte tenu de la très courte demi-vie de cette hormone, il convient d'effectuer plusieurs administrations en fin de traitement progestagène. Chez l'élaphe, les injections intramusculaires sont généralement effectuées toutes les 12 heures et sur une période de 4 jours (Fennessy *et al* 1989). Afin de réduire les manipulations des femelles, il a été envisagé d'administrer la FSH *via* des mini pompes osmotiques. D'après les résultats de la seule étude comparative (portant sur peu d'animaux), il semble que la méthode d'administration par injections intra musculaire soit la plus adaptée (Fennessy *et al* 1989). Pour éviter les réponses de type « tout ou rien », il est fréquent d'administrer une faible dose d'eCG (200 UI) en début de traitement FSH (Asher *et al* 1995). La dose optimale de FSH ovine chez la daine et l'élaphe est de 0,5 UI, permettant d'obtenir plus de 9 ovulations en moyenne (figure 7). Cependant, après IA et collecte des embryons par laparotomie, les

Figure 7. Réponses ovariennes (nombre de corps jaunes et de follicules anovulatoires) après synchronisation et administration d'eCG (200 UI) et de différentes doses de FSH ovine (0, 0,25, 0,5, 0,75 et 1 UI) chez a) la biche élaphe et b) la daine (Asher *et al* 1995).

taux de fécondation et de collecte des embryons sont là encore, souvent décevants (Asher *et al* 1995). De même, la réponse ovarienne peut être très variable selon le génotype, y compris entre sous-espèces proches. La comparaison de la réponse ovulatoire des traitements de stimulation FSH répétés est près de 3 fois inférieure chez l'élaphe (*Cervus elaphus scoticus*) que chez l'hybride wapiti/élaphe (Asher *et al* 2000b). Outre le génotype, il est intéressant de noter que la saison sexuelle influence significativement la capacité de réponse ovarienne à la FSH (0,4 UI). La réponse ovulatoire au moment du solstice d'été devient nulle chez l'élaphe et les hybrides père David (1/4) et quasi nulle chez les hybrides wapiti (Asher *et al* 2000b).

3 / Production *in vitro* (PIV) d'embryons

Les systèmes de production *in vitro* (PIV) d'embryons développés pour les cervidés (du genre *Cervus* uniquement) dérivent directement des systèmes mis au point ces deux dernières décennies chez les bovins (Berg *et al* 1995, Comizzoli *et al* 2001). La technique de PIV permet de s'affranchir de la composante animale et semble de ce fait être une réponse aux difficultés rencontrées avec les techniques de MOET (voir ci-dessus). Des trois étapes clés de la production *in vitro* d'embryons, deux semblent aujourd'hui bien maîtrisées, à savoir la maturation des ovocytes et leur fécondation *in vitro* (MIV et FIV). L'ultime étape est celle du développement embryonnaire *in vitro* (DIV).

3.1 / Collecte d'ovocytes et Maturation *in vitro* (MIV)

In vivo, l'ovocyte (bloqué au stade de vésicule germinale ou prophase de première division méiotique) va progressivement acquérir sa compétence au développement au cours de la croissance folliculaire et suite à la décharge ovulante. Il subit une maturation cytoplasmique et nucléaire qui se traduisent par de nombreuses évolutions biochimiques et morphologiques incluant notamment la migration des granules corticaux et la reprise de la méiose jusqu'au stade de métaphase de deuxième division méiotique (MII). Chez la vache, il est possible de ponctionner des ovocytes matures dont la compétence au développement est élevée en ponctionnant des follicules préovulatoires 20-24 h après le pic de LH (Dieleman *et al* 2002). Cette technique

suppose une bonne maîtrise de la synchronisation du pic de LH et, par conséquent, ne semble pas applicable aux cervidés. Chez la biche élaphe (n = 14) après synchronisation et stimulation hormonale (1000 UI eCG) et 24 h après le retrait du traitement progestagène, il a été possible de ponctionner par voie laparoscopique 2,44 follicules préovulatoires par animal (95 follicules en 39 sessions) et de collecter 27 complexes cumulus-ovocytes (0,69 par animal et par session) non dégénérés (Bainbridge *et al* 1999). Il semble donc difficile par cette technique de collecter un nombre important d'ovocytes matures de bonne qualité. Par conséquent, il a été envisagé de ponctionner des follicules contenant des ovocytes immatures et de procéder à leur maturation *in vitro* (MIV). Cette technique ne concerne que les ovocytes issus de follicules de plus de 2 mm de diamètre puisqu'ils semblent seuls capables d'accomplir leur méiose *in vitro*. Chez la biche élaphe, le recrutement folliculaire concerne les follicules de 2 à 3 mm de diamètre et il est possible en saison sexuelle, suite à une stimulation hormonale (FSH ovine 0,4 ui) d'observer près de 10 follicules de plus de 3 mm par animal au moment du retrait du CIDR (Asher *et al* 1997). La ponction de follicules chez des animaux non stimulés peut également être envisagée offrant ainsi la possibilité de travailler à partir d'ovaires obtenus après abattage d'animaux de chasse ou d'élevage. En saison sexuelle, il est possible de collecter chez l'élaphe (ovaires d'abattoir) une moyenne de 3,4 ovocytes de bonne qualité (plus de trois rangées de cellules de cumulus et cytoplasme homogène) par ovaire tandis que chez la biche sika, la pratique de l'ovum pick-up par voie laparoscopique permet de collecter 1,5 ovocytes de bonne qualité par biche et par session (Comizzoli *et al* 2001).

L'intégrité des complexes cumulus-ovocytes lors de la MIV apparaît indispensable à l'acquisition d'une compétence au développement élevée. Chez la vache, lorsque l'on mature *in vitro* des ovocytes triés selon l'intégrité de leur cumulus, les taux de clivage et de développement ultérieurs sont affectés par le tri (Khurana et Niemann 2000). *In vitro*, il est probable que les couches cellulaires du cumulus outre leur fonction de protection contre le stress oxydatif, assurent le transport de métabolites et le relais de signaux extérieurs, tels que le signal ovulatoire de LH, jusqu'à l'ovocyte (Park *et al* 2004). Les cellules du cumulus oopho-

rus sont en contact étroit avec l'ovocyte *via* des prolongements cellulaires au travers de la zone pellucide et l'établissement de jonctions communicantes. Ces jonctions autorisent les échanges métaboliques et permettent au cumulus de jouer un rôle complexe dans le blocage/reprise de la maturation nucléaire (Luciano *et al* 2004). Il est donc important de préserver la viabilité des ces cellules et leur lien avec l'ovocyte lors de la ponction.

Les milieux de MIV les plus fréquemment utilisés chez les mammifères domestiques se composent d'un milieu de culture (TCM-199) supplémenté en gonadotrophines (FSH et LH), en oestradiol et en sérum de veau fœtal (10 %), selon les espèces et les auteurs. Chez les ovins et caprins, en plus de la FSH, le fluide folliculaire (collecté en ponctionnant des follicules de grande taille, non atrétiques) peut être ajouté comme source d'oestrogènes, de facteurs de croissance ou d'antioxydants et la stimulation hormonale préalable au prélèvement du fluide folliculaire par la eCG renforce la compétence au développement des ovocytes ainsi maturés (Cognie *et al* 1995, Guler *et al* 2000). L'utilisation de l'EGF (Epidermal Growth Factor) est également courante chez les petits ruminants. Chez la biche, les travaux concernant la maturation *in vitro* de l'ovocyte se sont jusqu'à présent limités à l'observation de la maturation nucléaire. Elle peut être estimée soit par l'émission du globe polaire soit par fixation et coloration de l'ovocyte afin de visualiser l'état de son noyau (orcéine, Hoeschst 33342). Chez les biches sika et élaphe, Comizzoli et collaborateurs ont observé que le pourcentage d'ovocytes au stade MII après 24 h de MIV dans le milieu TCM-199 enrichi en FSH ovine (50 ng/ml) et en fluide folliculaire (10 %) atteint respectivement 76 et 78 %. De même, 75 % des ovocytes atteignent le stade MII après 27 heures dans le milieu TCM-199 supplémenté en FSH, LH, oestradiol 17 β et en sérum de veau fœtal (SVF) (Berg *et al* 2002b). Alors que l'EGF est couramment utilisé avec succès chez les mammifères domestiques, son utilisation chez les cervidés (10 ng/ml) réduit dramatiquement le taux de maturation nucléaire à 24 h puisqu'il n'atteint que 14 % chez le sika et 25 % chez l'élaphe (Comizzoli *et al* 2001).

Ces différences de réactivité entre ovocytes de différentes espèces soulignent la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes généraux

de contrôle du cycle cellulaire de l'ovocyte et l'adaptation des techniques à chaque nouvelle espèce prise en compte dans les programmes de sauvegarde.

3.2 / Fécondation *in vitro* (FIV)

La fécondation *in vitro* (FIV) consiste à effectuer une co-incubation des gamètes mâles et femelles matures. *In vivo*, au travers de la migration dans le tractus génital femelle le spermatozoïde va progressivement acquérir son pouvoir fécondant (Bavister 2002). Ce phénomène appelé capacitation doit être reproduit *in vitro* pour permettre la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. Lors de fécondations *in vitro*, l'étape dite de capacitation est généralement réalisée en amont de la co-incubation des gamètes. De nombreux agents dits capacitants (comme le sérum notamment) ajoutés à des milieux de culture propices à la fois à la survie des spermatozoïdes et des ovocytes peuvent être utilisés.

Berg et collaborateurs ont dans un premier temps montré qu'il était possible de féconder des ovocytes avec de la semence congelée capacitée dans un milieu de type SOF (Synthetic Oviduct Fluid) supplémenté de sérum de brebis en en chaleur (Sheep Serum, SS) à hauteur de 20 % (v:v). Les embryons obtenus se sont révélés viables puisque après transfert dans l'oviducte de receveuses synchronisées, 5 des 15 biches transférées étaient gestantes (Berg *et al* 1995). La fécondation dans le milieu TALP (Tyrode Albumine Lactate Pyruvate) utilisé classiquement en FIV bovine est également envisageable chez les cervidés. Cependant, la motilité du sperme de cerf élaphe dégelé (lavé par centrifugation) dans le milieu TALP décroît fortement au cours du temps puisqu'elle n'est plus que de 10 % au bout de 4 h d'incubation et nulle au bout de 8 h (Berg *et al* 2002c). Il est intéressant de noter que cette semence, après capacitation en présence d'héparine, s'est révélée peu fécondante dans le milieu TALP (7,2 % d'ovocytes fécondés). Dans l'étude menée par Comizzoli et collaborateurs (2001), une chute moins drastique de la motilité a pu être observée avec de la semence de cerf élaphe ou sika préalablement sélectionnée sur gradient de Percoll et incubée dans le TALP avec ou sans sérum de brebis. Les niveaux de fécondation avec ces semences utilisées en FIV (milieu TALP + SS) se sont révélés relativement importants (45-50 %). Les niveaux de fécondation dans le milieu SOF en présence de BSA et d'héparine se sont révélés décevants en comparai-

son de l'utilisation du sérum de brebis en chaleur qui permet d'obtenir le taux de fécondation maximum (Berg *et al* 2002a).

À l'instar de ce qui peut être observé chez les mammifères domestiques, il est probable qu'une importante variabilité de la fécondance *in vitro* puisse exister entre les mâles, voire entre éjaculats d'un même mâle. Nos propres observations, réalisées sur 6 échantillons de semence épидidymaire de cerf élaphe montrent que les niveaux de fécondations obtenus en FIV hétérologue (ovocytes caprins) varient de 5 à 60 % entre individus (Locatelli, non publié). Aussi, il est souvent préférable d'utiliser les semences de plusieurs mâles dans un même puits de fécondation lorsque la filiation des futurs produits n'est pas déterminante.

3.3 / Développement *in vitro* (DIV)

Chez les mammifères domestiques, le milieu de DIV le plus utilisé est le milieu de type SOF supplémenté en acides aminés et en sérum de veau fœtal. La composition minérale de ce milieu se veut la plus proche possible de ce qui peut être observé *in vivo* dans l'environnement tubaire bovin. Placés en culture pendant 7 à 8 jours dans ce milieu supplémenté de sérum, 30 à 50 % des embryons bovins, caprins ou ovins produits *in vitro* atteignent le stade blastocyste. Les premières données concernant l'embryon de cerf élaphe portent sur l'embryon produit *in vivo* au stade 1-2 cellules et cultivé dans différents systèmes de culture : culture dans l'oviducte ligaturé de brebis ; co-culture de cellules épithéliales dans le TCM 199 supplémenté en sérum de biche ; milieu SOF supplémenté en sérum humain.

Les taux de développement au stade blastocyste se sont révélés relativement faibles pour des embryons produits *in vivo* (22-26 % des œufs collectés) mais identiques dans les 3 systèmes de culture suggérant que le milieu SOF pouvait être utilisé pour la culture d'embryons de cervidés (Berg *et al* 1995, Berg *et al* 1995). Les études ultérieures menées sur l'embryon de cerf produit *in vitro* se sont jusqu'à présent conclues par un taux de développement inférieur à 10 %. La plupart des embryons restent bloqués au stade 8 cellules que ce soit chez l'élaphe (Fukui *et al* 1991, Bainbridge *et al* 1999, Berg *et al* 2002a) ou chez le sika, espèce pour laquelle la blastulation après produc-

tion *in vitro* n'a jamais été observée (Comizzoli *et al* 2001). Selon l'hypothèse émise par Berg et collaborateurs, l'embryon de cerf doit présenter des besoins spécifiques en comparaison de ce qui peut être observé chez les mammifères domestiques et ces besoins spécifiques pourraient être plus déterminants lorsqu'il est produit *in vitro*.

En se basant sur la composition du fluide de l'oviducte de biches élaphe, Berg et collaborateurs ont développé un milieu de type SOF optimisé pour répondre aux besoins spécifiques des embryons de cervidés et dénommé DSOF (Deer-Synthetic Oviduct Fluid). Les principales modifications apportées concernent les concentrations de calcium (augmentée), de phosphates inorganiques et de glucose (diminuées) et ont conduit à l'élaboration d'un milieu biphasique comprenant une étape de culture précoce et une étape tardive. L'utilisation de ces milieux en FIV puis en culture permet d'augmenter significativement le taux de clivage et la compétence au développement des embryons produits (Berg et Asher 2003). Il est à noter que le sérum de veau fœtal n'est pas ajouté durant la culture. Cependant, les niveaux de développement obtenus dans ces conditions à partir d'ovocytes d'élaphe collectés sur ovaires d'abattoirs restent dramatiquement faibles (12 % des clivés). Des résultats similaires ont pu être observés à partir d'ovocytes collectés par OPU (voie transvaginale) avec ou sans stimulation hormonale préalable (GnRH ou FSH) chez l'élaphe ou le wapiti (Berg et Asher 2003). De plus, il semble que la compétence au développement des ovocytes collectés soit sous la dépendance d'un fort effet saisonnier puisque avec l'avancée de la saison de reproduction, le taux de développement chute dramatiquement et finit par devenir nul.

Les travaux de recherche menés au laboratoire à partir d'ovocytes collectés chez l'élaphe et le cerf sika du Japon ont permis de montrer que l'utilisation d'un tapis de cellules d'oviducte ovin dans le milieu SOF permettait la blastulation d'une forte proportion d'embryons. Pour ces deux espèces près de 30-40 % des embryons produits *in vitro* et placés en co-culture atteignent le stade blastocyste 8 jours après fécondation. Il semble donc que, placés dans des conditions appropriées, les embryons de cerf produits *in vitro* soient capables de se développer. La compréhension de l'effet bénéfique de la présence de cellules tubaires devrait per-

mettre de définir de nouveaux milieux de culture adaptés aux besoins spécifiques de l'embryon de cerf.

Conclusion

Les connaissances de la fonction de reproduction des cervidés se sont considérablement améliorées au cours des dernières années et plus particulièrement chez le daim et le cerf élaphe. Bien que semblable en de nombreux points à celle des ruminants domestiques, la physiologie de la reproduction des cervidés montre de nombreuses particularités. Les variations saisonnières d'activité chez les espèces originaires de zones tempérées sont nette-

ment plus marquées que chez les espèces domestiques et apparaissent plus difficilement maîtrisables. Les études menées au travers de la diversité de la famille des cervidés, montrent que de nombreuses exceptions sont observées, traduisant une étonnante capacité d'adaptation de ces ruminants à l'environnement. De nombreuses questions fondamentales restent à élucider (différences de sensibilité à la photopériode entre les espèces, mécanismes de régulation de la pousse des bois chez le mâle, contrôle de la diapause chez le chevreuil...).

Dans un premier temps, l'utilisation des biotechnologies de la reproduction a été proposée en vue d'améliorer l'efficacité de la sélection des programmes

d'élevage. Les techniques de synchronisation d'oestrus et d'insémination artificielle sont notamment utilisées dans ce but en Nouvelle Zélande et des sociétés privées commercialisent les semences de mâles sélectionnés. Elles ne semblent cependant applicables que dans les élevages où le degré de domestication des animaux est élevé. Aujourd'hui, l'intérêt de ces recherches est renforcé par l'utilisation possible de ces techniques dans la conservation de la biodiversité. Les avancées dans le domaine de la stimulation de la croissance folliculaire, de la production *in vitro* et de la cryoconservation d'embryons semblent en effet permettre, à terme, de pouvoir envisager des applications aux espèces menacées d'extinction.

Références

- Adam C.L., McDonald I., Moir C.E., Pennie K., 1988. Foetal development in red deer (*Cervus elaphus*). I. Growth of the foetus and associated tissues. *Anim. Prod.*, 46, 131-138.
- Adam C.L., Moir C.E., Atkinson T., 1985. Plasma concentrations of progesterone in female red deer (*Cervus elaphus*) during the breeding season, pregnancy and anoestrus. *J. Reprod. Fertil.*, 74(2), 631-636.
- Aitken R.J., 1974. Delayed implantation in roe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Reprod. Fertil.*, 39, 225-233.
- Aitken R.J., 1981. Aspects of delayed implantation in the roe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Reprod. Fertil.*, Suppl 29, 83-95.
- Anderson G.M., Barrell G.K., 1998a. Effects of thyroidectomy and thyroxine replacement on seasonal reproduction in the red deer hind. *J. Reprod. Fertil.*, 113(2), 239-250.
- Anderson G.M., Barrell G.K., 1998b. Effects of thyroidectomy and thyroxine replacement on seasonal reproduction in the red deer hind. *J. Reprod. Fertil.*, 113(2), 239-250. 98b.
- Arendt J., 1986. Assay of melatonin and its metabolites: results in normal and unusual environments. *J. Neural Transm.*, Suppl 21, 11-33.
- Argo C.M., Jabbour H.N., Goddard P.J., Webb R., Loudon A.S., 1994. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Pere David's deer semen. *J. Reprod. Fertil.*, 100, 629-636.
- Asher G.W., 1985. Oestrous cycle and breeding season of farmed fallow deer, *Dama dama*. *J. Reprod. Fertil.*, 75, 521-529.
- Asher G.W., Barrell G.K., Adam J.L., Staples L.D., 1988. Effects of subcutaneous melatonin implants on reproductive seasonality of farmed fallow deer (*Dama dama*). *J. Reprod. Fertil.*, 84, 679-691.
- Asher G.W., Barrell G.K., Peterson A.J., 1986. Hormonal changes around oestrus of farmed fallow deer, *Dama dama*. *J. Reprod. Fertil.*, 78, 487-496.
- Asher G.W., Berg D.K., Beaumont S., Morrow C.J., O'Neill K.T., Fisher M.W., 1996. Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian x European fallow deer (*D. d. mesopotamica x D. d. dama*). *Anim. Reprod. Sci.*, 45, 201-215.
- Asher G.W., Berg D.K., Evans G., 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 195-211.
- Asher G.W., Day A.M., Barrell G.K., 1987. Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fertil.*, 79, 353-362.
- Asher G.W., Fisher M.W., Berg D.K., Waldrup K.A., Pearse A.J., 1996a. Luteal support of pregnancy in red deer (*Cervus elaphus*): effect of cloprostenol, ovariectomy and lutectomy on the viability of the post-implantation embryo. *Anim. Reprod. Sci.*, 41(2), 141-151.
- Asher G.W., Fisher M.W., Fennessy P.F., 1996b. Environmental constraints on reproductive performance of farmed deer. *Anim. Reprod. Sci.*, 42(1-4), 35-44.
- Asher G.W., Fisher M.W., Fennessy P.F., Mackintosh C.G., Jabbour H.N., Morrow C.J., 1993. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). *Anim. Reprod. Sci.*, 33(1-4), 241-265.
- Asher G.W., Fisher M.W., Jabbour H.N., Smith J.F., Mulley R.C., Morrow C.J., Veldhuizen F.A., Langridge M., 1992. Relationship between the onset of oestrus, the preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrous synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.*, 96, 261-273.
- Asher G.W., Fisher M.W., Smith J.F., Jabbour H.N., Morrow C.J., 1990. Temporal relationship between the onset of oestrus, the preovulatory LH surge and ovulation in farmed fallow deer, *Dama dama*. *J. Reprod. Fertil.*, 89, 761-767.
- Asher G.W., Jabbour H.N., Thompson J.G., Tervit H.R., Morrow C.J., 1995. Superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*): Incidence of ovulation and changes in plasma hormone concentrations during the pre-ovulatory period in relation to ova recovery and fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.*, 38(1-2), 137-154.
- Asher G.W., Kraemer D.C., Magyar S.J., Brunner M., Moerbe R., Giaquinto M., 1990. Intrauterine insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*) with frozen-thawed semen via laparoscopy. *Theriogenology*, 34(3), 569-577.
- Asher G.W., Monfort S.L., Wemmer C., 1999. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl 54, 143-156.
- Asher G.W., Muir P.D., Semiadi G., O'Neill K.T., Scott I.C., Barry T.N., 1997. Seasonal patterns of luteal cyclicity in young red deer (*Cervus elaphus*) and sambar deer (*Cervus unicornis*). *Reprod. Fertil. Dev.*, 9, 587-596.
- Asher G.W., O'Neill K.T., Scott I.C., Mockett B.G., Fisher M.W., 2000a. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*). I. Seasonal luteal cyclicity. *Anim. Reprod. Sci.*, 59, 43-59.
- Asher G.W., O'Neill K.T., Scott I.C., Mockett B.G., Pearse A.J., 2000b. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*). II. Seasonal and genetic effects on the superovulatory response to exogenous FSH. *Anim. Reprod. Sci.*, 59, 61-70.
- Asher G.W., Peterson A.J., 1991. Pattern of LH and testosterone secretion of adult male fallow deer (*Dama dama*) during the transition into the breeding season. *J. Reprod. Fertil.*, 91, 649-654.

- Asher G.W., Peterson A.J., Bass J.J., 1989a. Seasonal pattern of LH and testosterone secretion in adult male fallow deer, *Dama dama*. J. Reprod. Fertil., 85, 657-665.
- Asher G.W., Peterson A.J., Duganzich D., 1989b. Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*. J. Reprod. Fertil., 85, 657-665.
- Asher G.W., Peterson A.J., Watkins W.B., 1988. Hormonal changes during luteal regression in farmed fallow deer, *Dama dama*. J. Reprod. Fertil., 84, 379-386.
- Asher G.W., Scott I.C., O'Neill K.T., Smith J.F., Inskeep E.K., Townsend E.C., 1997. Ultrasonographic monitoring of antral follicle development in red deer (*Cervus elaphus*). J. Reprod. Fertil., 111, 91-99.
- Audige L., Wilson P.R., Morris R.S., 1999. Reproductive performance of farmed red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand. I. Descriptive data. Anim. Reprod. Sci., 55, 127-141.
- Bainbridge D.R., Catt S.L., Evans G., Jabbour H.N., 1999. Successful *in vitro* fertilization of *in vivo* matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). Theriogenology, 51, 891-898.
- Bainbridge D.R., Davies M.H., Scaramuzzi R.J., Jabbour H.N., 1996. Exogenous interferon delays luteal regression in red deer hinds (*Cervus elaphus*) by suppressing steroid-induced endometrial oxytocin sensitivity. Biol. Reprod., 55, 883-888.
- Bainbridge D.R., Deakin D., Jabbour H.N., 1998. Premature luteal regression induced by equine chorionic gonadotropin and estrogen is suppressed by administration of exogenous interferon in red deer (*Cervus elaphus*). Biol. Reprod., 58, 124-129.
- Bainbridge D.R., Hunter M.G., Chapple D.G., Flint A.P., Jabbour, H.N., 1996. Role of estrogen and prostaglandin F2 alpha in premature luteal regression in monovulatory and superovulated red deer (*Cervus elaphus*). Biol. Reprod., 54, 347-354.
- Bainbridge D.R., Jabbour H.N., 1997. Effect of pregnancy and exogenous interferon on synchronous pulsatile release of oxytocin and luteolytic prostaglandin F2 alpha in red deer (*Cervus elaphus*). J. Reprod. Fertil., 111, 299-307.
- Bainbridge D.R., Jabbour, H.N., 1999. Source and site of action of anti-luteolytic interferon in red deer (*Cervus elaphus*): possible involvement of extra-ovarian oxytocin secretion in maternal recognition of pregnancy. J. Reprod. Fertil., 116, 305-313.
- Bavister B.D., 2002. Early history of *in vitro* fertilization. Reproduction, 124, 181-196.
- Beckers J.F., Drion P.V., Garbayo J.M., Perenyi Z., Zarrouk A., Sulon J., Remy B., Szenci O., 1999. Pregnancy associated glycoproteins in ruminants: inactive members of the aspartic proteinase family. Acta Vet. Hung., 47, 461-469.
- Berg D.K., Asher, G.W., 2003. New developments reproductive technologies in deer. Theriogenology, 59, 189-205.
- Berg D. K., Asher G. W., Pugh P. A., Tervit H. R., Thompson, J. G. 1995. Pregnancies following the transfer of *in vitro* matured and fertilized red deer (*Cervus elaphus*) oocytes. Theriogenology, 43(1), 166.
- Berg D.K., Pugh P.A., Thompson J.G., Asher G.W., 2002a. Development of *in vitro* embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*). Part 3. *In vitro* fertilisation using sheep serum as a capacitating agent and the subsequent birth of calves. Anim. Reprod. Sci., 70, 85-98.
- Berg D.K., Thompson J.G., Asher G.W., 2002b. Development of *in vitro* embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*). Part 2. The timing of *in vitro* nuclear oocyte maturation. Anim. Reprod. Sci., 70, 77-84.
- Berg D.K., Thompson J.G., Asher G.W., 2002c. Development of *in vitro* embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*). Part 1. Effect of epithelial oviductal monolayers and heparin on *in vitro* sperm motility and penetration of *in vitro* matured oocytes. Anim. Reprod. Sci., 70, 65-76.
- Berg D.K., Thompson J.G., Pugh P.A., Tervit H. R., Asher G. W., 1995. Successful *in vitro* culture of early cleavage stage embryos recovered from superovulated red deer (*Cervus elaphus*). Theriogenology, 44(2), 247-254.
- Bierschwal C.J., Mather E.C., Martin C.E., Murphy D.A., Korschgen, L.J., 1970. Some characteristics of deer semen collected by electroejaculation. J. Am. Vet. Med. Assoc., 157, 627-632.
- Blash S., Melican D., Gavin W., 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. Theriogenology, 54, 899-905.
- Bowers S.D., Brown C.G., Strauch T.A., Gandy B.S., Neuendorff D.A., Randel R.D., Willard S.T., 2004. Artificial insemination following observational versus electronic methods of estrus detection in red deer hinds (*Cervus elaphus*). Theriogenology, 62, 652-663.
- Brinklow B.R., Loudon A.S., 1993. Gestation periods in the Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*): evidence for embryonic diapause or delayed development. Reprod. Fertil. Dev., 5, 567-575.
- Bubenik G.A., Pomerantz D.K., Schams D., Smith, P.S., 1987. The role of androstenedione and testosterone in the reproduction and antler growth of a male white-tailed deer. Acta Endocrinol., 114, 147-152.
- Bubenik G.A., Schams D., White R.J., Rowell J., Blake J., Bartos L., 1997. Seasonal levels of reproductive hormones and their relationship to the antler cycle of male and female reindeer (*Rangifer tarandus*). Comp. Biochem. Physiol. Ser. B Biochem. Mol. Biol., 116, 269-277.
- Cameron R.D., 1977. Semen collection and evaluation in the ram. The effect of method of stimulation on response to electroejaculation. Aust. Vet. J., 53, 380-383.
- Caraty A., Skinner, D.C., 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. Endocrinology, 140, 165-170.
- Carragher J.F., Ingram J.R., Matthews L.R., 1997. Effects of yarding and handling procedures on stress responses of red deer stags (*Cervus elaphus*). Appl. Anim. Behav. Sci., 51 (1-2), 143-158.
- Cassinello J., Abaigar T., Gomendio M., Roldan E.R., 1998. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorr*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). J. Reprod. Fertil., 113, 35-45.
- Ceballos G., Ehrlich P.R., 2002. Mammal population losses and the extinction crisis. Science, 296, 904-907.
- Chapple R.S., English A.W., Mulley R.C., 1993. Characteristics of the oestrous cycle and duration of gestation in chital hinds (*Axis axis*). J. Reprod. Fertil., 98, 23-26.
- Chapman N.G., Harris S., 1991. Evidence that the seasonal antler cycle of adult Reeves' muntjac (*Muntiacus reevesi*) is not associated with reproductive quiescence. J. Reprod. Fertil., 92, 361-369.
- Chemineau P., Baril G., Leboeuf B., Maurel M.C., Roy F., Pellicer-Rubio M., Malpoux B., Cogne Y., 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. J. Reprod. Fertil., 54, 129-142.
- Cogne Y., Poulin N., Pisselet C., Monniaux D., 1995. Effect of atresia on the ability of follicular fluid to support developmental competence of sheep oocytes *in vitro*. Theriogenology, 43(1), 188.
- Comizzoli P., Mermillod P., Cogne Y., Chai N., Legendre X., Mauge R., 2001. Successful *in vitro* production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). Theriogenology, 55, 649-659.
- Curlewis J.D., Loudon A.S., Coleman A.P., 1988. Oestrous cycles and the breeding season of the Pere David's deer hind (*Elaphurus davidianus*). J. Reprod. Fertil., 82, 119-126.
- Dacheux J.L., Pisselet C., Blanc M.R., Hochereau-de Reviers M.T., Courot M., 1981. Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. J. Reprod. Fertil., 61, 363-371.
- Demmers K.J., Derecka K., Flint A., 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. Reproduction, 121, 41-49.
- Demmers K.J., Jabbour H.N., Deakin D.W., Flint A.P., 2000. Production of interferon by red deer (*Cervus elaphus*) conceptuses and the effects of roIFN-tau on the timing of luteolysis and the success of asynchronous embryo transfer. J. Reprod. Fertil., 118, 387-395.
- Demmers K.J., Kaluz S., Deakin D.W., Jabbour H.N., Flint A.P., 1999. Production of interferon by the conceptus in red deer *Cervus elaphus*. J. Reprod. Fertil., 115, 59-65.
- De Vos A., 1982. Deer farming: guidelines on practical aspects. FAO Animal Production and Health Paper, Rome, 27, 54p.
- Dieleman S.J., Hendriksen P.J., Viuff D., Thomsen P.D., Hyttel P., Knijn H.M., Wrenzycki C., Kruip T.A., Niemann H., Gadella B.M., Bevers M.M., Vos P.L., 2002. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. Theriogenology, 57, 5-20.

- Dott H. M., Utsi M. N. P., 1971. The collection and examination of semen of the reindeer (*Rangifer tarandus*). *J. Zool.*, 164, 419-424.
- Fennessy P.F., Asher G.W., Bateson N.S., Dixon T.E., Hunter J.W., Bringans M.J., 1994. Embryo transfer in deer. *Theriogenology*, 41, 133-138.
- Fennessy P.F., Fisher M.W., Shackell G.H., Mackintosh C. G., 1989. Superovulation and embryo recovery in Red deer (*Cervus elaphus*) hinds. *Theriogenology*, 32(5), 877-883.
- Fennessy P.F., Mackintosh C.G., Shackell G.H., 1990. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Anim. Prod.*, 51, 613-621.
- Fennessy P.F., Suttie J.M., 1985. Antler growth : nutritional and endocrine factors. P. F. Fennessy and K. R. Drew. Proceedings of international conference on the biology of deer production. The Royal Society of New Zealand Bull., 22, 239-250.
- Flint A.P., Jabbour H.N., Loudon A.S., 1994. Oxytocin stimulates uterine prostaglandin F2 alpha secretion in red deer *Cervus elaphus*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 269-271.
- Flint A.P., Sheldrick E.L., McCann T.J., Brinklow B.R., Loudon A.S., 1991. Prostaglandin-induced secretion of oxytocin and prolactin in red (*Cervus elaphus*) and Pere David's (*Elaphurus davidianus*) deer hinds: evidence for oxytocin of luteal origin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 83, 432-438.
- Flint A.P., Albon S.D., Jafar S.I., 1997. Blastocyst development and conceptus sex selection in red deer *Cervus elaphus*: studies of a free-living population on the Isle of Rum. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 106, 374-383.
- Flint A.P., Krzywinski A., Sempere A.J., Mauget R., Lacroix A., 1994. Luteal oxytocin and monoestrus in the roe deer *Capreolus capreolus*. *J. Reprod. Fertil.*, 101, 651-656.
- Fukui Y., McGowan L.T., James R.W., Asher G.W., Tervit H. R., 1991. Effects of culture duration and time of gonadotropin addition on *in vitro* maturation and fertilization of red deer (*Cervus elaphus*) oocytes. *Theriogenology*, 35(3), 499-512.
- Garcia A.J., Landete-Castillejos T., Garde J.J., Gallego L., 2002. Reproductive seasonality in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology*, 58, 1553-1562.
- Garde J.J., Ortiz N., Garcia A.J., Gallego L., Landete-Castillejos T., Lopez A., 1998. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch. Androl.*, 41, 195-202.
- Gizejewski Z., 2004. Effect of season on characteristics of red deer (*Cervus elaphus L.*) semen collected using modified artificial vagina. *Reprod. Biol.*, 4, 51-66.
- Gizejewski Z., Snochowski M., Mayntz M., 2003. Fractions of the semen of red deer (*Cervus elaphus*) : their occurrence and characteristics in different periods of season. *Pol. J. Vet. Sci.*, 6, 219-23.
- Goeritz F., Quest M., Wagener A., Fassbender M., Broich A., Hildebrandt T. B., Hofmann R. R., Blottner S., 2003. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology*, 59(7), 1487-1502.
- Gosch B., Fischer K., 1989. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 85, 7-17.
- Goss R.J., 1968. Inhibition of growth and shedding of antlers by sex hormones. *Nature*, 220, 83-85.
- Goss R.J., 1969a. Photoperiodic control of antler cycles in deer. I Phase shift and frequency changes. *J. Exp. Zool.*, 170, 311-324.
- Goss R.J., 1969b. Photoperiodic control of antler cycles in deer. II Alteration in amplitude. *J. Exp. Zool.*, 171, 223-234.
- Green J.A., Xie S., Quan X., Bao B., Gan X., Mathialagan N., Beckers J.F., Roberts R.M., 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol. Reprod.*, 62, 1624-1631.
- Guinness F., Lincoln G.A., Short R.V., 1971. The reproductive cycle of the female red deer, *Cervus elaphus L.* *J. Reprod. Fertil.*, 27, 427-438.
- Guinness F.E., Albon S.D., Clutton-Brock T.H., 1978. Factors affecting reproduction in red deer (*Cervus elaphus*) hinds on Rhum. *J. Reprod. Fertil.*, 54, 325-334.
- Guler A., Poulin N., Mermillod P., Terqui M., Cognie Y., 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54, 209-218.
- Guérin Y., Locatelli Y., Comizolli P., Mauget R., Mermillod P., Legendre X., Gatti J.-L., Dacheux J.L., 2003. Conservation et utilisation du sperme epididymaire d'ovins et de cervidés en insémination artificielle et fécondation *in vitro*. *Actes du B.R.G.*, 4, 173-183.
- Haigh J.C., Cates W.F., Glover G.J., Rawlings N.C., 1984. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.*, 70, 413-418.
- Hamasaki S., Yamauchi K., Ohki T., Murakami M., Takahara Y., Takeuchi Y., Mori Y., 2001. Comparison of various reproductive status in Sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 195-198.
- Harder J.D., Woolf A., 1976. Changes in plasma levels of oestrone and oestradiol during pregnancy and parturition in white-tailed deer. *J. Reprod. Fertil.*, 47, 161-163.
- Harnal V. K., Spindler R., Monfort S. L., Pukazhenth B., Bird D. M., Wildt D. E., 2001. Sperm capacitation *in vitro* in the eld's deer. *Theriogenology*, 56(3), 399-413.
- Hishinuma M., Suzuki K., Sekine J., 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology*, 59(3-4), 813-820.
- Hochereau-de Reviers M.T., Lincoln G.A., 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J. Reprod. Fertil.*, 54, 209-213.
- Hosack D.A., Miller K.V., Ware L.H., Mashburn K.L., Morrow C.J., Williamson L.R., Marchinton R.L., Monfort S.L., 1999. Stag exposure advances the LH surge and behavioral estrus in Eld's deer hinds after CIDR device synchronization of estrus. *Theriogenology*, 51, 1333-1342.
- Huang F., Cockrell D.C., Stephenson T.R., Noyes J.H., Sasser R.G., 1999. Isolation, purification, and characterization of pregnancy-specific protein B from elk and moose placenta. *Biol. Reprod.*, 61, 1056-1061.
- Jabbour H.N., Asher G.W., 1991. Artificial breeding of farmed fallow deer (*Dama dama*). In: *Wildlife Production: Conservation and Sustainable Development*, L.A. Renecker, R.J. Hudson (Eds), 485-491.
- Jabbour H.N., Asher G.W., Smith J.F., Morrow C.J., 1992. Effect of progesterone and oestradiol benzoate on oestrous behaviour and secretion of luteinizing hormone in ovariectomized fallow deer (*Dama dama*). *J. Reprod. Fertil.*, 94, 353-361.
- Jabbour H.N., Marshall V.S., Argo C.M., Hooton J., Loudon A.S., 1994. Successful embryo transfer following artificial insemination of superovulated fallow deer (*Dama dama*). *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 181-185.
- Jabbour H.N., Veldhuizen F.A., Green G., Asher G.W., 1993. Endocrine responses and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 98, 495-502.
- Jabbour H.N., Veldhuizen F.A., Mulley R.C., Asher G.W., 1994. Effect of exogenous gonadotrophins on oestrus, the LH surge and the timing and rate of ovulation in red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.*, 100, 533-539.
- Jaczewski Z., Jasiorowski T., 1974. Observations on the electroejaculation in red deer. *Acta Theriol.*, (Warsz) 19, 151-157.
- Janovsky M., Tataruch F., Ambuehl M., Giacometti M., 2000. A Zoletil-Rompun mixture as an alternative to the use of opioids for immobilization of feral red deer. *J. Wildl. Dis.*, 36, 663-669.
- Kameyama Y., Miyamoto A., Kobayashi S., Kuwayama T., Ishijima Y., 2002. Annual changes in serum LH and testosterone concentrations in male Sika deer (*Cervus Nippon*). *J. Reprod. Dev.*, 48, 613-617.
- Karsch F.J., Legan S.J., Hauger R.L., Foster D.L., 1977. Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: dependence on the ovaries. *Endocrinology*, 101, 800-806.
- Karsch F.J., Legan S.J., Ryan, K.D., Foster D.L., 1980. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 23, 404-413.
- Kelly R. W., McNatty K. P., Moore G. H., 1985. Hormonal change around oestrus in female red deer. Proceedings of international conference on the biology of deer production. P. F. Fennessy, K. R. Drew. Royal Soc. New Zeal. Bull. 22, 181-184.
- Kelly R.W., McNatty K.P., Moore G.H., Ross D., Gibb M., 1982. Plasma concentrations of LH,

- prolactin, oestradiol and progesterone in female red deer (*Cervus elaphus*) during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 64, 475-483.
- Khurana N.K., Niemann H., 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54, 741-756.
- Krzywinski A., 1976. Collection of red deer semen with the artificial vagina. VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1002-1005.
- Krzywinski A., 1981. Freezing of post mortem collected semen from moose and red deer. *Acta Theriol.*, 424-426.
- Lambert R.T., Ashworth C.J., Beattie L., Gebbie F.E., Hutchinson J.S., Kyle D.J., Racey P.A., 2001. Temporal changes in reproductive hormones and conceptus-endometrial interactions during embryonic diapause and reactivation of the blastocyst in European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Reproduction*, 121, 863-871.
- Lengwinat T., Meyer H.H., 1996. Investigations of BrdU incorporation in roe deer blastocysts *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 45, 103-107.
- Li C., Littlejohn R.P., Corson I.D., Suttie J.M., 2003. Effects of testosterone on pedicle formation and its transformation to antler in castrated male, freemartin and normal female red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 131(1), 21-31.
- Lincoln G.A., 1971. Puberty in a seasonally breeding male, the red deer stag (*Cervus elaphus* L.). *J. Reprod. Fertil.*, 25, 41-54.
- Lincoln G.A., 1998. Photoperiod-melatonin relay in deer. *Acta Vet. Hung.*, 46, 341-356.
- Lincoln G.A., Fraser H.M., Fletcher T.J., 1984. Induction of early rutting in male red deer (*Cervus elaphus*) by melatonin and its dependence on LHRH. *J. Reprod. Fertil.*, 72, 339-343.
- Lincoln G.A., Guinness F.E., 1972. Effect of altered photoperiod on delayed implantation and moulting in roe deer. *J. Reprod. Fertil.*, 31, 455-457.
- Lincoln G.A., Kay, R.N., 1979. Effects of season on the secretion of LH and testosterone in intact and castrated red deer stags (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.*, 55, 75-80.
- Lincoln G.A., Tyler, N.J., 1999. Role of oestradiol in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J. Reprod. Fertil.*, 115, 167-174.
- Liu B.T., Cheng S.P., Huang M.C., Yu J.Y., 2002. Serum progesterone changes in luteal cyclicity and duration of estrous cycle in Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*) hinds. *Zool. Sci.*, 19, 1033-1037.
- Loudon A.S., Curlew J.D., 1988. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *J. Reprod. Fertil.*, 83, 729-738.
- Loudon A.S., Milne J.A., Curlew J.D., McNeilly A.S., 1989. A comparison of the seasonal hormone changes and patterns of growth, voluntary food intake and reproduction in juvenile and adult red deer (*Cervus elaphus*) and Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*) hinds. *J. Endocrinol.*, 122, 733-745.
- Luciano A.M., Modina S., Vassena R., Milanesi E., Lauria A., Gandolfi, F. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.*, 70, 465-472.
- Malpoux B., Viguie C., Thierry J.C., Chemineau, P., 1996. Contrôle photopériodique de la reproduction. *Prod. Anim.*, 9, 9-23.
- McCorkell R. B., MacDougall L., Adams G. P., 2004. Ovarian follicle development in wapiti (*Cervus elaphus*) during the anovulatory season. *Theriogenology*, 61(2-3), 473-483.
- McLeod B.J., Meikle L.M., Fisher M.W., Manley T.R., Heath D.A., McNatty, K.P., 2001a. Variation in antral follicle development during the follicular phase of the oestrous cycle in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. *Reproduction*, 121, 697-705.
- McLeod B.J., Meikle L.M., Fisher M.W., Shackell G.H., Heath D.A., 2001b. Gonadotrophin-induced follicle development in red deer hinds during the breeding and non-breeding seasons. *Reproduction*, 122, 111-119.
- McMahon C.D., Fisher M.W., Mockett B.G., Littlejohn R.P., 1997. Embryo development and placental formation during early pregnancy in red deer. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9, 723-730.
- Meikle L.M., Fisher M.W., 1990. Induction oestrus in the ovariectomised red deer with exogenous progesterone and oestradiol benzoate. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 50, 155-160.
- Meikle L.M., Fisher M.W., 1996. Regulation of reproductive seasonality in the red deer hind: oestradiol- dependent and -independent influences on the patterns of LH concentrations. *J. Reprod. Fertil.*, 106, 213-220.
- Moenter S.M., Woodfill C.J., Karsch F.J., 1991. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology*, 128, 1337-1344.
- Monfort S.L., Asher G.W., Wildt D.E., Wood T.C., Schiewe M.C., Williamson L.R., Bush M., Rall W.F., 1993a. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 99, 459-465.
- Monfort S.L., Brown J.L., Bush M., Wood T.C., Wemmer C., Vargas A., Williamson L.R., Montali R.J., Wildt D.E., 1993b. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphology, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *J. Reprod. Fertil.*, 98, 471-480.
- Monfort S.L., Wemmer C., Kepler T.H., Bush M., Brown J.L., Wildt D.E., 1990. Monitoring ovarian function and pregnancy in Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) by evaluating urinary steroid metabolite excretion. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 271-281.
- Moore N.W., Robinson T.J., 1957. The vaginal response of the spayed ewe to repeated injections of oestradiol benzoate given alone or preceded by progesterone. *J. Endocrinol.*, 14, 297-303.
- Mylrea G.E., Mulley R.C., English A.W., Evans G., 1999. Reproductive cycles of farmed female chital deer (*Axis axis*). *Reprod. Fertil. Dev.*, 11, 167-173.
- Park J.Y., Su Y.Q., Ariga M., Law E., Jin S.L., Conti M., 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 303, 682-684.
- Peterson A. J., Ledgard A. M., Berg D. K., 1997. Conceptus development and associated fertility in red deer (*Cervus elaphus*) from days 11 to 25 after mating. *Theriogenology*, 47(1), 402. 97.
- Plotka E.D., Seal U.S., Schmolter G.C., Karns P.D., Keenlyne, K.D., 1977a. Reproductive steroids in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). I. Seasonal changes in the female. *Biol. Reprod.* 16(3), 340-343. 77.
- Plotka E.D., Seal U.S., Verme L.J., Ozoga J.J., 1977b. Reproductive steroids in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). II. Progesterone and estrogen levels in peripheral plasma during pregnancy. *Biol. Reprod.*, 17, 78-83.
- Plotka E.D., Seal U.S., Verme L.J., Ozoga J.J., 1980. Reproductive steroids in deer. III. Luteinizing hormone, estradiol and progesterone around estrus. *Biol. Reprod.*, 22, 576-581.
- Plotka E.D., Seal U.S., Verme L.J., Ozoga J.J., 1982. Reproductive steroids in deer. IV. Origin of progesterone during pregnancy. *Biol. Reprod.*, 26, 258-262.
- Robinson T.J., 1954. Relationship of oestrogen and progesterone in oestrous behaviour of the ewe. *Nature*, 173, 878.
- Robinson J. J., McDonald I., Fraser C., Crofts R. M. J., 1977. Studies on reproduction in prolific ewes. 1. Growth of the products of conception. *J. Agric. Sci.*, 88, 539-552.
- Roelants H., Schneider F., Goritz F., Streich J., Blotner S., 2002. Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. *Biol. Reprod.*, 66, 305-312.
- Rolf H.J., Fischer, K., 1996. Serum testosterone, 5-alpha-dihydrotestosterone and different sex characteristics in male fallow deer (*Cervus dama*): a long-term experiment with accelerated photoperiods. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 115, 207-221.
- Ropstad E., 2000. Reproduction in female reindeer. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 561-570.
- Ropstad E., Forsberg M., Sire J.E., Kindahl H., Nilssen T., Pedersen O., Edqvist L.E., 1995. Plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH and 15-ketodihydro-PGF2 alpha in Norwegian semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) during their first reproductive season. *J. Reprod. Fertil.*, 105, 307-314.
- Schon J., Goritz F., Streich J., Blotner S., 2004. Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment. *Anat. Embryol. (Berl)*, 208, 151-159.

- Sempere A., 1977. Plasma progesterone levels in the roe deer, *Capreolus capreolus*. J. Reprod. Fertil., 50, 365-366.
- Sempere A. J., Blanvillain C., Mauget R., Lacroix A., Chemineau P., 1995. Effects of melatonin implantation or artificial long days on seasonal ovulatory activity in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). Anim. Reprod. Sci., 38(1-2), 127-136. 95.
- Sempere A.J., Mauget R., Chemineau P., 1992. Experimental induction of luteal cyclicality in roe deer (*Capreolus capreolus*). J. Reprod. Fertil., 96, 379-384.
- Shi Z.D., Barrell, G.K., 1994. Thyroid hormones are required for the expression of seasonal changes in red deer (*Cervus elaphus*) stags. Reprod. Fertil. Dev., 6, 187-192.
- Sjaastad O.V., Blom A.K., Austad R., Oen E.O., 1990. Plasma progesterone in reindeer in relation to ovariectomy and hysterectomy. Acta Vet. Scand., 31, 45-51.
- Snyder D.L., Cowan R.L., Hagen D.R., Schanbacher B.D., 1983. Effect of pinealectomy on seasonal changes in antler growth and concentrations of testosterone and prolactin in white-tailed deer. Biol. Reprod., 29, 63-71.
- Soler A.J., Garcia A.J., Fernandez-Santos M.R., Estes M.C., Garde J.J., 2003. Effects of thawing procedure on postthawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 degrees C. J. Androl., 24, 746-756.
- Spencer T.E., Bazer F.W., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Reprod. Biol. Endocrinol., 2, 49.
- Suttie J.M., Fennessy P.F., Corson I.D., Laas F.J., Elgar H.J., Lapwood, K.R., 1989. LH and testosterone responses to GnRH in red deer (*Cervus elaphus*) stags kept in a manipulated photoperiod. J. Reprod. Fertil., 85, 213-219.
- Suttie J.M., Fennessy P.F., Corson I.D., Veenvliet B.A., Littlejohn R.P., Lapwood K.R., 1992. Seasonal pattern of luteinizing hormone and testosterone pulsatile secretion in young adult red deer stags (*Cervus elaphus*) and its association with the antler cycle. J. Reprod. Fertil., 95, 925-933.
- Suttie J.M., Fennessy P.F., Crosbie S.F., Corson, I.D., Laas F.J., Elgar H.J., Lapwood K.R. 1991. Temporal changes in LH and testosterone and their relationship with the first antler in red deer (*Cervus elaphus*) stags from 3 to 15 months of age. J. Endocrinol., 131, 467-474.
- Suttie J.M., Lincoln G.A., Kay R.N., 1984. Endocrine control of antler growth in red deer stags. J. Reprod. Fertil., 71, 7-15.
- Thompson J.G.E., Asher G.W., 1988. Superovulation and ova recovery in farmed fallow deer (*Dama dama*). Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol., 20th. Ann. Conf., 4.
- Vahtiala S., Sakkinen H., Dahl E., Eloranta E., Beckers J.F., Ropstad E., 2004. Ultrasonography in early pregnancy diagnosis and measurements of fetal size in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Theriogenology, 61, 785-795.
- Webster J.R., Barrell G.K., 1985. Advancement of reproductive activity, seasonal reduction in prolactin secretion and seasonal pelage changes in pubertal red deer hinds (*Cervus elaphus*) subjected to artificially shortened daily photoperiod or daily melatonin treatments. J. Reprod. Fertil., 73, 255-260.
- Webster J.R., Corson I.D., Littlejohn R.P., Stuart S.K., Suttie J.M., 1999. Effects of photoperiod on the cessation of growth during autumn in male red deer and growth hormone and insulin-like growth factor-I secretion. Gen. Comp. Endocrinol., 113, 464-477.
- Willard S.T., Hughes Jr. D.M., Bringans M., Sasser R.G., White D.R., Jaques J.T., Godfrey R.W., Welsh Jr. T.H., Randel R.D., 1996. Artificial insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*Cervus nippon*). Theriogenology, 46(5), 779-789.
- Willard S.T., Petty S.J., Sasser R.G., White D.L., Randel R.D., 1999. Pregnancy detection and the effects of age, body weight, and previous reproductive performance on pregnancy status and weaning rates of farmed fallow deer (*Dama dama*). J. Anim. Sci., 77, 32-38.
- Willard S.T., Randel R.D., 2002. Testicular morphology and sperm content relative to age, antler status and season in axis deer stags (*Axis axis*). Small Rum. Res., 45(1), 51-60.
- Willard S.T., Sasser R.G., Jaques J.T., White D.R., Neuendorff D.A., Randel R.D., 1998. Early pregnancy detection and the hormonal characterization of embryonic-fetal mortality in fallow deer (*Dama dama*). Theriogenology, 49, 861-869.
- Williams LM, Hannah L T, Kyle C.E., a Adam C.L., 1996. Central melatonin receptors in red deer (*Cervus elaphus*). Gen. Comp. Endocrin., 104(1), 1-6.
- Wislocki G.B., Aub J.C., Waldo C.M., 1947. The effect of gonadectomy and administration of testosterone propionate on the growth of antlers in male and female deer. Endocrinology, 40, 202-224.
- Xie S., Green J., Bixby J.B., Szafranska B., DeMartini J.C., Hecht S., Roberts R.M., 1997. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12809-12816.
- Zomborszky Z., Zubor T., Toth J., Horn P., 1999. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. Acta Vet. Hung., 47, 263-270.

Résumé

Ces dernières années, l'élevage de cervidés s'est considérablement développé en Nouvelle-Zélande pour devenir une industrie profitable. Alors que quelques cervidés (daim d'Europe et cerf élaphe) font l'objet de domestication et d'élevage dans un but commercial, d'autres espèces et sous-espèces de cervidés sont menacées d'extinction dans le milieu naturel. Les travaux de recherches effectués afin de mieux caractériser et maîtriser la fonction de reproduction de ces ruminants sont présentés dans cette étude bibliographique.

Il apparaît qu'à l'instar de nos ruminants domestiques (ovins, caprins), les cervidés originaires des zones tempérées sont généralement caractérisés par un saisonnement marqué de leur fonction de reproduction. Ces variations saisonnières d'activité sexuelle sont dictées par les variations photopériodiques et permettent la naissance des jeunes en fin de printemps. Chez les cervidés, les différences entre les périodes d'activité et de repos sexuels semblent beaucoup plus marquées en comparaison de nos ruminants domestiques. La période d'activité sexuelle est variable d'une espèce à l'autre (été, automne ou début de l'hiver) mais très fixe pour une espèce donnée. La période de repos sexuel traduit des modifications importantes dans les sécrétions de gonadotrophines et se caractérise notamment par une aspermie complète chez le mâle. Chez la femelle, l'état d'anoestrus est profond et associé à une absence d'ovulation. La durée de gestation est également variable d'une espèce à l'autre mais est remarquablement fixe pour une espèce donnée.

Chez les cervidés originaires des zones subtropicales et selon les espèces, les variations d'activité sexuelle sont plus discrètes permettant une répartition des mises bas plus ou moins homogène au cours de l'année, y compris lorsque les animaux sont transportés sous des latitudes élevées.

Dans le cas des espèces de cervidés menacés d'extinction, l'utilisation des biotechnologies de la reproduction et des méthodes de procréation assistée pourrait, à terme, faciliter la réalisation des programmes conservatoires. Les techniques classiques de production *in vivo* d'embryons basées sur l'ovulation multiple, l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire se sont avérées difficilement applicables aux cervidés. Aussi, les recherches portent actuellement sur le développement de techniques de production *in vitro* d'embryons.

Abstract

Characteristics and control of reproduction in the Cervidae

In recent years, cervidae breeding has been considerably developed in New Zealand, now becoming a profitable industry. Even though some cervidae (fallow deer, red deer) are being domesticated and bred commercially, other species and sub-species of cervidae are threatened by extinction in their natural habitat. The research studies that have been performed in order to better characterise and control the reproduction function of these ruminants are presented in this bibliographic study.

It appears that as with our farm ruminants (ovines and caprines), the cervidae coming from temperate zones are generally characterised by the marked seasonality of their reproduction function. These seasonal variations of sexual activity are led by photoperiodic variations and allow the birth of the young at the end of the spring. With the cervidae, the differences between the periods of sexual activity and rest are much more marked in comparison with farm animals. The period of sexual activity is variable from one species to another (summer, autumn, or at the beginning of the winter) but is set for each species. The period of sexual rest translates important modifications in the gonadotrophin secretions and can notably be characterised by total aspermia in males. In the female, the state of anoestrus is deep and associated with an absence of ovulation. The length of gestation is also variable from one species to another but is set for each species.

In the cervidae originating from subtropical zones and depending on the species, the variations in sexual activity are discreet, allowing a more or less homogenous distribution of births over the year, including when the animals are led to higher latitudes.

For the cervidae species threatened by extinction, the use of reproduction biotechnology and assisted-procreation methods could on the long term help conservation programmes. The classical techniques of *in vivo* production of embryos based on multiple ovulation, artificial insemination and embryo transfer have been found to be difficult in the cervidae. In addition, current research is focussed on the development of techniques of *in vitro* production of embryos.

LOCATELLI Y., MERMILLOD P. 2005. Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. INRA Prod. Anim. 18, 3-25.

