

Effet de prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH sur la production d'embryons chez la brebis et la chèvre

G. BARIL (1), Y. COGNIE (1), J.P. BELLOC (2), M. BRIOIS (3), N. POULIN (1), A. BOUTTIER (1), J.L. POUGNARD (4), J.C. VALLET (1), B. LEBOEUF (4), B. REMY (1), J.F. BECKERS (5), P. MERMILLOD (1)

(1) INRA-UMR Physiologie de la reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly-France

(2) OVITEST, 12850 Onet le Château – France

(3) Confédération Générale de Roquefort, 12103 Millau – France

(4) INRA-UEIPC - 86480 Rouillé – France

(5) Université de Liège- 4000 Sart Tilman-Belgique

RESUME - De précédents travaux ont montré l'intérêt des prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH pour accroître la production d'embryons *in vivo* chez la brebis Lacaune. L'expérimentation sur ces prétraitements a été poursuivie, chez les ovins dans le but de simplifier le prétraitement anti-GnRH, et chez les caprins pour évaluer leur efficacité dans cette espèce.

La simplification du prétraitement anti-GnRH (Antarelix) par réduction du nombre d'injections (1,5mg, 0,5 et 0,5 mg espacés de 5 j ; n=22 vs 11 x 0,5mg / j ; n=23) n'a pas entraîné de diminution de la réponse ovulatoire à FSH par rapport au traitement de référence (11 x 0,5mg / j) mais la production d'embryons par brebis a eu tendance à diminuer (12,0 vs 8,3 ; P=0,08).

Les prétraitements avec agoniste (Decapeptyl®) et antagoniste de GnRH (Antarelix) ont été évalués chez la chèvre superovulée. Les chèvres prétraitées avec analogue de GnRH (Decapeptyl® à effet retard, 1,8mg 22j avant FSH ; n=24) ont présenté une diminution du nombre de gros follicules sur les ovaires (5,5 avant vs 1,1 après traitement ; P<0,01), sans effet sur le nombre de petits follicules et sur la réponse ovulatoire à FSH. Les taux d'œufs collectés et d'œufs fécondés ayant été significativement plus faibles qu'en l'absence de prétraitement, un faible nombre d'embryons a été obtenu par chèvre prétraitée avec Decapeptyl® [Decapeptyl® + FSH : 2,2 (n=24) vs FSH 4,7 (n=24) ; P>0,10]. Chez les chèvres prétraitées avec anti-GnRH (Antarelix 11 x 0,5mg / j avant FSH ; n=32) la présence de gros follicules a été réduite, les nombres de petits follicules et d'ovulations après traitement FSH ont été augmentés. Cependant, des taux élevés d'œufs non fécondés et d'embryons dégénérés ayant été observés, la production d'embryons *in vivo* par chèvre prétraitée a été inférieure à celle des chèvres du lot témoin [2,3 (n=12) vs 8,1(n=12) ; P<0,01]. Ce prétraitement a été évalué dans le cadre de la production d'embryons *in vitro*. Le taux d'œufs clivés *in vitro* a aussi été altéré après prétraitement Antarelix en comparaison avec le lot témoin (84% (n=20) vs 94% (n=21) ; P<0,01] mais ce taux était élevé (84%) par rapport à celui obtenu *in vivo* (29%). Si un effet néfaste du prétraitement sur la qualité des ovocytes de chèvres ne peut être exclu, l'hypothèse d'une altération du transport et ou de la survie des spermatozoïdes est plus vraisemblable.

Effect of GnRH agonist and antagonist pre-treatment on embryo production in ewes and goats

G. BARIL (1), Y. COGNIE (1), J.P. BELLOC (2), M. BRIOIS (3), N. POULIN (1), A. BOUTTIER (1), J.L. POUGNARD (4), J.C. VALLET (1), B. LEBOEUF (4), B. REMY (1), J.F. BECKERS (5), P. MERMILLOD (1)

(1) INRA-UMR Physiologie de la reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly-France

SUMMARY - In the superovulated ewe, previous studies have shown that GnRH agonist and antagonist pre-treatment improve embryo production. Consequently, an experiment on this subject was continued in order to simplify GnRH antagonist pre-treatment in the ewe, and evaluate the efficiency of this technique in the superovulated goat.

For the simplification of the pre-treatment, we compared the efficiency of the multiple low-dose (11 x 0.5mg / day) antagonist regimen with a regimen of three injections of 1.5, 0.5, and 0.5mg at 5 day intervals. The three injections regimen allowed a high ovulatory response, but a lower yield of transferable embryos (12 vs 8.3 ; P=0.08).

GnRH agonist (Decapeptyl) and antagonist (Antarelix) pre-treatments were evaluated in superovulated goats. In GnRH agonist treated goats (Decapeptyl 1.8mg 22days before FSH) follicle number >3 mm was decreased (5.5 before vs 1.1 after treatment ; P<0.01) without an effect on the number of small follicles (2-3mm) and ovulatory response. Percentages of recovered and fertilised ova were significantly lower after Decapeptyl pre-treatment than without pre-treatment. Consequently a low number of transferable embryos per Decapeptyl treated goat was obtained (Decapeptyl + FSH: 2.2 vs FSH 4.7 ; P>0.10).

In GnRH antagonist treated goats (Antarelix 11 x 0.5mg / day before FSH) a decrease in follicle number >5 mm was observed as well as an increase in small follicle number (2-3mm) and ovulatory response after FSH treatment. However, this beneficial effect on ovulatory response was cancelled by an increase in the percentage of unfertilised ova and degenerated embryos. Consequently, in Antarelix treated goats the yield of embryo production was reduced (Antarelix +FSH 2.3 vs FSH 8.1 ; P<0.01). After *in vitro* fertilisation, the cleavage rate was also lower after Antarelix pre-treatment compared to the control group (84% vs 94% ; P<0.01). However, this percentage was high (84%) as compared to the *in vivo* fertilisation rate (29%). A negative effect of Antarelix pre-treatment on goat oocyte quality is possible; nevertheless, transport and survival of spermatozoa in the genital tract are most probably affected in these conditions.

INTRODUCTION

Les faibles réponses au traitement FSH chez les femelles superovulées (<5 ovulations : 20 % des brebis Lacaune ; 10 % des chèvres Alpine et Saanen) constituent un facteur limitant de la transplantation embryonnaire (Cognié et Baril, 2002).

Chez la brebis superovulée avec FSH, le nombre d'ovulations est positivement corrélé au nombre de petits follicules de 1-2 mm et négativement affecté par la présence de gros follicules présents sur les ovaires au début de la stimulation gonadotrope (Brebion *et al.*, 1992 ; Gonzalez-Bulnes, 2002). La possibilité d'accroître le nombre de follicules recrutables avant le traitement de superovulation par inhibition temporaire de la croissance folliculaire terminale a fait l'objet de nombreux travaux chez la brebis durant ces quinze dernières années (Cognié *et al.*, 2003).

L'inhibition des sécrétions endogènes de LH et FSH par administration d'un analogue de GnRH (buséréline 40µg / j, Receptal®-Intervet) durant 2 semaines, ou d'un antagoniste de GnRH (Antarelix 0,5mg / j, Teverelix®- Europeptides) durant 10 j, permet de doubler le nombre de follicules de 1 à 2 mm avant traitement FSH, la réponse ovulatoire est augmentée de 50% et le nombre d'embryons transférables par brebis traitée (10 embryons) est doublé par rapport aux donneuses superovulées en l'absence de prétraitement (Brebion et Cognié, 1989 ; Cognié *et al.*, 2003).

L'étude sur les traitements de préparation de l'ovaire à l'induction de la superovulation a été poursuivie chez la brebis mais aussi chez la chèvre.

La durée d'inhibition des sécrétions endogènes de LH et FSH, consécutive à une injection sous-cutanée de 0,5 mg d'Antarelix étant voisine de 5 j (Cognié *et al.*, 2003), un essai de réduction du nombre d'injections d'Antarelix a été mis en place chez la brebis dans le but de faciliter l'application du traitement anti-GnRH.

Chez la chèvre, les prétraitements avec antagoniste et antagoniste de GnRH ont été testés afin d'évaluer leur efficacité sur la réponse ovulatoire et la production d'embryons dans cette espèce.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. BREBIS : COMPARAISON DE 2 REGIMES D'ADMINISTRATION D'ANTARELIX (TEVERELIX®-EUROPEPTIDES, FRANCE)

Un traitement de synchronisation de l'*oestrus* (éponge vaginale FGA 40mg-14j) a été administré à 45 brebis laitières multipares de race Lacaune. Le traitement de préparation de l'ovaire avec anti-GnRH a débuté au moment de la pose de l'éponge vaginale : 22 brebis ont reçu 11 injections quotidiennes (sc.) de 0,5mg d'Antarelix (traitement témoin, précédemment décrit par Cognié *et al.*, 2003) et 23 ont reçu 3 injections de 1,5-0,5 et 0,5mg, espacées de 5 j.

La superovulation a été induite chez toutes les brebis par l'administration de 320 µg de FSH porcine (FSH Merial-Université de Liège- Belgique) répartis en doses biquotidiennes et décroissantes durant les 4 derniers jours du traitement progestagène. L'ovulation a été induite 32h après le retrait de l'éponge vaginale par l'injection intraveineuse de 3mg de pLH. Les femelles ont été inséminées *in utero* sous contrôle endoscopique 52 h après le retrait de l'éponge et les embryons ont été récoltés par voie chirurgicale 7 j après le début de l'*oestrus*.

1.2. CHEVRE : EVALUATION DES TRAITEMENTS DE PREPARATION DE L'OVAIRE A L'INDUCTION DE LA SUPEROVULATION

1.2.1. Prétraitement agoniste de GnRH (Decapeptyl®-IPSEN-BIOTECH, France)

L'essai a été mis en place chez 48 chèvres de race Alpine réparties en 2 lots (lot témoin : FSH seule ; lot prétraité : prétraitement Décapeptyl®+ FSH) en fonction de l'état de la population folliculaire estimé par examen endoscopique des ovaires avant le début du traitement.

Pour les chèvres du lot prétraité, la préparation de l'ovaire à l'induction de la superovulation a été réalisée par l'injection (im) de 1,8mg de Decapeptyl®, 22 j avant le traitement FSH, sous forme de microsphères biodégradables qui en retardent la diffusion. Chez toutes les chèvres, la superovulation a été induite avec 320 µg de FSH porcine (FSH Merial- Université de Liège- Belgique) répartis en doses biquotidiennes et décroissantes durant les 4 derniers jours du traitement progestagène (éponge vaginale 45mg FGA-11j-Intervet). Les chèvres prétraitées ont reçu une injection (iv) de 3mg de pLH 8h après le début de l'*oestrus*, afin d'induire l'ovulation.

L'état de la population folliculaire a été estimé de nouveau le jour précédant la stimulation par FSH, par examen endoscopique des ovaires.

Les chèvres ont été inséminées *in utero* sous contrôle endoscopique 20-24h après le début de l'*oestrus* et les embryons ont été récoltés par voie chirurgicale 7 j après le début de l'*oestrus*.

1.2.2. Prétraitement antagoniste de GnRH (Antarelix)

Afin de mesurer les effets du prétraitement anti-GnRH sur l'état de la population folliculaire et la réponse ovulatoire au traitement FSH, la superovulation a été induite après traitement Antarelix chez 32 chèvres et en l'absence de prétraitement anti-GnRH chez 33 chèvres.

La répartition des chèvres entre lots a été effectuée en fonction de la population folliculaire estimée par examen endoscopique des ovaires. Les chèvres du lot prétraité ont reçu 11 injections quotidiennes de 0,5mg d'Antarelix avant induction de la superovulation avec FSH porcine [pFSH 300 µg répartis en doses biquotidiennes décroissantes durant les 4 derniers jours du traitement progestagène (éponge vaginale FGA 45mg- 11j)]. Chez ces femelles, l'ovulation a été induite par une injection (iv) de 3mg de pLH 36h après le retrait de l'éponge. Chez les chèvres du lot témoin, le traitement FSH a été réalisé au cours des 3 derniers jours du traitement progestagène (pFSH 160 µg répartis en doses biquotidiennes et décroissantes).

Cette comparaison a été poursuivie d'une part, dans le cadre de la production *in vivo* d'embryons chez 24 chèvres (lot témoin n = 12 ; lot prétraité n = 12) , d'autre part, dans le cadre de la production *in vitro* d'embryons chez 41 chèvres (lot témoin n = 21 ; lot prétraité n = 20).

Pour la production d'embryons *in vivo*, les chèvres ont été fécondées par saillie et les embryons ont été récoltés 7 jours après le début de l'*oestrus*.

Pour la production d'embryons *in vitro*, les ovocytes ont été collectés par voie chirurgicale 29 à 32h après induction de l'ovulation. La fécondation des ovocytes et la culture des embryons jusqu'au stade blastocyste ont été réalisées selon la méthode décrite par Cognié *et al.*, 2003.

2. RESULTATS

2.1. BREBIS : COMPARAISON DE 2 REGIMES D'ADMINISTRATION D'ANTARELIX

Le protocole de traitement anti-GnRH n'a pas eu d'effet sur la réponse ovulatoire au traitement FSH. En revanche, le passage de 11 à 3 injections d'Antarelix a été associé à une diminution significative des taux d'œufs collectés et d'embryons transférables ($P < 0,01$). Comparé aux brebis ayant reçu le traitement Antarelix de référence (11 injections), le nombre moyen d'embryons transférables par brebis traitée tend à être inférieur pour le lot ayant reçu seulement 3 injections ($P = 0,08$; tableau 1).

Tableau 1 : production d'embryons chez la brebis en fonction du traitement Antarelix

Traitement Antarelix	11 x 0,5 mg	1,5- 0,5- 0,5mg
Brebis	22	23
Corps jaunes ¹	20,6 ± 10,2	18,4 ± 9,5
Œufs collectés (%)	76 ^a	68 ^b
Œufs clivés (%)	90	87
Embryons transférables (%)	85 ^a	77 ^b
Embryons transférables / brebis ¹	12,0 ± 7,8 ^c	8,3 ± 5,6 ^d

a vs b : $P < 0,01$; c vs d : $P = 0,08$; ¹ : moyenne ± écart-type

2.2 CHEVRE : EVALUATION DES TRAITEMENTS DE PREPARATION DE L'OVAIRE A L'INDUCTION DE LA SUPEROVULATION

2.2.1. Prétraitement agoniste de GnRH (Decapeptyl®)

L'administration du prétraitement a entraîné une réduction du nombre de gros follicules ($P < 0,01$), qui en fin de prétraitement est inférieur à celui des chèvres du lot témoin ($P < 0,05$). En revanche, les nombres moyens de petits follicules et d'ovulations après traitement FSH n'ont pas été améliorés dans le lot Decapeptyl®. Une diminution significative des taux d'œufs collectés et clivés ($P < 0,01$) a été observée chez les chèvres prétraitées avec pour conséquence une faible production d'embryons transférables (tableau 2).

Tableau 2 : effet du traitement agoniste de GnRH (Decapeptyl®) sur l'état de la population folliculaire, la réponse ovulatoire au traitement FSH et la production d'embryons *in vivo* chez la chèvre

Lot	Témoin	Decapeptyl®	Probab.
Chèvres	24	24	
	Follicules		
Avant	2 - 3 mm	17,3 ± 12,4	15,9 ± 11,9
Decapep.	>3mm	4,9 ± 4,8	5,5 ± 5,1 ^a
Après	2 - 3 mm	16,5 ± 11,8	18,8 ± 10,4
Decapep.	>3mm	4,2 ± 3,5	1,1 ± 1,6 ^b
			NS
Corps jaunes		13,9 ± 13,0	12,0 ± 12,5
Œufs collectés (%)		65	52
Œufs clivés (%)		68	52
Embryons transférables/chèvre		4,7 ± 8,8	2,2 ± 3,5
			NS

a vs b : $P < 0,01$; NS : différence non significative

2.2.2. Prétraitement antagoniste de GnRH (Antarelix)

La modification de la population folliculaire, observée après prétraitement Antarelix (diminution du nombre de gros follicules et augmentation du nombre de petits follicules) a été associée à une augmentation significative de la réponse ovulatoire au traitement FSH par rapport aux chèvres superovulées en l'absence de prétraitement ($P < 0,001$; tableau 3).

Tableau 3 : effet du traitement antagoniste de GnRH (Antarelix) sur l'état de la population folliculaire et la réponse ovulatoire au traitement FSH chez la chèvre

Lot	Témoin	Antarelix	P
Chèvres	33	32	
	Follicules ¹		
Avant	2 - 3 mm	12,9 ± 5,4	13,0 ± 5,0 ^a
Antarelix	>5 mm	2,8 ± 1,9	3,2 ± 2,2 ^c
Après	2 - 3 mm	13,6 ± 3,8	18,0 ± 5,3 ^b
Antarelix	>5 mm	4,0 ± 2,0	1,0 ± 1,1 ^d
			$P < 0,001$
Corps jaunes		16,1 ± 8,9	24,7 ± 9,7
			$P < 0,001$

a vs b ; c vs d : $P < 0,001$; ¹ : moyenne ± écart type

Les résultats de production d'embryons *in vivo* (taux d'œufs collectés, d'œufs clivés, d'embryons transférables, nombre d'embryons par chèvre traitée) ont été considérablement diminués par rapport aux chèvres traitées avec FSH, en l'absence de traitement de préparation de l'ovaire à l'induction de la superovulation ($P < 0,001$; tableau 4).

La comparaison, réalisée dans le cadre de la production d'embryons *in vitro*, a aussi permis d'observer un taux de clivage plus faible pour les ovocytes obtenus après prétraitement Antarelix que pour ceux obtenus après traitement FSH seule ($P < 0,01$). En revanche, l'aptitude au développement *in vitro* n'a pas été modifiée par le prétraitement (tableau 4).

Tableau 4 : effet du traitement antagoniste de GnRH sur la production *in vivo* et *in vitro* d'embryons chez la chèvre

Traitement	Production <i>in vivo</i>	
	FSH	Antarelix+FSH
Chèvres	12	12
Corps jaunes ¹	16,8 ± 7,4 ^a	28,8 ± 11,6 ^b
Embryons collectés (%)	69 ^a	57 ^b
Œufs clivés (%)	94 ^a	29 ^b
Embryons transférables (%)	74 ^a	48 ^b
Embryons transférables / chèvre ¹	8,1 ± 4,6 ^a	2,3 ± 2,5 ^b
Traitement	Production <i>in vitro</i>	
	FSH	Antarelix+FSH
Chèvres	21	20
Œufs clivés (%) (Nb.ovocytes)	94 ^a (196)	84 ^b (216)
Blastocystes J7 / Œufs clivés (%) (Nb. ovocytes ²)	74 (43)	70 (47)

a vs b : $P < 0,01$; ¹ : moyenne ± écart type ; ² : les résultats de développement *in vitro* n'ont pu être analysés que pour une partie des ovocytes mis en FIV

3. DISCUSSION

La réduction du nombre d'injections d'Antarelix réalisée chez la brebis dans le but de simplifier l'application du prétraitement montre, qu'avec seulement 3 injections espacées de 5 j, la réponse ovulatoire au traitement FSH reste élevée mais la production d'embryons tend à être inférieure à celle obtenue avec le prétraitement de référence constitué de 11 injections quotidiennes.

Lors d'une expérience préliminaire, l'apparition prématurée de la décharge préovulatoire de LH endogène après le retrait de l'éponge, a été observée dans le cas du traitement 3 injections. Cette situation peut être due à une durée d'inhibition insuffisante de GnRH suite à la 3^{ème} injection d'Antarelix et peut expliquer la diminution des taux d'œufs collectés (68 % vs 76 %) et d'embryons transférables (77 % vs 85 %) observée dans le cas de ce prétraitement simplifié. Appliqué chez la chèvre de race laitière, le prétraitement antagoniste de GnRH (Antarelix) modifie l'état de la population folliculaire par inhibition de la croissance folliculaire terminale [réduction du nombre de gros follicules 1 vs 4) et augmentation du nombre de follicules de 2-3mm (13 vs 18)] avec pour conséquence une augmentation de 50 % de la réponse ovulatoire au traitement FSH (16 vs 25), comme ceci a été précédemment décrit chez la brebis (Brebion *et al.*, 1992 ; Cognié *et al.*, 2003).

Dans le cas du prétraitement agoniste de GnRH avec Decapeptyl®, la présence de gros follicules a été réduite mais en revanche les nombres de petits follicules et d'ovulations après induction de la superovulation n'ont pas été augmentés contrairement à ce qui a été observé chez la brebis (Brebion et Cognié, résultats non publiés).

Quel que soit le traitement de préparation de l'ovaire à l'induction de la superovulation [agoniste (Decapeptyl® ou antagoniste de GnRH (Antarelix)], la production d'embryons *in vivo* n'est pas améliorée chez la chèvre superovulée après prétraitement, contrairement à ce qui est observé chez la brebis (Brebion *et al.*, 1992 ; Cognié *et al.*, 2003). En effet, chez les chèvres prétraitées avec Decapeptyl® ou Antarelix, les taux d'œufs collectés et d'œufs fécondés sont significativement plus faibles que chez les chèvres superovulées en l'absence de prétraitement. De plus, dans le cas du prétraitement Antarelix, la qualité des embryons [embryons transférables / embryons clivés (%)] est significativement diminuée par rapport aux chèvres superovulées sans prétraitement (48 % vs 74 %).

Le taux de fécondation des ovocytes de chèvres *in vitro* est élevé avec ou en l'absence de prétraitement. Un effet délétère dû au prétraitement Antarelix a cependant été observé (84 % vs 94 % ; $P < 0,01$), mais la diminution du taux de clivage due au prétraitement est très faible, comparée à celle observée *in vivo*. De plus, l'aptitude au développement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste n'a pas été altérée pour les ovocytes collectés chez les chèvres prétraitées.

L'hypothèse d'une altération de la qualité des ovocytes chez les chèvres prétraitées peut être avancée pour expliquer la diminution du taux de fécondation des ovocytes *in vivo* et *in vitro*. Cependant, la faible diminution du taux de clivage *in vitro* qui est associée au prétraitement, et l'important écart en fécondation *in vivo* et fécondation *in vitro*, pour les

ovocytes de chèvres prétraitées (29 % *in vivo* vs 84 % *in vitro*) suggèrent, que le très faible taux de fécondation *in vivo* après prétraitement Antarelix est plutôt lié à une altération du transport et / ou de la survie des spermatozoïdes dans les voies génitales des chèvres prétraitées qu'à une altération de la qualité des ovocytes.

En l'absence de prétraitement, les réponses ovulatoires élevées à FSH (> 15 corps jaunes) étant en moyenne associées à une diminution du taux de fécondation chez la chèvre (Baril *et al.*, 1993), l'augmentation de la réponse ovulatoire consécutive au prétraitement peut aussi expliquer en partie, les difficultés de fécondation chez les chèvres superovulées après prétraitement.

Un effet inhibiteur des antagonistes de GnRH sur le taux d'accolement des spermatozoïdes à la zone pellucide, observé dans l'espèce humaine et chez la souris (Morales *et al.*, 1999 et 2002) pourrait aussi expliquer la diminution du taux de fécondation des ovocytes que nous avons observé lors de nos essais chez les chèvres prétraitées avec Antarelix.

CONCLUSION

Les résultats qui sont ici rapportés confirment que le rendement de la production d'embryons *in vivo* chez les brebis prétraitées avec anti-GnRH est élevé. La simplification du prétraitement Antarelix par réduction du nombre d'injections tendant à en diminuer l'efficacité, n'est pas conseillée.

Chez les caprins, l'inhibition de la croissance folliculaire terminale par administration du prétraitement anti-GnRH permet d'augmenter la réponse ovulatoire au traitement FSH. En revanche, cet effet positif est annulé par un accroissement des taux d'œufs non fécondés et d'embryons dégénérés ayant pour conséquence une faible production d'embryons *in vivo* chez les chèvres prétraitées. Contrairement aux résultats obtenus chez la brebis, les prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH ne permettent pas d'améliorer la production d'embryons *in vivo* chez la chèvre de race Alpine et Saanen, en exacerbant encore davantage les difficultés de fécondation des femelles superovulées.

Ces travaux montrent aussi, qu'un traitement ayant donné satisfaction dans une espèce donnée, doit être testé avant d'être appliqué à une autre espèce.

Baril G., Brebion P., Chesné P., 1993. Cahiers Techniques de la FAO, 115.

Brebion P., Cognié Y. 1989. 5^{ème} Réunion AETE-Lyon, 8-9 septembre 1989, Abstract 106.

Brebion P., Baril G., Cognié Y., Vallet J.C. 1992. Ann. Zootech., 41, 331-339.

Cognié Y., Baril G. 2002. INRA-Productions Animales, 15, 199-207.

Cognié Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P., 2003. Theriogenology, 59, 171-188.

Gonzalez-Bulnes A., Santiago-Moreno J., Cocero M.J., Souza C.J.H., Groome N.P., Garcia-Garcia R.M., Lopez-Sebastian A., Baird D. T., 2002. Theriogenology, 57, 1263-1272.

Morales P., Kerr B., Oliva C., Pizarro E., Kong M. 1999. Human Reproduction, 14, 2069-2074.

Morales P., Pasten C., Pizarro E. 2002. Biology of Reproduction, 67, 1360-1365.