

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER

المدرسة الوطنية للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

PHYSIOLOGIE ET MAITRISE DE LA
REPRODUCTION CHEZ L'ESPECE CAPRINE
(Etude bibliographique et essai)

Présenté par : BOUSSOUM *Ghilès*
BELAID *Noureddine*
AMZAL *Walid*

Membres du jury :

Président :	Pr. TEMIM S.	Professeur	ENSV Alger
Promoteur :	Dr. LAMARA A.	Maître de conférences B	ENSV Alger
Examineur :	Dr. BOUDJELLABA S.	Maître assistant A	ENSV Alger
Examineur :	Dr. SOUAMES S.	Maître assistant A	ENSV Alger

Année universitaire : 2012/2013.

REMERCIEMENTS

A Madame TEMIM S.,

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury. Hommage respectueux.

A Monsieur LAMARA A.,

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Pour nous avoir aidé et guidé dans l'élaboration et la conception de ce travail, qu'il veuille bien croire en notre infaillible respect et notre gratitude pour sa totale disponibilité et son incommensurable investissement.

A Monsieur BOUDJELLABA S., et Monsieur SOUAMES S.,

Maîtres Assistants à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Pour votre disponibilité et pour nous avoir fait l'honneur de faire partie de notre jury. Sincères remerciements.

A Monsieur IDRES T.,

Maître Assistant à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Pour votre aide apportée à ce travail, pour votre disponibilité et pour avoir accepté de représenter notre promoteur.

A Monsieur BOUDJENAH A.,

Directeur Général de l'Institut Technique des Elevages, Pour nous avoir ouvert les portes de son institution.

A Mademoiselle BOUZERDE S., A Monsieur ATIF MdS., et à tous le personnel de la station expérimentale polygastrique de l'ITElv qui, par leur présence quotidienne, ont fait que ce travail puisse voir le jour.

BOUSSOUM Ghiles

BELAID Noureddine

AMZAL Walid

Dédicaces

Depuis le temps que vous attendiez ce moment, le voilà arrivé, papa, maman, à l'apogée de mes études je ne peux venir me permettre de vous offrir le modeste produit de votre fruit, ce travail ne peut et ne pourra vous véhiculer toute l'émotion, la véhémence et la reconnaissance qui m'animent à votre égard.

Votre patience, votre soutien, vos encouragements votre amour et votre tendresse ne peuvent être réduits à de simples mots ou à un simple concept de mémoire de fin d'étude, cependant, mon aboutissement est avant tout le vôtre et ma joie ne peut trouver de sens que si elle émane de votre bonheur ;

Papa, maman, puissiez-vous trouver en ce modeste essai une once de mes sentiments, de mon respect et de tout mon amour ;

A mes frères **Nadir, Fares et Toufik** qui ont de tout temps été aux petits soins de leur frère, que ce travail incarne tout le respect que je vous voue ;

A ma chère **Sara**, qui par son amour a su et pu être à mes côtés lorsque le besoin se faisait ressentir ;

A tous mes amis, vous avez été pour moi une source intarissable de courage et de volonté, dans les moments les plus difficiles, votre présence à elle seule a été pour moi une brise salvatrice.

Ghiles.

LISTE DES FIGURES

LISTE DES PHOTOS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION..... 1

**CHAPITRE I : CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DE LA REPRODUCTION
CHEZ L'ESPECE CAPRINE.**

I. CARACTERISTIQUES RELATIVES AU MALE 3

I.1. Appareil génitale mâle..... 3

I.2 La puberté..... 4

I.3. La spermatogenèse..... 4

I.4. L'activité neuroendocrine..... 5

I.5. Le contrôle photopériodique..... 6

II. CARACTERISTIQUES RELATIVES A LA FEMELLE..... 7

II.1. Appareil génitale de la chèvre..... 7

II.2. La puberté..... 8

II.3. La saison sexuelle..... 8

II.4. Les facteurs de variation de la saison sexuelle..... 8

II.4.1. La latitude..... 8

II.4.2. La race..... 9

II.4.3. L'état physiologique..... 9

II.4.4. L'environnement..... 9

II.4.5. Le climat et la nutrition..... 9

II.5. Le cycle sexuel..... 9

II.5.1. La durée du cycle..... 9

II.5.2. Les différentes phases du cycle..... 10

II.5.3. La régulation du cycle..... 11

II.6. La gestation.....	12
II.7. La parturition.....	12
II.8. La lactation.....	12

CHAPITRE II : LES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION CHEZ L'ESPECE CAPRINE.

I. INSEMINATION ARTIFICIELLE.....	14
I.1. Récolte du sperme.....	14
I.1.1. Le vagin artificiel.....	14
I.1.2. L'électro-éjaculation.....	15
I.2. Contrôle de la qualité et de la quantité de la semence.....	15
I.2.1. Volume de l'éjaculat.....	15
I.2.2. concentration de l'éjaculat.....	16
I.2.3. Motilité massale.....	16
I.2.4. motilité individuelle.....	16
I.2.5. Morphologie des spermatozoïdes et le pourcentage des spermatozoïdes réellement morts.....	17
I.3. Insémination avec de la semence fraîche.....	17
I.4. Insémination avec de la semence congelée.....	17
I.5. Synchronisation des chaleurs.....	18
I.5.1. Les méthodes zootechniques.....	19
I.5.1.1. L'effet bouc.....	19
I.5.1.2. L'effet chèvre induite.....	20
I.5.1.3. Le traitement lumineux.....	20
I.5.2. les méthodes hormonales.....	22
I.5.2.1. Traitement à base de progestagènes.....	22

Tables des Matières

I.5.2.2. Traitement à base de prostaglandines.....	24
I.5.2.3. Traitement à base de mélatonine.....	24
I.6. Techniques d'insémination artificielle.....	24
II. TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LES CAPRINS.....	26
II.1. Production d'embryons <i>in vivo</i>	27
II.1.1. La superovulation.....	27
II.1.2. Collecte des embryons <i>in vivo</i>	28
II.1.2.1. Collecte chirurgicale.....	28
II.1.2.2. Collecte par endoscopie.....	30
II.2. Production d'embryons <i>in vitro</i>	31
II.2.1. Collecte d'ovocytes.....	31
II.2.2. Maturation d'ovocytes.....	32
II.2.3. Fécondation <i>in-vitro</i>	32
II.2.4. Développement <i>in-vitro</i>	33
II.3. Techniques de transfert des embryons.....	34
II.3.1. préparation des receveuses.....	34
II.3.2. Le transfert chirurgical.....	34
II.3.3. Le transfert laproscopique.....	34
III. LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS.....	35
III.1. Congélation lente.....	35
III.2. Vitrification.....	36
IV. LE SEXAGE.....	37
IV.1. Sexage de la semence.....	37
IV.2. Sexage des embryons.....	39

V. LE CLONAGE.....	39
VI. LA TRANSGENESE.....	40
CHAPITRE III : ESSAI DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LA CHEVRE.	
I. PREPARATION DES ANIMAUX.....	41
I.1. Synchronisation des chaleurs.....	41
I.2. Superovulation des donneuses	43
1.3. Saillie des donneuses	44
II. COLLECTE ET TRANSFERT DES EMBRYONS.....	45
II.1. Collecte des donneuses.....	46
II.1.1.Etape préliminaire.....	45
II.1.2.Temps opératoires.....	46
II.1.2.1.P réparation de l'opéré.....	46
II.1.2.2. Temps opératoires proprement dits.....	47
II.1.2.3. Soins postopératoires.....	49
II.2 Recherche, évaluation et tri des embryons.....	49
II.3. Transfert des embryons dans les receveuses.....	49
CONCLUSION.....	51

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RESUMES

LISTES DES FIGURES

Figure 01:	Appareil génitale du bouc, en vue latérale gauche.....	3
Figure 02:	Les différentes étapes de la spermatogénèse chez le bouc.....	4
Figure 03:	Régulation hormonale de l'activité sexuelle chez le bouc.....	6
Figure 04:	Représentation schématique de l'action du photopériodisme sur la reproduction chez le bouc.....	7
Figure 05:	Appareil génitale de la chèvre (vue dorsale).....	8
Figure 06:	Représentation schématique des différents évènements physiologiques au cours du cycle sexuel chez la chèvre.....	10
Figure 07:	Régulation hormonale du cycle ovarien de la chèvre.....	11
Figure 08:	Courbe théorique de lactation d'une chèvre.....	13
Figure 09:	Vagin artificiel (a) et prélèvement de la semence avec une femelle bout-en-train (b).....	15
Figure 10:	Protocole « <i>Jours Longs</i> » : méthode photo INRA.....	21
Figure 11:	Eponge vaginale.....	22
Figure 12:	Dispositif de mise en place.....	22
Figure 13:	CIDR pour bovins ou petits ruminants.....	22
Figure 14:	Implant sous cutanés	22
Figure 15:	Protocole de synchronisation à base de progestagène pendant 9 à 11 jours chez la chèvre « protocole standard ».....	23
Figure 16:	Insémination cervicale ou transcervivale chez la chèvre	25
Figure 17:	Insémination intra-utérine par endoscopie chez la chèvre.....	26
Figure 18:	Protocole de synchronisation/superoovulation à base de progestagènes pendant 9 jours et d'eCG.....	27
Figure 19:	Protocole de synchronisation/superoovulation à base de progestagènes pendant 9 jours et FSH	28
Figure 20:	Méthode de collecte chirurgicale des embryons	29
Figure 21:	Collecte par technique laparoscopique avec sonde de Cassou IMV.....	30
Figure 22:	Ponction folliculaire sur ovaires d'abattoirs.....	31
Figure 23:	Fécondation <i>in vitro</i>	32
Figure 24:	Vitesse de refroidissement des embryons en fonction de la technique de cryoconservation.....	37
Figure 25:	Méthode de sexage des spermatozoïdes par cytométrie en flux selon le contenu en ADN.....	38
Figure 26:	Protocole de synchronisation des chaleurs des chèvres.....	41

LISTE DES PHOTOS

Photo 01 :	Contention de la chèvre en vue d'introduire l'éponge vaginale.....	42
Photo 02 :	Nettoyage et désinfection de région vulvaire avant l'introduction de l'éponge....	42
Photo 03 :	Introduction de l'éponge vaginale.....	42
Photo 04 :	Retrait des éponges pour les receveuses.....	43
Photo 05 :	Retrait des éponges pour les donneuses.....	43
Photo 06 :	Injection en IM du stimufol®.....	44
Photo 07 :	Saillie des donneuses.....	45
Photo 08 :	Reconstitution du milieu de récolte.....	46
Photo 09 :	Bain Marie.....	46
Photo 10 :	Installation de la chèvre sur le chariot et rasage de la région abdominale.....	46
Photo 11 :	Extériorisation des ovaires et comptage des corps jaunes.....	47
Photo 12 :	Ponction de la base de la corne utérine.....	47
Photo 13 :	Ponction de la jonction uterotubaire.....	48
Photo 14 :	Lavage de la corne utérine.....	48
Photo 15 :	Suture de la peau par des points simples.....	48
Photo 16 :	Recherche d'embryons.....	49
Photo 17 :	Montage des embryons sur paillettes.....	49
Photo 18 :	Transfert des embryons sur une receveuse.....	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01:	Grille de notation de la motilité massale et de la motilité individuelle du sperme.....	16
Tableau 02:	Quantités minimales (en millions) de spermatozoïdes motiles nécessaires selon le site d'Insémination.....	25
Tableau 03:	Doses de pFSH injectées pour les donneuses durant les 3 derniers jours de traitement progestatif.....	44

LISTE DES ABREVIATIONS

- ACTH** : Adrénocorticotrophine
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- CJ** : Corps Jaune
- CIDR** : Controlled Internal Drug-Releasing device
- E₂** : Œstrogènes
- eCG** : Equin Chorionic Gonadotrophin
- EGF** : Epidermal Growth Factor
- FIV** : Fécondation *in-vitro*
- FSH** : Follicle Stimulating Hormone
- GH** : Growth Hormone
- GnRH** : Gonadotrophin Releasing Hormone
- IA** : Insemination Artificielle
- IM** : Injection en Intra musculaire
- JC** : Jour court
- JL** : Jour long
- IV** : Injection en intra veineuse
- Kg** : Kilogramme
- LH** : Luteinising hormone
- LHRH** : luteinising-hormon releasing-hormon
- MIV** : Maturation d'ovocytes *in-vitro*
- ml** : Millilitre
- OPU** : Ovum Pick Up
- P₄** : Progesterone
- PBS** : Phosphate Buffered Saline
- Pgf2 α** : Prostaglandine F2 α
- PIV** : Production d'embryons in vitro
- PMA** : Procréations Médicalement Assistées
- PMSG** : Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
- PPCN** : Phosphocaséinate
- SOF** : Synthetic Oviduct Fluid
- TCM** : Tissu Culture Medium
- TE** : Transfert Embryonnaire
- UI** : Unite International

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

L'espèce caprine représente la population des ruminants la plus répandue dans le monde. Avec un effectif de 840 millions de têtes, elle est retrouvée dans tous les continents dont l'Afrique représente 35% du cheptel mondial et ce, malgré les conditions d'élevage, traditionnelles et, généralement, difficiles (Institut d'élevage d'après FAO, 2006).

La chèvre est utilisée pour ses produits (viande, lait et produits dérivés) qui confèrent de nombreux avantages en termes de protéines animales de noble valeur biologique dont la consommation est retrouvée dans tous continents, toutes les civilisations et toutes les religions.

En Algérie, bien que la chèvre reste, dans sa majorité, exploitée à l'échelle familiale, la population caprine ne cesse d'augmenter au vue des statistiques présentées par le MADR en 2010. En effet, entre 1998 et 2010, il y a eu plus de 24 % d'augmentation de l'effectif national lequel a atteint 4,3 millions de têtes, dont 2,4 millions de chèvres (MADR, 2010). Cependant, la population caprine ne représente que 13% de la population des ruminants en Algérie loin derrière le cheptel ovin qui occupe la première place avec 80%.

Depuis récemment, de jeunes associations d'éleveurs (Tizi-Ouzou, Blida) s'organisent en vue de mieux structurer la filière caprine tout en essayant d'impliquer les autorités de l'Etat pour obtenir la meilleure assistance possible dans le but d'optimiser la production caprine et valoriser les produits de chèvre. Leur but est, entre autres, de généraliser la consommation du lait, de la viande et du fromage de chèvre et satisfaire les besoins des personnes ayant des problèmes de digestion et soucieuses de régime hypocalorique et hypocholestérolémique.

A l'instar d'autres pays ayant une avancée considérable dans l'exploitation des ressources caprines telle que la production de fromage de chèvre, en l'occurrence, la France, l'Italie, la Grèce etc., l'introduction des biotechnologies liées à la reproduction, tels que l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire, dans les élevages, a contribué à cette avancée. En effet, ces techniques offrent un moyen rapide pour augmenter numériquement les espèces ayant un potentiel génétique très recherché comme la qualité de lait, la rusticité, en plus de l'amélioration génétique d'un troupeau. Malheureusement, à notre connaissance, l'emploi de ces techniques dans nos élevages est rare voire inexistante chez les petits ruminants d'où l'intérêt de leur mise en place et de leur adaptation à notre cheptel local.

Le but de notre travail est de dresser un état des lieux sur les différentes techniques de biotechnologies liées à la reproduction appliquées à l'espèce caprine.

Pour cela, nous avons estimé nécessaire de faire, dans un premier chapitre, un rappel sur les bases physiologiques de la reproduction chez la chèvre dont la compréhension a permis la mise en place de la reproduction artificielle. Dans un second chapitre, nous communiquerons les données actuelles sur les biotechnologies de la reproduction applicables à l'espèce caprine. Pour conclure notre travail, nous décrirons les étapes d'un essai de transfert embryonnaire chez la chèvre auquel nous avons participé durant notre projet.

CHAPITRE I :

**CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES
DE LA REPRODUCTION CHEZ L'ESPECE
CAPRINE.**

INTRODUCTION

Afin de comprendre la physiologie de la reproduction de la chèvre, il nous a paru important de garder en mémoire les paroles de Bon Durant (1990) : « La chèvre n'est ni un mouton dépourvu de laine, ni une vache miniature ». Nous avons donc brièvement repris, tout au long du présent chapitre, les caractéristiques anatomo-physiologiques de l'espèce caprine.

I. CARACTERISTIQUES RELATIVES AU MALE :

I.1. Appareil génitale mâle :

En plus de la stéroïdogénèse, l'appareil reproducteur mâle a pour fonction de produire des gamètes mâles, processus appelé spermatogénèse. De plus, il dépose la semence dans les voies génitales femelles lors de l'accouplement. Il peut être subdivisé en trois parties (Barone, 2001):

- La section glandulaire, constituée par les testicules et les glandes annexes;
- La section tubulaire, formée par les voies de stockages et de transport du sperme jusqu'au sinus urogénital.
- La section urogénitale, pour sa partie pelvienne correspond à l'urètre, un conduit impair auquel sont annexées la prostate et les glandes bulbo-urétrales. A cela s'ajoutent les formations érectiles constituant le pénis. Ce dernier correspond ainsi à la partie pénienne de la section urogénitale. Cette section est commune à la fonction de reproduction et à la fonction urinaire (**figure 01**).

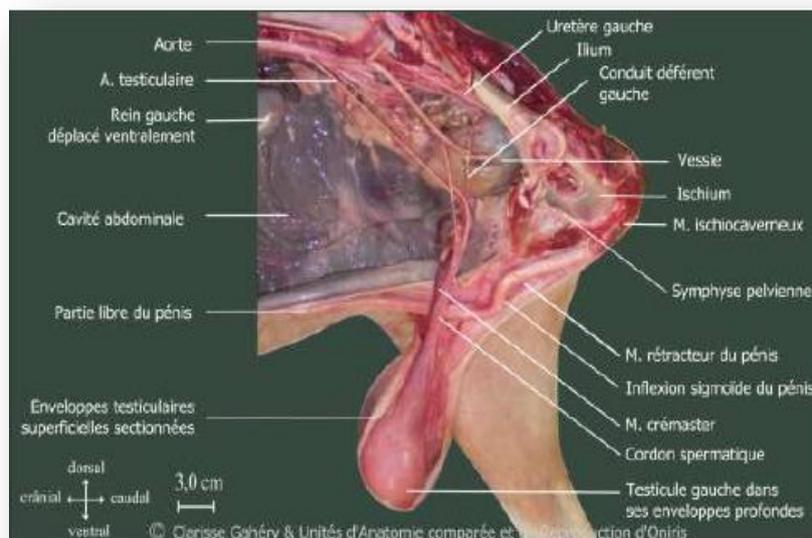


Figure 01: Appareil génitale du bouc, en vue latérale gauche.

I.2. La puberté :

La puberté du bouc est associée à une augmentation de la sécrétion de testostérone, à la spermatogenèse et au comportement sexuel. La copulation et l'éjaculation de spermatozoïdes viables peuvent se produire dès l'âge de 4 à 6 mois. A cette période, le poids du bouc représente 40 à 60 % du poids vif de l'adulte (Zarrouk *et al.*, 2001).

I.3. La spermatogenèse :

La spermatogenèse est un phénomène continu débutant à la puberté, qui aboutit à la production d'un grand nombre de spermatozoïdes à la suite d'une séquence d'événements cellulaires (divisions et différenciations cellulaires). Les tubes séminifères sont le lieu de fabrication des gamètes, où les cellules de la lignée spermatique sont associées à des cellules de soutien appelées cellules de Sertoli (Thibault et Levasseur, 2001).

Au cours de la spermatogenèse, deux évolutions essentielles se produisent :

- La réduction du nombre de chromosomes de $2n$ à n (bouc $2n=60$), au cours d'une méiose, division propre aux cellules de la lignée germinales ;
- La maturation des cellules germinales aboutissant, à partir de cellules initiales banales, à des cellules très hautement différenciées, les spermatozoïdes (Bonnes *et al.*, 2005).

Les différentes étapes de la spermatogenèse sont représentées dans la **figure 02** :

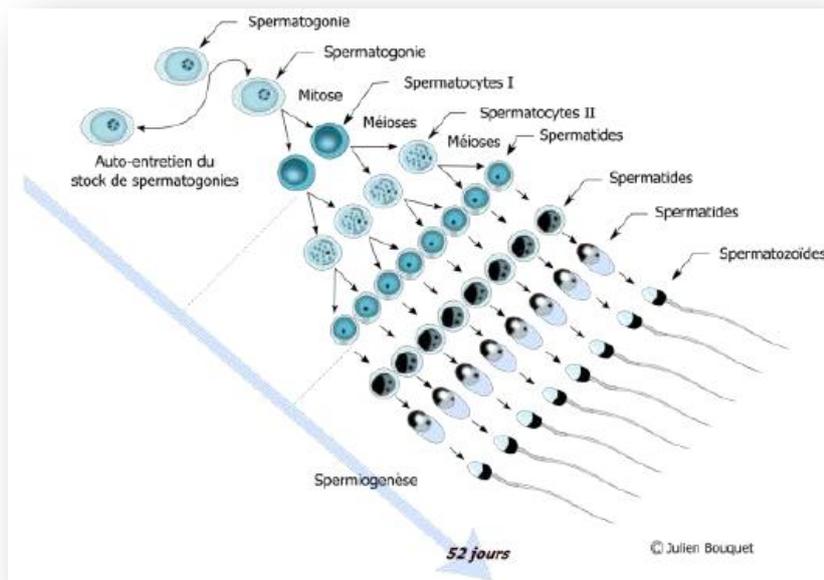


Figure 02: Les différentes étapes de la spermatogénèse chez le bouc.

La durée de la spermatogenèse, depuis la première division d'une spermatogonie souche jusqu'à la libération dans la lumière du tube séminifère des spermatozoïdes auxquels elle a donnée naissance, est constante pour une espèce donnée et elle est de 52 jours pour le bouc (Bonnes *et al.*, 2005).

Le volume de l'éjaculat est en moyenne de 0,1 à 1,5 ml avec une concentration de 2 à 6 milliards de spermatozoïdes /ml. Ce volume varie au cours de la vie de l'animal en fonction de différents facteurs : saison, âge, rythme de la collecte, etc. (Zarrouk *et al.*, 2001).

I.4. L'activité neuroendocrine :

Chez le bouc, l'activité spermatogénique est sous la dépendance de la LH et de la FSH. Celles-ci interviennent, non seulement dans la différenciation et la multiplication des cellules germinales, mais également dans la synthèse et la sécrétion de la testostérone par les cellules de Leydig du testicule. La testostérone participe au maintien de la spermatogenèse, et déclenche également le comportement sexuel et exerce un rétrocontrôle sur les hormones gonadotropes (Chemineau et Delgadillo, 1994) (**figure 03**).

La LH est libérée sous forme de pulses séparées par des périodes de repos au cours desquelles une sécrétion basale est enregistrée. Ces brusques changements de la concentration plasmatique de la LH entraînent une stimulation rapide des cellules de Leydig qui répondent en libérant la testostérone dans le sang. Chaque pulse de LH est suivi d'un pulse de testostérone dont l'amplitude varie selon la situation physiologique du mâle.

La FSH est sécrétée d'une manière complexe et semble être continue plutôt qu'épisodique (Muduli *et al.*, 1979).

L'hypophyse antérieure libère la prolactine, une hormone contrôlant l'activité des cellules de leydig. La prolactine augmente le nombre de récepteurs à LH sur ces cellules ; elle amplifie ainsi l'action de la LH sur la synthèse de testostérone (Thibault et Levasseur, 2001).

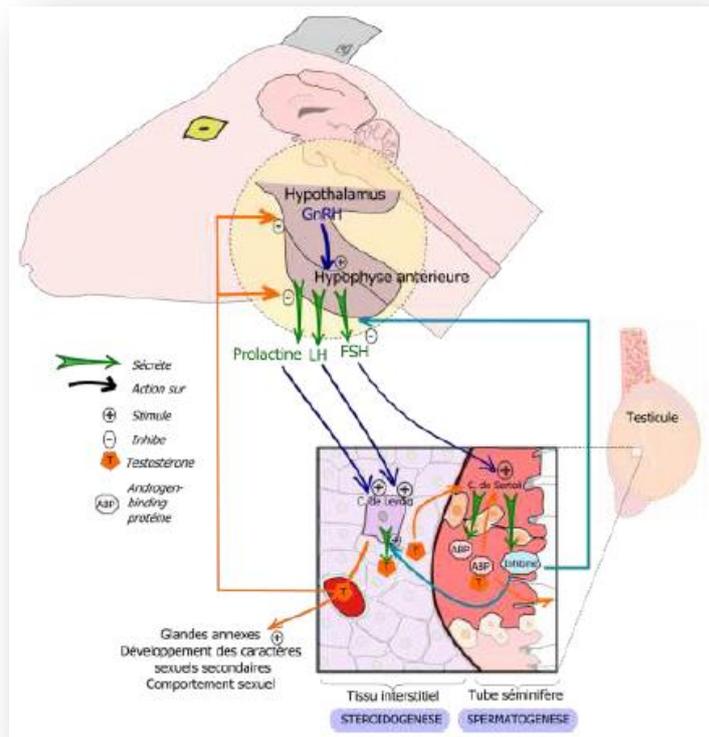


Figure 03: Régulation hormonale de l'activité sexuelle chez le bouc.

1.5. Le contrôle photopériodique :

L'activité testiculaire est modifiée sous l'influence de la durée du jour. La testostérone augmente dès la quatrième semaine après le début des jours courts et diminue au cours de la deuxième semaine après le début des jours longs. Les variations photopériodiques influencent aussi la concentration de la prolactine qui est élevée lorsque les jours sont longs (Chemineau et Delgadillo, 1994).

L'information photopériodique est traduite par la sécrétion de mélatonine, un méthoxy-indole synthétisé à partir du tryptophane et de sérotonine dans la glande pinéale du cerveau (Thibault et Levasseur, 2001). Cette hormone est sécrétée uniquement en phase obscure. Les phases nocturne transmettent un signal par le système nerveux depuis la rétine de l'œil jusqu'à la glande pinéale du cerveau et influence la sécrétion de mélatonine (Maher, 2012).

La durée de sécrétion nocturne de mélatonine est proportionnelle à la durée de la nuit et contrôle la sécrétion pulsatile de luteinising-hormon releasing-hormon (LHRH). Une durée longue quotidienne de présence de mélatonine, en d'autres termes, un signal « jours courts », stimule la libération pulsatile de LHRH après un délai de 40 à 60 jours. Les changements de sécrétion de LHRH induisent des modifications correspondantes de sécrétion de LH et, par voie de conséquence,

Caractéristiques physiologiques de la reproduction chez l'espèce caprine

une alternance entre activité et repos sexuels chez la femelles comme chez le male. Lorsque la concertation plasmatique de mélatonine est élevée, la fréquence de libération de LH augmente (Viguié, 1995).

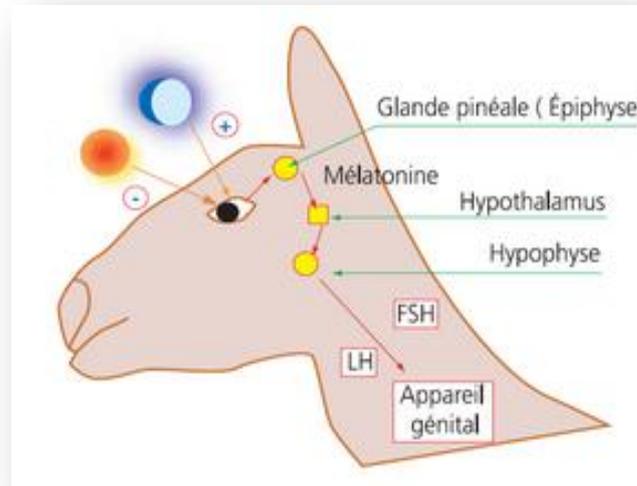


Figure 04: Représentation schématique de l'action du photopériodisme sur la reproduction chez le bouc.

II. CARACTERISTIQUES RELATIVES A LA FEMELLE :

II.1. Appareil génitale de la chèvre :

La fonction principale de l'appareil génitale femelle réside dans la production des gamètes, appelés ovocytes. Il est aussi le lieu de dépôt de la semence, le lieu de la fécondation, puis le site de la gestation. Enfin, il assure l'expulsion des fœtus.

Comme pour celui du mâle, l'appareil reproducteur femelle peut être subdivisé en trois parties (Barone, 2001) :

- La section glandulaire représentée par les ovaires,
- La section tubulaire constituée par trompes utérines, de l'utérus et du vagin,
- La section urogénitale commune aux appareils urinaire et reproducteur comporte le vestibule du vagin et la vulve.

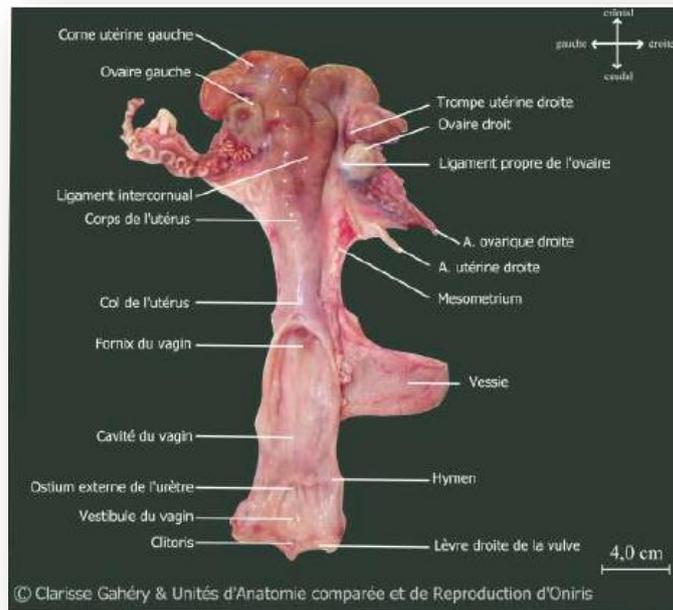


Figure 05: Appareil génitale de la chèvre (vue dorsale).

II.2. La puberté :

La puberté se définit par la période de la vie où débute l'activité des gonades et où apparaissent certains caractères sexuels secondaires (Camp *et al.*, 1983) et correspond à l'âge à la première ovulation soit chez la chèvre du 5^{ème} au 7^{ème} mois (Cadiou, 1969), et peut être décalée jusqu'à 18 mois en fonction de la saison de naissance (Colin, 2004).

II.3. La saison sexuelle :

La chèvre est une espèce polyovulante et polyoestrienne à activité sexuelle saisonnée conditionnée par le rythme nyctémérale et surtout à la diminution de la durée du jour (Corteel, 1987).

II.4. Facteurs de variation de la saison sexuelle :

L'activité sexuelle chez la chèvre est tributaire de plusieurs facteurs :

II.4.1. La latitude :

La durée de la saison sexuelle diminue en s'éloignant de l'équateur. Ainsi en zone équatoriale, les caprins se reproduisent toute l'année. Par exemple, la chèvre de Créole de Guadeloupe, race tropicale, ne marque pas de repos sexuel à l'exception d'une petite diminution pendant les mois de juin et juillet (Baril *et al.*, 1993). Au contraire, dans les régions tempérées, la chèvre exprime une activité sexuelle saisonnière marquée (Ouin, 1997).

II.4.2. La race :

Certaines races sont adaptées à leurs milieu, pas exemple, la race SAANEN préfère les climats tempérés et supportent mal le froid (Zarrouk *et al.*, 2001).

Corteel 1971 a montré une différence de saison sexuelle entre les différentes races présentes en Guadeloupe (Créole, Alpine, Barbarienne).

II.4.3. L'état physiologique :

Chez les chevrettes et les chèvres tarées, les cycles commencent et se terminent un mois plus tard que chez les races en lactation (Zarrouk *et al.*, 2001).

II.4.4. L'environnement :

L'introduction d'un bouc dans un lot de chèvres quelques semaines avant le début présumé de l'œstrus, déclenche l'apparition de chaleurs. La saison de reproduction est alors avancée (Chemineau, 1989).

De même, la présence au sein du troupeau de quelques chèvres en chaleur stimule les autres au tout début de la saison (Shelton, 1978).

II.4.5. Le climat et la nutrition :

Des températures élevées et une indisponibilité fourragère peuvent réduire l'activité sexuelle durant quelques mois. Celle-ci reprend avec l'arrivée de la saison des pluies (Zarrouk *et al.*, 2001).

II.5. Le cycle sexuel :

Le cycle sexuel est la manifestation de l'activité sexuelle cyclique des femelles, recouvre à la fois le cycle ovarien et le cycle œstral.

II.5.1. La durée du cycle :

La durée du cycle sexuel est de 21 jours en moyenne ; cependant, en début de saison sexuelle, on observe trois catégories de cycles (Baril *et al.*, 1993) :

- Des cycles courts de **5 à 7** jours (dans **14%** des cas)
- Des cycles normaux de **15 à 25** jours (dans **77%** des cas)
- Des cycles longs de **26 à 35** jours (dans **9%** des cas)

II.5.2. Les différentes phases du cycle :

Le cycle sexuel se compose de plusieurs phases.

- Le pro-œstrus se déroule sur 3 à 4 jours et correspond à la phase de croissance folliculaire (Chemineau *et al.*, 1982) ;
- L'œstrus ou chaleurs est défini comme la période où la femelle exprime un comportement sexuel. La durée varie en moyenne de 24 à 48 heures avec l'âge, la variabilité individuelle, la race, la saison, et la présence du mal (Fetet *et al.*, 2011). L'ovulation a lieu environ 36 heures après le début des chaleurs. Le moment le plus propice à la saillie ou l'IA se situe donc entre 6 et 24h après le début des chaleurs (Zarrouk *et al.*, 2001). Cette ovulation est spontanée et le plus souvent multiple ;
- Le métœstrus correspond à la phase de croissance d'un ou de plusieurs corps jaune et d'augmentation de la progestéronimie (Gressier, 1999) ;
- Le diœstrus c'est la phase de fonctionnement des corps jaune, c'est-à-dire sa phase d'état et sa régression.

L'ensemble métœstrus et diœstrus dure entre 14 et 17 jours (Zarrouk *et al.*, 2001).

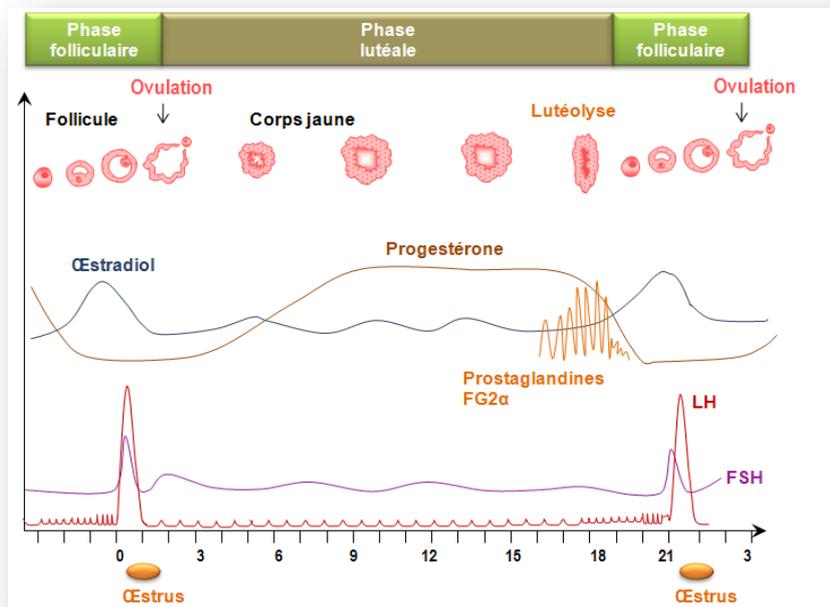


Figure 06: Représentation schématique des différents événements physiologiques au cours du cycle sexuel chez la chèvre (Fetet *et al.*, 2010).

II.5.3. La régulation du cycle sexuel :

La régulation endocrine du cycle sexuel est initiée au niveau de l'hypothalamus par la sécrétion de la gonadolibérine (GnRH) (Zarrouk *et al.*, 2001).

Pendant la phase folliculaire, avec la synthèse croissante d'œstrogène par le ou les follicules dominants, la concentration de cette dernière devient suffisamment élevée pour déclencher le comportement d'œstrus, par la suite, l'œstradiol sanguin atteint un seuil élevé lui permettant d'exercer un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette rétroaction positive induit une décharge importante de LH ; c'est le pic pré-ovulatoire (Chemineau et Delgadillo, 1994).

Le pic de LH induit l'ovulation 24 à 28 heures plus tard, celle-ci est suivie d'une seconde élévation de FSH et de l'installation du corps jaune (Driancourt *et al.*, 1991).

Le follicule se transforme en corps jaune et se met à sécréter la P₄, en partie au moins sous l'influence de la LH dont l'activité pulsatile est élevée « 4 à 7 pulses en 8 heures » jusqu'au 7^{ème} jour du cycle où la fréquence de décharge pulsatile se stabilise à environ 1,5 pulses en 8 heures. C'est le milieu de la phase lutéale (Zarrouk *et al.*, 2001).

Vers les 16^{ème} et 17^{ème} jours du cycle, la synthèse et la libération de prostaglandine F2a (PGF2a) par l'utérus non gravide induit la lutéolyse. Une nouvelle phase folliculaire début alors (Driancourt *et al.*, 1991).

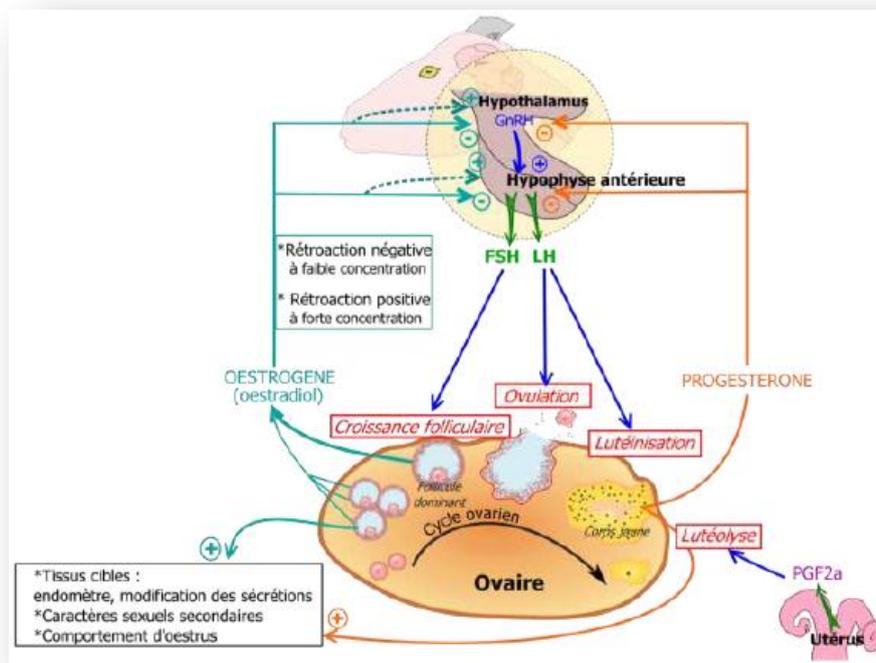


Figure 07: régulation hormonale du cycle ovarien de la chèvre.

II.6. La gestation :

La gestation chez la chèvre dure 150 jours en moyenne, cette durée peut varier jusqu'à 13 jours en fonction de la race et de l'individu (Zarrouk *et al.*, 2001).

L'établissement et le maintien de la gestation sont rendus possibles par l'interaction entre le conceptus (embryon + enveloppes), l'utérus et le corps jaune. En effet, le trophoblaste produit un signal de reconnaissance, la trophoblastine, qui permet le maintien du corps jaune en inhibant la sécrétion de la PGF2a (Drion *et al.*, 1996). Contrairement à la vache ou à la brebis, il n'y a pas de relais placentaire pour la sécrétion de progestérone, la persistance du corps jaune durant toute la durée de la gestation est donc indispensable (Zarrouk *et al.*, 2001).

La placentation chez la chèvre, comme celle des autres ruminants, est de type synépithéliochoriale. Le fœtus mesure 1cm à la fin du premier mois, les noyaux d'ossification apparaissent au cours du deuxième mois, et il mesure 9 cm au troisième mois. C'est à partir de la fin du 3ème mois que le fœtus se développe rapidement. Il pèse 1 à 1,5 kg au quatrième mois et les premiers poils apparaissent. Au cinquième mois, il est couvert de poils et mesure 32 cm. Le chevreau est plus petit chez les primipares et chez les femelles âgées (Zarrouk *et al.*, 2001).

II.7. La parturition :

Elle a eu lieu souvent au lever du jour, plus rarement la nuit. La chèvre prête à mettre bas, se couche souvent, bêle et est anxieuse. Elle s'isole dans un coin de l'étable regardant souvent son flanc (Zarrouk *et al.*, 2001).

L'expulsion des fœtus doit être effectuée en 2 à 3 heures au maximum. L'intervalle entre chaque fœtus est habituellement de l'ordre de 5 à 10 minutes (Zarrouk *et al.*, 2001).

La délivrance se produit en général une demi-heure à une heure après la naissance du dernier chevreau (Zarrouk *et al.*, 2001).

II.8. La lactation :

L'entretien de la lactation repose sur la sécrétion hypophysaire de quantités minimales de prolactine et sur la présence d'autres hormones (ACTH, l'hormone de croissance GH, œstrogènes, progestérone) (Camp *et al.*, 1983).

Le colostrum correspond au premier lait consommé par le nouveau-né, il est formé et stocké dans la glande mammaire en fin de gestation (Linzell et Peaker, 1974).

La production laitière d'une chèvre s'étale sur 10 mois. On note un pic au 40-60ème jour, puis une décroissance régulière jusqu'au tarissement. Au cours d'une saison de lactation, une chèvre produit en moyenne 600 à 700 kg de lait en 270 à 300 jours (Douteau, 1981). Les meilleures laitières produisent jusqu'à 1500 kg de lait par an ce qui représente 4 à 5 kg de lait par jour.

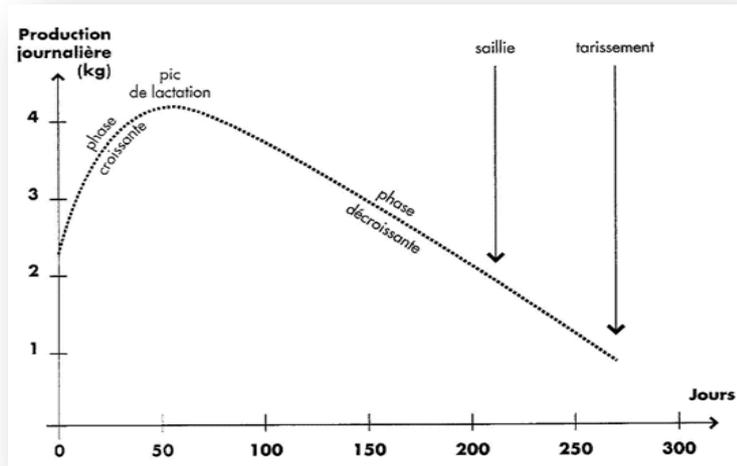


Figure 08: Courbe théorique de lactation d'une chèvre.

CHAPITRE II:

**LES BIOTECHNOLOGIES DE LA
REPRODUCTION CHEZ L'ESPECE
CAPRINE.**

INTRODUCTION

Les techniques de reproduction assistée ont été développées quelque soit l'espèce afin que les animaux génétiquement remarquables puissent engendrer une descendance plus grande que par reproduction naturelle. Ces techniques (Insémination artificielle, transfert embryonnaire *in vivo* et *in vitro* et le clonage...) permettent une accélération du progrès génétique et sont, actuellement, en plein développement chez l'espèce caprine (Baldassare et Karatzas, 2004).

I. INSEMINATION ARTIFICIELLE :

L'insémination artificielle (IA) chez l'animal s'est développée à partir de 1950 chez les bovins et depuis les années 1970 et 1980 chez les autres espèces domestiques (Ponsart *et al.*, 2004). Elle consiste à déposer dans un appareil génital femelle, à l'aide d'un instrument adapté, de la semence d'un mâle préalablement récoltée artificiellement (Soltner, 2001).

Chez les caprins, l'IA avec de la semence congelée est la plus pratiquée et la plus répandue. En effet, très peu d'éleveurs ont recours à la semence fraîche, récoltée sur les boucs à la ferme. Cependant, l'insémination animale sur chevrettes est peu réalisée à cause des résultats de fertilité non satisfaisants (Leboeuf *et al.*, 2008).

I.1. Récolte du sperme chez le bouc :

Deux techniques peuvent être utilisées pour la collecte de la semence chez le bouc : la première est la collecte à l'aide d'un vagin artificiel, la seconde est la collecte à l'aide d'un électro-éjaculateur (Gahery, 2012).

I.1.1. Le vagin artificiel :

Le manchon rempli d'eau chaude entre 42 et 45°C, le cône en caoutchouc et le tube de récolte sont maintenus à 37°C dans une étuve (**figure 09**). Pour des raisons sanitaires, chaque bouc doit avoir son vagin. Pour commencer, une femelle, bête-en-train est placée devant le bouc. Si le stimulus de la femelle ne suffit pas, la présentation d'un autre bouc est souvent efficace par effet de compétition. Quand le bouc commence le chevauchement, l'opérateur dévie le pénis et l'introduit délicatement dans le vagin artificiel. La manipulation du pénis se fait indirectement par le fourreau, sans causer de douleur. L'éjaculat est ainsi récupéré au fond du cône dans le tube (Baril *et al.*, 1993).

I.1.2. L'électro-éjaculation :

Cette méthode consiste en une neurostimulation parasympathique de la région urogénitale. On essaie de stimuler particulièrement les glandes bulbo-urétrales, la prostate et les vésicules séminales (glandes annexes). Pour cela une sonde équipée d'électrodes est introduite dans le rectum après lubrification. Les stimulations provoquent l'éjaculation spontanée et ainsi la semence est récoltée. Cette technique est peu utilisée car les volumes du sperme obtenus sont plus importants et les concentrations de spermatozoïdes plus faibles qu'avec la technique au vagin artificiel, mais sans diminution de la motilité des spermatozoïdes (Leboeuf *et al.*, 2003). De plus, cette technique est douloureuse pour les animaux (Gahery, 2012).

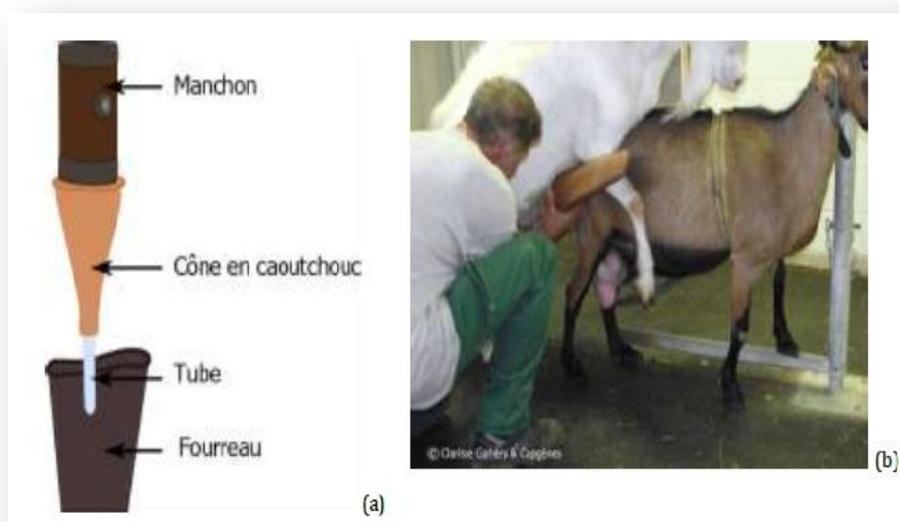


Figure 09: Vagin artificiel (a) et prélèvement de la semence avec une femelle bête-en-train (b).

I.2. Contrôle de la quantité et de la qualité de la semence :

I.2.1. Volume de l'éjaculat :

La mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par lecture directe à l'aide des graduations du tube de collecte. La lecture se fait sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat. Le volume moyen de l'éjaculat est d'environ 1 à 1.5 ml chez le bouc (Baril *et al.*, 1993).

I.2.2. Concentration de l'éjaculat :

L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure (spz/ml) en utilisant le minimum de semence possible. Elle se fait soit par comptage direct avec une cellule de Thomas, soit un comptage indirect par spectrophotométrie (Baril *et al.*, 1993).

I.2.3. Motilité massale :

S'évalue rapidement après le prélèvement. Une goutte de semence est déposée sur une lame puis observée au microscope à platine chauffante grossissement x80. En fonction de la qualité des mouvements de masse, la semence est notée sur une échelle allant de 0 (absence de mouvement) à 5 (mouvement tourbillons) (**tableau 01**; Baril *et al.*, 1993).

I.2.4. Motilité individuelle :

Une goutte de sperme, diluée à environ 100×10^6 dans du lait écrémé, est posée entre lame et lamelle, observée sous un microscope à contraste de phase, équipé d'une platine chauffante (37°C). Une note sur l'échelle de 0 (absence de mouvement de spermatozoïdes) à 5 (spermatozoïdes fléchant avec un mouvement rectiligne) est attribuée. La motilité individuelle est plus utilisée que la motilité massale pour évaluer la qualité d'une semence (**tableau 01**; Baril *et al.*, 1993).

Les deux testes précédents sont suffisamment précis pour juger ou non si les éjaculats doivent être écartés sur la base de faibles pourcentages de spermatozoïdes mobiles ou de faible motilité (Baril *et al.*, 1993).

Tableau 01: Grille de notation de la motilité massale et de la motilité individuelle du sperme (Baril *et al.*, 1993).

Note	Motilité massale	Motilité individuelle
0	Immobilité totale	Pas de déplacement des spermatozoïdes
1	Mouvements individualisés	Déplacement très lent ou pas de déplacement, tremblements du spermatozoïde, oscillations de la queue
2	Mouvements très lents	Déplacement lent, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes se déplacent plus rapidement
3	Motilité massale générale de faible amplitude	Les spermatozoïdes effectuent des déplacements curvilinéaires sans tremblement
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons	Déplacement rapide, quelques cellules avec une trajectoire rectiligne, d'autres avec une trajectoire courbe
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons	Déplacement rectiligne et rapide des spermatozoïdes

I.2.5. Morphologie des spermatozoïdes et le pourcentage de spermatozoïdes réellement morts :

Sont observés après coloration d'une goutte de sperme posée sur une lame avec un colorant éosine-nigrosine. Ainsi tout spermatozoïde coloré, en totalité ou en partie en rose ou en rouge, est considéré comme mort au moment de la coloration (Baril *et al.*, 1993).

La semence des reproducteurs potentiels ne doit pas contenir plus de 20 à 30% de spermatozoïdes morts et pas plus de 15 à 20% de spermatozoïdes anormaux (Baril *et al.*, 1993).

I.3. Insémination avec de la semence fraîche :

Pour utiliser de la semence fraîche en IA chez l'espèce caprine, la dilution directe de l'éjaculat dans un dilueur au lait de vache écrémé est possible. En revanche, la présence de jaune d'œuf dans le milieu de dilution est à proscrire. Si le dilueur en contient, il est, alors, absolument nécessaire d'effectuer un lavage de la semence avant dilution (Baril *et al.*, 1993).

Lorsque la semence est conservée à +4°C (semence fraîche) dans le lait écrémé ou le phosphocaséinate natif (PPCN), l'effet délétère du plasma séminale n'est pas observé. Bien qu'avec le milieu PPCN, le taux de spermatozoïdes après 7 jours de conservation à +4°C soit supérieur à celui obtenu dans le lait écrémé, la fertilité après IA (taux de mise bas) n'est pas différente pour les deux milieux de conservation. Elle atteint 75% pour des durées de conservations inférieures à 12 h et diminue progressivement à 63% après 28 h, puis 34% après 76 h de conservation (Leboeuf *et al.*, 2008).

I.4. Insémination avec de la semence congelée :

La congélation ou **cryoconservation** est définie comme un processus de conservation des cellules à de très basses températures, souvent dans l'azote liquide à -196°C. A cette température, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont figés (Bakhach *et al.*, 2007). Cette technique permet de disposer de la semence tout au long de l'année (Decuadro-Hansen, 2004).

La congélation de la semence de bouc provoque des dommages aux spermatozoïdes qui concernent à la fois leurs structures (membrane et flagelle) et leur état fonctionnel. Ces dommages, au cours des étapes de congélation /décongélation, ont en partie, pour origine l'effet délétère du plasma séminal sur la viabilité des spermatozoïdes conservés dans un milieu à base de lait écrémé ou contenant du jaune d'œuf (Leboeuf *et al.*, 2008). En effet, dans le plasma séminal, il existe une enzyme de type lipase sécrétée par les glandes bulbo-uréthrales, la **BUSgp60**, qui agit sur les

lipides du dilué (jaune d'œuf ou lait) pour libérer des composés toxiques (acide oléique) pour les spermatozoïdes. Afin d'éviter ces dommages, il est recommandé de séparer le plasma séminal dès que possible après la récolte de semence pour limiter son contact avec le dilueur (Chemineau *et al.*, 1999).

Pour cela, le sperme est placé dans une solution de lavage contenant du tampon phosphate, du glucose, des sels (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄) puis centrifugé pendant 15 minutes à 600g à température ambiante, après la centrifugation, le surnageant est éliminé et une nouvelle dilution-centrifugation est réalisée. Ces manipulations permettent d'éliminer les sécrétions avant une dilution dans un milieu standard. Toutes ces étapes sont réalisées à température ambiante (Route, 2007).

Une prédilution dans un dilueur lacté est ensuite effectuée. La température de la semence prédiluée est alors abaissée à + 4°C à raison de 0,2°C/min. une fois cette température obtenue, le dilueur lacté contenant l'agent cryoprotecteur (glycérol) est ajouté toutes les dix minutes en trois fractions successives. Après un temps d'équilibration permettant la diffusion du glycérol et la déshydratation cellulaire, la semence est conditionnée en paillettes, soumise à une courbe de congélation standard (25°C/min) puis conservée dans l'azote liquide à -196°C (Baril *et al.*, 1993).

I.5. Synchronisation des chaleurs :

Afin de pouvoir pratiquer des IA sur un lot de chèvres, il est nécessaire que l'œstrus de ces dernières soit regroupé (Ponsart, 2004).

La synchronisation des chaleurs ou maîtrise des cycles sexuels se définit comme étant le déclenchement du cycle œstral à un moment désiré chez une femelle déjà cyclée ou non (Chemineau *et al.*, 1991) et elle consiste à avoir un certain nombre de femelles en œstrus durant une période très courtes (Hunter, 1980).

Diverses méthodes peuvent être utilisées afin de contourner les mécanismes physiologiques naturels liés à l'activité reproductrice saisonnière de la chèvre. Ces méthodes visent à :

- Regrouper les chevretages à la date désirée ;
- Accoupler les chèvres à contre-saison sexuelle afin d'intensifier le rythme des chevretages et de produire du lait en période de moindre fourniture ;
- Optimiser la taille de la portée et accélérer le progrès génétique ;

- Mise au point de nouvelles biotechnologies de l'embryon ou de conservation du patrimoine génétique (Chemineau *et al.*, 1996).

Classiquement les méthodes de contrôle de la reproduction caprine se répartissent en deux catégories, les unes dites zootechniques et les autres hormonales :

I.5.1 Les méthodes zootechniques :

I.5.1.1. L'effet bouc :

L'effet le plus important et le plus étudié des interactions mâle et femelle est la rupture de l'anœstrus saisonnier ou **effet mâle**, également observé chez les ovins. Il a été mis en évidence dans de nombreuses races et est couramment employé pour avancer et synchroniser la reproduction (Chemineau, 1983).

L'effet mâle est un phénomène observé suite à l'introduction d'un bouc sexuellement actif dans un lot de chèvres en anœstrus, après une période de séparation totale entre mâles et femelles. L'introduction du bouc génère des stimuli perçus par les femelles anovulatoires et déclenche des ovulations chez ces dernières. Les chèvres retrouvent ainsi une cyclicité ovarienne à condition de ne pas être trop éloignées de la saison sexuelle (Chemineau, 1989).

L'exposition au bouc provoque une augmentation très rapide de l'hormone LH chez les femelles. Cet effet est multisensoriel, mais l'olfaction joue un rôle prépondérant et l'effet mâle peut être au moins partiellement mimé par la mise en présence de toison de bouc ou par l'exposition à des extraits d'odeur de bouc (Shelton, 1980).

Hamada *et al.*, (1996) ont montré dans l'hypothalamus une augmentation de l'activité électrique associée à la sécrétion de LH en réponse à l'odeur de bouc.

En réponse à l'effet mâle, 95% des chèvres présentent une première ovulation dans les 24-72h après l'introduction du bouc. Cette ovulation qui n'est pas accompagnée de comportement d'œstrus dans 80% des cas, n'est pas fécondante car dans 80% des cas, elle est suivie d'un cycle ovarien de courte durée d'environ 5 à 7 jours, puis d'une seconde ovulation. Celle-ci est accompagnée de chaleurs et d'une phase lutéale normale (Chemineau *et al.*, 2006).

Pour que l'effet mâle soit efficace, il est nécessaire que les chèvres et les boucs soient séparés totalement pendant au moins 3 semaines. L'isolement doit être complet, tant au niveau visuel qu'au niveau de l'ouïe ou de l'odeur et le nombre de boucs à l'introduction doit être suffisant : on préconise 1 mâle pour 10 à 20 femelles (Chemineau, 1989).

I.5.1.2. L'effet chèvre induite :

Il semble que les femelles en œstrus aient également un effet stimulant sur leurs congénères en anœstrus. Cet effet est, cependant, moins important que l'effet mâle, mais peut le compléter. Les premières femelles stimulées, stimuleraient à leur tour les autres femelles, peut-être via leur comportement de chevauchement accompagnant l'œstrus. Ceci expliquerait les variations observées entre différents groupes soumis à l'effet mâle. Aucune donnée n'est disponible concernant un éventuel effet des femelles sur leurs congénères pendant la saison sexuelle (Fabre-nys, 2000).

L'induction hormonale de l'œstrus chez plusieurs chèvres du troupeau suffit parfois à induire la reprise des cycles des chèvres non traitées. Il suffit de 25 à 30 % de chèvres induites pour que cet effet se manifeste, et seulement 10 à 15% si l'on fait jouer simultanément l'effet bouc (Soltner, 2001)

I.5.1.3. Le traitement lumineux :

La mise au point d'un traitement lumineux, avec ou sans utilisation de **mélatonine**, appliquée aux femelles comme aux mâles, permet dans la plupart des élevages caprins de dessaisonner la reproduction et, par conséquent, la période de production laitière (Chemineau *et al.*, 1992).

L'induction d'une activité sexuelle en contre saison nécessite de faire succéder une phase «Jours Longs» et une phase «Jours Courts». En effet, après la saison sexuelle, les animaux deviennent réfractaires à l'action stimulatrice des jours JC. Les traitements de déraisonnement sont basés sur la perception d'une transition d'une phase de JL (environ 16 h d'éclairage quotidien) vers une phase de JC (environ 8 h/j) (Chemineau *et al.*, 1992).

Le remplacement d'un JL réel est possible par l'éclairage seulement pendant la phase « photosensible » (moment privilégié de la période nocturne dont l'éclairage provoque la lecture d'un JL), située avec exactitude de 17 à 18 heures après l'aube chez les ovins, et supposée être au même moment chez les caprins. Il n'est, en effet, pas nécessaire de fournir des JL réels aux animaux ; l'éclairage de cette phase photosensible est suffisant pour aboutir à la lecture d'un JL et rétablir la sensibilisation à la mélatonine (Chemineau *et al.*, 1996).

Le principe de cette méthode dite des « flashes lumineux » consiste d'abord à fixer l'aube par un éclairage artificiel entre 6 et 9 h du matin par exemple. Entre 16 h et 20 h les animaux sont à nouveau sous une lumière artificielle. Puis, une autre phase de lumière artificielle est appliquée aux animaux entre 22 et 24 h, correspondant à la phase photosensible (**figure 10**) (Gahery, 2012).

Entre 20 h et 22 h, le bâtiment doit être complètement dans l'obscurité, autrement la photopériode serait plus longue (Gahery, 2012).

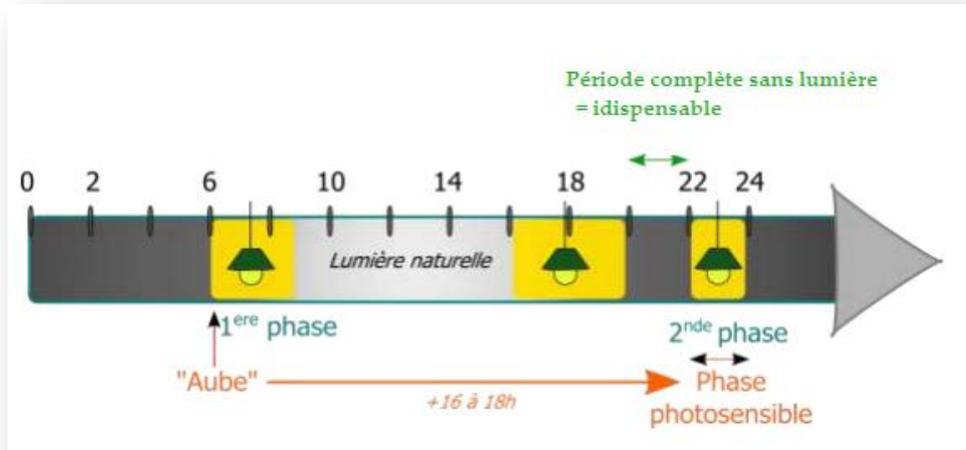


Figure 10 : Protocole « *Jours Longs* » : méthode photo INRA (Chemineau *et al.*, 1992).

L'éclairage est apporté par des tubes fluorescents ou des lampes halogènes fournissant au moins 200 lux au niveau des yeux des animaux, et la durée de ce traitement en JL doit être de 90 jours (75 jrs minimum) (Chemineau *et al.*, 1996).

Les JC peuvent être mimés par les jours naturels ou par l'insertion d'un implant sous-cutané de mélatonine. Dans le premier cas (sans mélatonine), la supplémentation de la lumière devra cesser au plus tard à mi-mars, la différence de 4 h entre le jour long artificiel de 16 h et le jour naturel de 12 h à cette période de l'année étant encore suffisante pour stimuler le système neuroendocrinien de l'animal. Au-delà de cette date, l'utilisation de mélatonine est nécessaire à moins de disposer d'un bâtiment ou il est possible d'obturer les ouvertures pendant environ 16 h par 24 h (Brice *et al.*, 2002).

L'intervalle entre fin de JL et l'introduction des boucs peut être compris entre 35 et 70 jours. Les boucs inducteurs doivent avoir reçu le même traitement que les femelles. Il faut utiliser l'effet bouc pour induire les ovulations (Chemineau *et al.*, 1992).

Chez les chèvres laitières élevées en bâtiment ouvert, l'utilisation de la succession « flash » puis mélatonine, suivie par un « effet bouc » induit une activité ovulatoire et oestrienne suffisante (entre 2 à 3 cycles successifs) pour obtenir une fertilité et une prolificité proche de ce qu'elles sont pendant la saison sexuelle normale (Chemineau *et al.*, 1992).

I.5.2. Les méthodes hormonales :

Le traitement hormonal consiste à mimer certains événements endocriniens qui contrôlent le cycle sexuel afin d'induire l'œstrus et l'ovulation à un moment prédéterminé. Ce traitement hormonal permet d'obtenir une synchronisation plus fine (au jour près) du cycle sexuel de ces animaux (Gahery, 2012). On peut trouver dans la littérature trois grands types de protocoles de synchronisation des chaleurs chez la chèvre :

I.5.2.1. Traitements à base de progestagènes :

Ce sont les protocoles les plus répandus. Le principe est d'introduire pendant un temps donné chez l'animal une source exogène de progestagènes afin de mimer la présence d'un corps jaune et ainsi, exercer un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et bloquer toute ovulation. Différents dispositifs permettent la diffusion progressive de l'hormone : des éponges vaginales (**Figure 11 et 12**), des CIDR® (Controlled Internal Drug-Releasing device) (**Figure 13**) ou des implants sous-cutanés (**Figure 14**). De plus, différents principes actifs sont retrouvés selon les spécialités :

- les **éponges vaginales** peuvent contenir de l'**acétate de fluorogestone (FGA)** ou de l'**acétate de médroxyprogestérone (MAP)**
- Les **CRDI®** contiennent de la **progestérone pure** sous forme d'un sel de silicate,
- Les **implants sous-cutanés** contiennent du **Norgetomet** (Maizel, 2006).

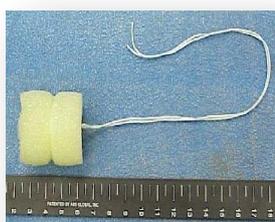


Figure 11: Eponge vaginale



Figure 12: Dispositif de mise en place.



Figure 13: CIDR pour bovins ou petits ruminants.



Figure 14: Implant sous cutané.

La dose de FGA contenue dans l'éponge vaginale est de 45 mg pour les chèvres primipares ou multipares, elle est de seulement 40 mg pour les nullipares (Corteel *et al.*, 1988), et la durée de mise en place peut varier de 5 à 21 jours selon les méthodes utilisées (Gahery, 2012).

Initialement, la durée de traitement progestatif était de 18 à 21 jours (traitement long), c'est-à-dire la durée du cycle sexuel. Afin de provoquer une lutéolyse naturelle d'un corps jaune éventuel. Le protocole permet donc de se dispenser de l'injection de prostaglandines F2alpha (Baldassarre et Karatzas, 2004).

Dans le cas du traitement court, l'injection 48 h avant le retrait de Pgf2 α ou d'un analogue (coprostol), par son action lutéolytique, permet de raccourcir la durée du traitement (11 jours au lieu de 18 à 21 jours) en activant la lyse des corps jaunes (**Figure 15**) (Maizel, 2006).

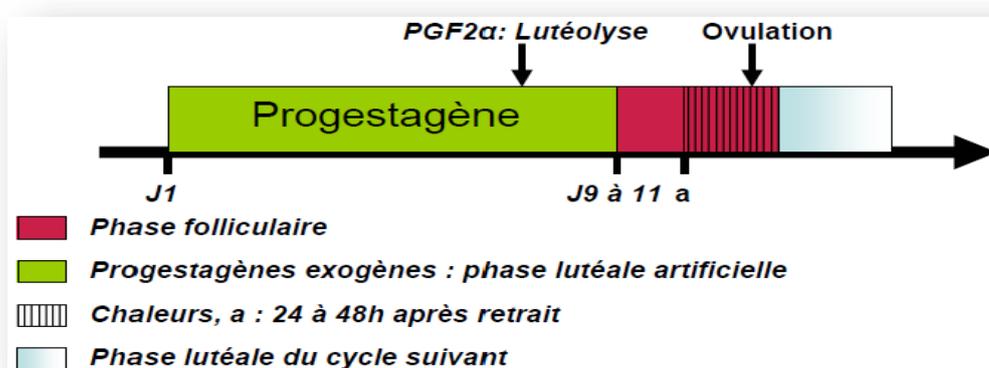


Figure 15: Protocole de synchronisation à base de progestagènes pendant 9 à 11 jours chez la chèvre « protocole standard ».

Enfin, l'arrêt du traitement progestatif et la lutéolyse provoquent une chute brutale de la progestéronémie. Ce changement hormonal provoque la levée du rétrocontrôle négatif, ainsi, la croissance d'une vague folliculaire est stimulée. Par la suite, l'œstrus puis l'ovulation sont déclenchés (Leboeuf, 1998).

Récemment, un protocole avec uniquement 5 jours de progestagènes a été développé. Ce protocole est basé sur le principe selon lequel une phase lutéale aussi courte éviterait le phénomène de dominance folliculaire. Les études récentes sur la dynamique folliculaire des chèvres ont montrées la présence de 4 vagues en moyenne par cycle. Le but est, alors, de sélectionner uniquement les follicules de la première vague. Pour ce faire, il nécessite une injection de prostaglandines au moment de l'insertion de l'éponge ou de l'implant pour remettre le cycle au départ (Maizel, 2006).

Cependant, la progestérone et la Pgf2 α ne suffisent pas à eux seuls pour induire une ovulation chez les femelles non cyclées (anœstrus saisonnier). L'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire étant trop faible, l'ovulation doit être induite par l'injection d'une hormone gonadotrope, l'eCG (equineChorionicGonadotropin), anciennement appelée PMSG. Son action FSH dominante active la croissance folliculaire et la maturation des follicules ovulatoires (Baril et Saumande, 2000).

I.5.2.2. Traitement à base de prostaglandines :

Chez la chèvre, la lutéolyse par Pgf2 α peut se faire entre le 6^{ème} et le 17^{ème} jour du cycle. La technique la plus répandue consiste en 2 injections séparées de 11 à 14 jours. Lors de la seconde injection, toutes les chèvres sont en phase lutéale avec corps jaune sensible à la Pgf2 α . Mais cette technique nécessite que les chèvres soient cyclées au début du protocole et que le protocole soit mis en place au cours de la saison de reproduction (Maizel, 2006).

I.5.2.3. Traitement à base de mélatonine :

L'utilisation d'un implant sous-cutané de mélatonine à diffusion lente permet d'obtenir une cyclicité sexuelle sur des chèvres hors saison et il permet d'avancer la saison sexuel de 1,5 mois lorsque elle est utilisée chez des races très saisonnées. Dans ces races, le traitement n'est efficace que s'il est commencé à partir de la fin mai. Il faut, en effet, une exposition suffisamment longue aux jours longs naturels pour lever l'état réfractaire aux jours courts observé dans ces races pendant l'hiver (Maizel, 2006)

I.6. Techniques d'insémination artificielle :

Afin d'améliorer les taux de réussite des IA, les chèvres Alpines et Saanen, primipares et multipares, sont inséminées une seule fois, au cours de l'œstrus induit, respectivement à 43 +/- 2 h et 45 +/- 2 h après le retrait de l'éponge vaginale. Les chèvres nullipares des 2 races sont toutes inséminées 45 +/- 2 h après le retrait de l'éponge vaginale (Corteel et Leboeuf, 1990).

Il existe trois techniques d'IA différentes sur le terrain, la technique par dépôt vaginal, la technique par dépôt cervical ou transcervical et la technique endoscopique (Maizel, 2006).

La technique vaginale ne peut être utilisée qu'avec de la semence fraîche et en quantité élevée (300 millions de spz) par rapport aux autres techniques (**tableau 02**).

Tableau 02: Quantités minimales (en millions) de spermatozoïdes motiles nécessaires selon le site d'Insémination. (Maizel, 2006).

	Type de semence		
	Fraîche	Réfrigérée	Congelée
Insémination vaginale	300	inefficace	inefficace
Insémination cervicale	100	150	180
Insémination transcervicale	60	60	60
Insémination endoscopique	20	20	20

La technique cervicale ou transcervicale (**Figure 16**) est la technique la plus répandue. Elle s'effectue avec n'importe quel type de semence en tenant compte du degré d'altération des spermatozoïdes selon le type de conservation (il faut 180 millions de spermatozoïdes congelés contre 100 millions en frais). Dans cette technique d'insémination transcervicale, l'animal est soulevé par les pattes arrière par un aide. L'inséminateur introduit un spéculum dans le vagin afin de bien visualiser le col de l'utérus grâce à une petite lampe. Ensuite le pistolet d'insémination est doucement amené au travers du col en essayant de ne pas le franchir trop brutalement. Pour s'assurer de ne pas endommager l'utérus, il ne faut pas introduire le pistolet de plus de 38 mm dans l'utérus (Maizel, 2006).

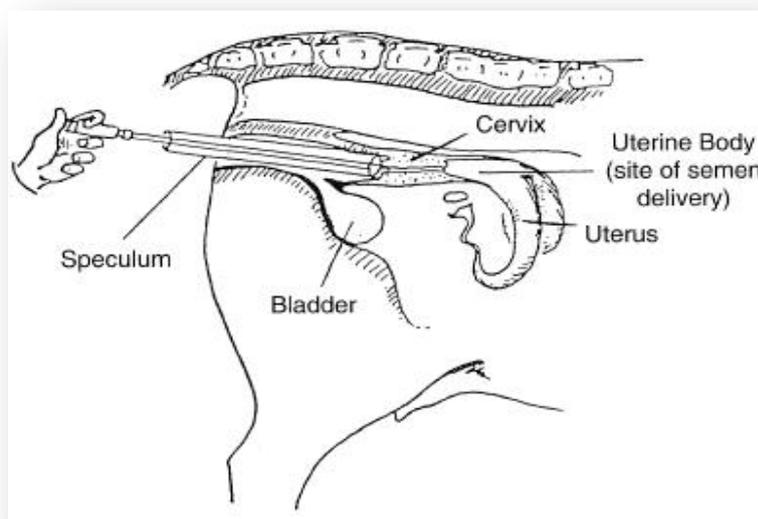


Figure 16: Insémination cervicale ou transcervicale chez la chèvre (Maizel, 2006).

La technique endoscopique d'insémination intra-utérine (**Figure 17**) est la plus efficace. Elle permet d'utiliser tous les types de semence et en quantité bien moindre (20 millions de spermatozoïdes). Cependant, elle nécessite le plus de matériel et de dextérité de la part de l'opérateur : 2 incisions abdominales sont effectuées 5 à 7 cm crânialement à la mamelle et 3 à 4 cm latéralement à la ligne blanche. La chèvre est alors placée tête en bas (avec un angle de 40- 45°) et 2 trocarts sont introduits dans les incisions afin de pouvoir utiliser le laparoscope et un pistolet d'insémination. La semence est ensuite déposée lentement dans la corne utérine du même côté que le ou les corps jaunes observés en essayant toujours de ponctionner la paroi utérine à angle droit (Maizel, 2006).

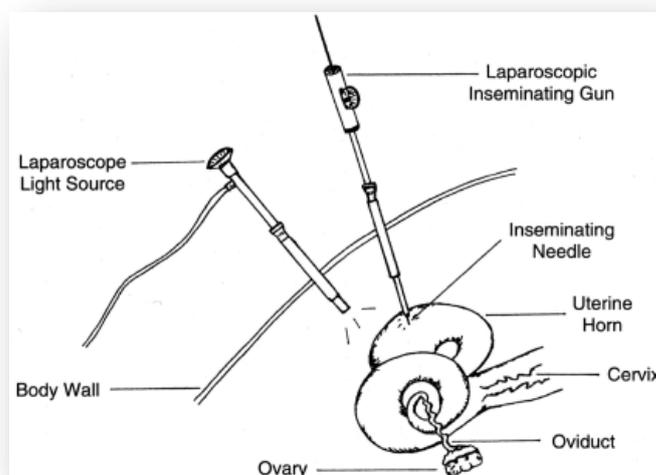


Figure 17: Insémination intra-utérine par endoscopie chez la chèvre (Maizel, 2006).

II. TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LES CAPRINS:

Moins développé que dans l'espèce bovine, le transfert embryonnaire (TE) caprin est désormais utilisé principalement pour l'échange de matériel génétique au travers des frontières, du fait de la très importante diminution du risque sanitaire lorsque les protocoles internationaux définis pour la manipulation des embryons sont respectés. Le TE est aussi utilisé dans les programmes de transgénèse caprine afin de maximiser le nombre d'embryons qui doivent être micro-injectés (Chemineau *et al.*, 1999).

Le TE consiste à provoquer la superovulation d'une donneuse, puis son insémination. Quelques jours après, on récolte les œufs fécondés ou embryons, afin d'en placer un ou plusieurs dans l'utérus des receveuses. Cette mise en place peut se faire soit sans congélation, les receveuses étant alors amenées au même stade du cycle que la donneuse, soit avec congélation, auquel cas, la synchronisation donneuse-receveuses est inutile (Soltner, 2001).

II.1. Production d'embryons *in vivo* :

La production d'un nombre important d'embryons suppose que les étapes successives de la stimulation ovarienne, de la fécondation et de la collecte de ces embryons chez une donneuse soient maîtrisées (Cognié et Baril, 2002).

II.1.1. Superovulation :

Afin de stimuler la croissance folliculaire et obtenir des ovulations multiples, il faut administrer des hormones gonadotropes à la chèvre donneuse. C'est l'activité FSH que l'on sélectionne en utilisant soit de l'eCG soit des extraits hypophysaires contenant de la FSH (Chemineau *et al.*, 1999).

L'eCG est utilisée en une seule injection de 1000 à 2000 UI, administrée par voie intramusculaire (**Figure 18**). Cependant, cette gonadotrophine présente deux inconvénients : d'une part, la forte activité LH d'eCG peut induire une activation prématurée de la méiose ovocytaire, et d'autre part, l'action prolongée d'eCG due à sa longue demi-vie provoque des modifications des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales (Cognié et Baril, 2002).

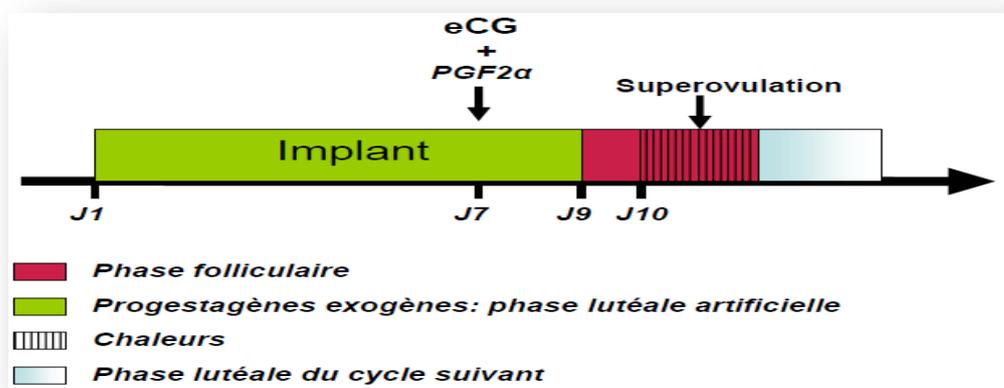


Figure 18: Protocole de synchronisation/superovulation à base de progestagènes pendant 9 jours et d'eCG.

L'utilisation des extraits hypophysaires plus au moins pure de FSH sont maintenant largement acceptés à la place de la l'eCG pour espérer atteindre des taux élevés de superovulation. Si la collecte doit être répétée sur la même femelles donneuse, de la FSH ovine (oFSH) ou caprine (cFSH) doit être utilisée au lieu de FSH porcine (pFSH), du fait de l'apparition d'anticorps contre la pFSH, qui limite la réponse superovulatoire des femelles (Chemineau *et al.*, 1999).

La oFSH peut être injectée 6 à 8 fois, à 12 heures d'intervalle pendant les trois ou quatre derniers jours du traitement progestatif (**Figure 19**), avec une dose totale de 16 à 21 mg (unités standard Armour) pour les Alpines et les Saanen. Cette dose doit être adaptée au génotype. Le choix de doses constantes ou décroissantes dépend de l'origine de la préparation (Baril, 1995).

En moyenne, le nombre d'ovulations induites par de tels traitements varie de 12 à 16 par chèvre, mais une forte variabilité existe entre femelles et un effet saisonnier a été décrit pour certaines races (Gootwine *et al.*, 1997).

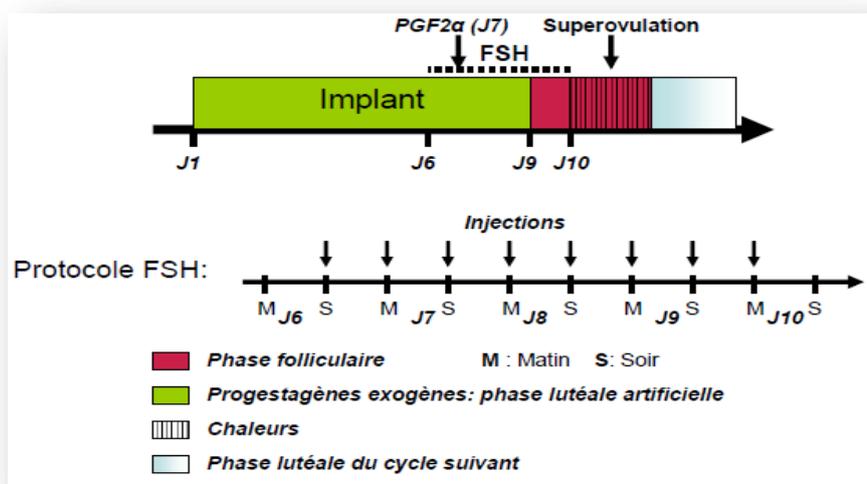


Figure 19: Protocole de synchronisation/supérovulation à base de progestagènes pendant 9 jours et FSH.

II.1.2 Collecte des embryons *in vivo*:

Après un traitement de superovulation et l'insémination des chèvres donneuses, les embryons sont récoltés entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour après le début de l'œstrus par laparotomie abdominale (collecte chirurgicale) ou sous contrôle endoscopique (collecte par endoscopie). Une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) additionnée de 10 % de sérum de veau fœtal ou de chèvre, est utilisée (40 à 50 ml/corne utérine) pour le « lavage » des cornes utérines (Baril, 1995) ;

II.1.2.1. Collecte chirurgicale :

- Préparation de l'animal :

Les chèvres sont placées à la diète hydrique un minimum de 18 à 24 heures précédant la collecte. Pour la réalisation de cet acte chirurgical, la tranquillisation de l'animal (Xylazine 0,1 mg/kg par voie intraveineuse) est nécessaire. Il est aussi possible d'anesthésier la chèvre en utilisant

un protocole xylazine (0,15 mg/kg) / kétamine (4 mg/kg) intraveineux avec relais gazeux. Si l'anesthésie gazeuse n'est pas disponible, on peut utiliser un protocole xylazine (0,22 mg/kg) / kétamine (5,5 mg/kg) en administrant la moitié de la dose par voie intraveineuse et l'autre moitié par voie intramusculaire. L'animal, une fois tranquilisé, est tondu au niveau de la paroi abdominale ventrale, crânialement à la mamelle. On le place alors en décubitus dorsal avant de le préparer de façon aseptique (Maizel, 2006).

- **Collecte des embryons :**

L'incision abdominale se fait au niveau de la ligne blanche juste en avant de la mamelle. Cette incision doit être d'une longueur suffisante pour extérioriser les 2 cornes utérines. Après vérification des ovaires (présence de multiples corps jaunes), une corne utérine est ponctionnée juste après la bifurcation et on y introduit une sonde de Foley pédiatrique. Le ballonnet de cette sonde est gonflé à l'aide d'une faible quantité de milieu de collecte à 37°C afin d'obstruer l'ensemble de la base de la corne. Puis à l'aide d'un cathéter introduit au niveau de la jonction utéro-tubaire, on injecte 40 à 50 ml de milieu de collecte à 37°C que l'on récupère par la sonde de Foley (**Figure 20**). On renouvelle ensuite l'opération sur l'autre corne utérine. Après suture en deux plans par des points simples de la ligne blanche et de la peau, une antibioprophylaxie est mise en place (Maizel, 2006).

L'avantage de cette technique est l'efficacité de la collecte avec un taux d'œuf collectés de 70 à 90 %, mais ce taux diminue lorsque cette technique est répétée plusieurs fois chez la même chèvre (Baril, 1995) et la présence d'adhérences postopératoires à partir de la deuxième collecte peut compromettre tant la fertilité que la réussite des collectes ultérieures (Cognié et Baril, 2002).

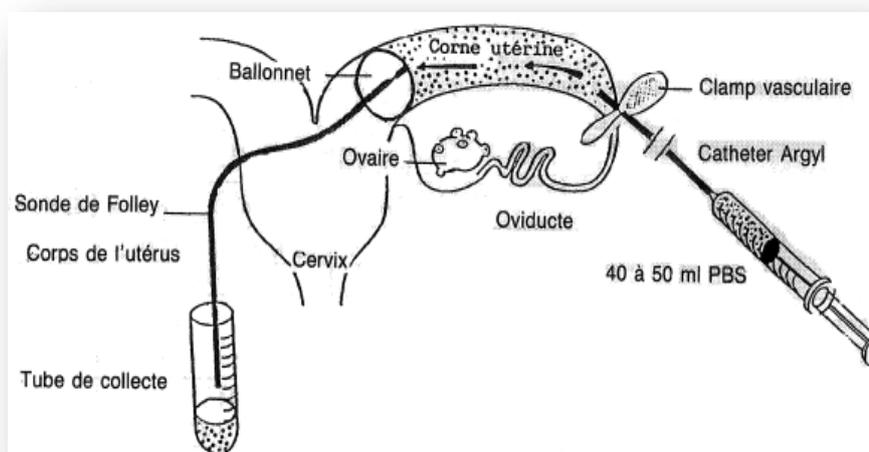


Figure 20: méthode de collecte chirurgicale des embryons.

II.1.2.2. Collecte par endoscopie :

- Préparation de l'animal :

Comme dans la technique chirurgicale, la mise à la diète hydrique de la chèvre donneuse est nécessaire. Il est possible de réaliser une collecte laparoscopique sous anesthésie générale, mais le plus souvent on utilisera une tranquillisation à base de xylazine (0,1 mg/kg) par voie intraveineuse associée à une anesthésie locale traçante (Maizel, 2006).

- Collecte des embryons :

Une canule de 7 mm de diamètre est introduite 8 à 10 cm crânialement à la mamelle et 2 à 3 cm à gauche de la ligne blanche afin de recevoir l'optique et de créer un pneumopéritoine en insufflant du CO₂. Une première canule de 5 mm est introduite à la même hauteur à droite de la ligne blanche, afin d'y introduire une pince atraumatique permettant de manipuler l'utérus et de vérifier la bonne réponse des ovaires au traitement synchronisation/superovulation. Enfin, une seconde canule de 5 mm est mise en place sur la ligne blanche 2 cm crânialement que les 2 autres, on y passera, d'abord une aiguille de 25 cm de long afin de ponctionner la paroi utérine juste en avant de la bifurcation, puis une sonde 3 voies (Sonde de Cassou IMV). Le ballonnet est alors gonflé et le cathéter flexible de la seconde voie est poussé jusqu'au tiers supérieur de la corne. On injecte 40 à 50 ml de milieu de collecte dans la corne avant de les récupérer via la 3^{ème} voie de la sonde. Afin d'éviter la remontée du milieu de collecte vers l'oviducte, on placera par précaution la pince atraumatique juste au niveau de la jonction utéro-tubaire avant de flusher (Maizel, 2006).

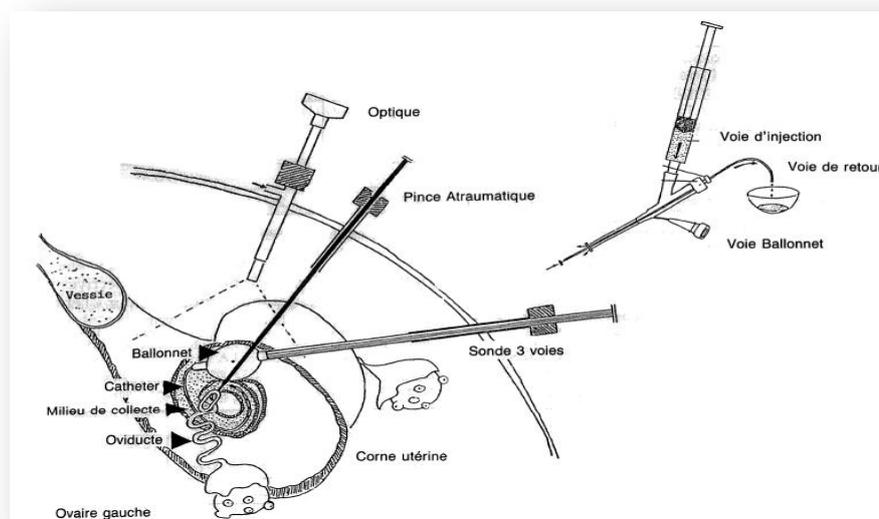


Figure 21: Collecte par technique laparoscopique avec sonde de Cassou IMV.

Le taux d'œufs récolter par cette technique est inférieure de 10 à 15 % à celui obtenu par chirurgie mais la répétition de la collecte par endoscopie ne provoque pas de diminution du taux d'œufs collectés et les adhérences post-opératoires (Baril, 1995).

II.2. Production d'embryons *in vitro*:

Cette technique consiste en la réalisation d'une fécondation *in vitro* (FIV) suivie d'un développement précoce de l'embryon *in vitro* (DIV) avant transfert dans une receveuse *in vivo*, pour cela, la collecte de gamètes mâles et femelles est nécessaire. Il faut également leur procurer l'environnement le plus proche possible des conditions naturelles de fécondation (maturation des ovocytes, capacitation des spermatozoïdes) (Chemineau *et al.*, 1999).

II.2.1. Collecte d'ovocyte :

La collecte d'ovocyte de bonne qualité est la première étape pour la production d'embryons *in vitro*. Et elle se fait soit de deux façons (Paramio, 2010):

- Par ponction folliculaire sur des ovaires d'abattoirs (**Figure 22**) :
 - o les ovocytes sont ponctionnés dans les plus gros follicules (taille supérieure ou égale à 3 mm) à l'aide d'une aiguille, puis aspirés dans un tube de collecte contenant du milieu TCM 199 (Tissu Culture Medium) (Amoah et Gelay, 1997). Cette technique permet de récupérer de 1,5 à 2,1 ovocytes par ovaire. Le découpage de l'ovaire en fine lamelle a été rapporté comme permettant la récupération d'un plus grand nombre d'ovocytes, mais les ovocytes supplémentaires provenant essentiellement de petits follicules sont moins aptes à se développer après une FIV (Chemineau *et al.*, 1999).



Figure 22 : Ponction folliculaire sur ovaires d'abattoirs.

- Sur animal vivant :
 - o elle se fait par aspirations des follicules après exposition chirurgicale des ovaires (laparotomie) ou sous contrôle laparoscopique technique appelée OvumPick Up ou OPU. Afin de récupérer un nombre élevé d'ovocytes. Les chèvres donneuses sont synchronisées et stimulées avec une injection de l'eCG 36 h avant l'OPU. Ainsi, la moyenne obtenue est de 13,5 ovocytes par chèvre (Paramio, 2010).

II.2.2. Maturation d'ovocytes (MIV) :

Pour la maturation, les ovocytes sont placés dans un milieu contenant du TCM 199, complété en cystéamine à 100 μ M et EGF (EpidermalGrowth Factor) à 1 μ g/ml). En présence d'EGf, il a été observée une amélioration significative des taux de clivage après fécondation. La cystéamine, quant à elle, modifie la cinétique de la maturation nucléaire de l'ovocyte et augmente le taux de développement des blastocystes à J8 post insémination. Elle agit par stimulation de la synthèse de glutathion (augmentation du taux intracellulaire de glutathion), molécule qui est impliquée, après fécondation, dans la protection contre le stress oxydatif et dans la décondensation de la tête du spermatozoïde et sa transformation en pronucléus mâle (Cognié *et al.*, 2004).

Les ovocytes sont laissés en maturation pendant 24 h à 38,8°C, sous une atmosphère humide, à 5% de CO₂, 5% d'O₂ et 90% de N₂ (Cognié *et al.*, 2004).

II.2.3. Fécondation *in vitro* :

La fécondation *in vitro* consiste à effectuer une co-incubation des gamètes mâles et femelles matures. Le milieu utilisé doit être compatible avec la survie des deux types de gamètes, afin d'assurer l'interaction gamétique (Cognié et Baril, 2002).

In vitro, avant cette co-incubation la capacitation du sperme est réalisée pour permettre au spermatozoïde d'exprimer sa fécondance. Après décongélation et centrifugation de la semence sur gradient Percoll pour éliminer les spermatozoïdes non mobiles, la capacitation est induite à l'aide d'agents capacitants (sérum et héparine), qui sont ajoutés à un milieu de culture propice à la survie des spermatozoïdes. Le milieu utilisé est appelé SOF (SyntheticOviductFluid). On ajoute à cela du sérum de brebis en chaleur et de l'héparine. Cette dernière est un activateur puissant de la capacitation du sperme de taureau, mais elle n'agit efficacement sur la semence de bouc qu'en présence de sérum de brebis (Cognié et Baril, 2002).

Après capacitation, les ovocytes matures sont mis en contact pendant 17 h avec les spermatozoïdes dans le milieu SOF sous huile minérale et dans une atmosphère à 5% de CO₂ maintenue à 38,5°C et en moyenne 75 à 80 % d'œufs normalement fécondés sont obtenus (Cognié et Baril, 2002).

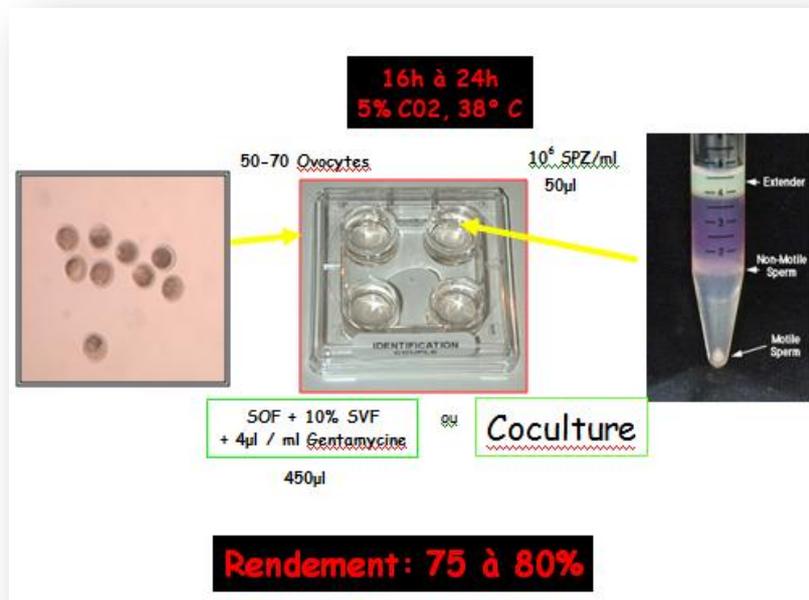


Figure 23 : Fécondation *in vitro*.

II.2.4. Développement *in vitro* (DIV) :

Vingt-quatre heures (24 h) après la FIV, les zygotes présumés sont mis en culture dans des microgouttes de SOF ensuite maintenus ainsi pendant 7 jours dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, 5% d'O₂ et 90% de N₂ (Cognié et Baril, 2002).

Ainsi les blastocystes obtenus après une semaine de culture en présence de sérum (35 à 50 % des ovocytes mis en FIV) ont un taux de développement, après transfert chez une receveuse, très proche de celui des embryons obtenus *in vivo* et donnent naissance à des jeunes normaux (Cognié et Baril, 2002).

Cependant, il a été observé que la culture des embryons en présence de sérum peut induire des poids à la naissance anormalement élevés et que cette anomalie n'existe pas lorsque la culture a lieu dans un milieu SOF dépourvu de sérum, mais supplémenté avec de l'albumine bovine et différents acides aminés (Cognié et Baril, 2002).

II.3. Techniques de transfert des embryons :

II.3.1. Préparation des receveuses :

Le traitement progestatif utilisé pour programmer l'œstrus des receveuses n'est pas différents de celui appliqué chez les donneuses. La stimulation de l'ovaire est obtenue par une injection d'eCG effectuée 48 h avant ou au moment du retrait de l'éponge. La quantité d'eCG doit être adaptée à la saison à laquelle est réalisé le traitement, à la race ainsi qu'à l'état physiologique et à la production laitière des chèvres (Baril, 1995).

II.3.2. Le transfert chirurgical :

La préparation de l'animal et son anesthésie sont les mêmes que celles décrites dans la méthode de collecte chirurgicale. L'abord utérin se fait par une laparotomie au niveau de la ligne blanche. Une fois repéré, l'utérus est manipulé de sorte à pouvoir observer les 2 ovaires et déterminer celui qui porte un corps jaunes fonctionnel. On placera les embryons dans le dernier tiers supérieur de la corne ipsilatérale au corps jaune en la ponctionnant à l'aide d'une aiguille ronde, un cathéter ou une pipette de verre. Les embryons sont contenus dans un cathéter ou pipette de verre contenant 5 à 20 µl de PBS connecté à une seringue à insuline. Une fois les embryons transférés, l'utérus est remis en position physiologique et la paroi abdominale est suturée. Cette technique fut celle de référence jusqu'au début des années 90 à partir desquelles la techniques laparoscopique s'est propagée (Maizel, 2006).

II.3.3. Le transfert laparoscopique :

La préparation de l'animal et son anesthésie sont les mêmes que celle décrites dans la méthode de collecte laparoscopique. Une fois la chèvre en décubitus dorsal avec la tête placée vers le bas, un pneumopéritoine est créé en insufflant du CO₂. Puis deux incisions sont effectuées 2 à 3 cm de part et d'autre de la ligne blanche crânialement à la mamelle. Une incision servira à l'introduction de l'optique et l'autre pour une pince atraumatique qui permet de saisir la corne ipsilatérale au corps jaune fonctionnel repéré. Pour ponctionner la paroi utérine, une aiguille de 14 gauges est insérée à travers la paroi abdominale juste crânialement à la pince atraumatique et va traverser la paroi utérine dans le dernier tiers de la corne. Un cathéter, relié à une seringue à insuline est alors inséré dans la lumière utérine et les embryons sont déposés. Les instruments sont ensuite retirés et les 2 incisions de la paroi abdominales suturées (Maizel, 2006).

III. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS :

Les premières conservations d'embryons par le froid datent des années 70 chez la vache (Wilmut et Rowson, 1973). Un refroidissement lent (0,2°C/min) en présence de DMSO (Diméthylsulfoxid) comme cryoprotecteur était utilisé, avant le stockage des embryons dans de l'azote liquide (- 196°C). Dans les années 80s se développe une nouvelle technique de cryoconservation, **la vitrification**, qui consiste à plonger très vite les embryons dans l'azote liquide (Guinot, 2005).

La cryoconservation doit permettre le ralentissement, voire l'arrêt de tout phénomène biologique. A des températures inférieures à -150°C, les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées. Cependant, à cette température, l'eau, constituant majeur de l'embryon, est sous forme solide. Le problème de la cryoconservation réside, donc, dans le fait d'atteindre des températures très basses et d'en revenir sans trop de dommages, c'est-à-dire de permettre à l'embryon, lors du réchauffement, de revenir à un état liquide viable (Guinot, 2005).

III.1. Congélation lente:

Appelée aussi congélation « à l'équilibre », consiste en l'équilibration progressive entre le cryoprotecteur et les compartiments aqueux de l'embryon. On utilise à l'heure actuelle le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO ou le propanediol comme cryoprotecteurs. Ils ont pour but d'éviter la formation de cristaux de glace intracellulaire pendant le refroidissement, de contrôler la déshydratation des cellules, de protéger les membranes (organites et cellules) et enfin d'éviter le phénomène de recristallisation lors du réchauffement de l'embryons avant le transfert dans une receveuse. On les utilise à la concentration de 10% (soit 1 à 1,5 M). L'ajout de ces cryoprotecteurs se fait, généralement, en une étape, mais il peut se faire en plusieurs étapes à l'aide de bains à concentrations croissantes de cryoprotecteurs (pour éviter les chocs osmotiques important). Les embryons sont ensuite conditionnés en paillettes de 0,25 ml (Guinot, 2005).

La congélation des paillettes se fait par paliers successifs de refroidissement selon un protocole précis qui nécessite un appareil de congélation programmable afin de bien respecter ces différents paliers (**Figure 24**) (Guinot, 2005).

La température est tout d'abord descendue jusqu'à -7°C, à raison de 1 à 3°C/min. Une fois à -7°C, les paillettes sont placées dans l'appareil de congélation et maintenues à cette température pendant au moins 5 minutes. Après cette attente, la cristallisation est induite par refroidissement

localisé par préhension de la paillette à l'aide d'une pince préalablement refroidie dans l'azote. La température est ensuite abaissée de façon linéaire jusqu'à -30°C à raison de 0,1 à 0,3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ pour pouvoir contrôler la déshydratation des embryons. Les paillettes sont ensuite immergées dans de l'azote liquide à 196°C (Guinot, 2005).

Lors de la décongélation, les paillettes sont plongées dans un bain-marie entre 22 et 37°C . Les cryoprotecteurs sont éliminés par incubation des embryons dans des bains successifs de concentrations décroissantes en cryoprotecteurs, couplés ou non d'un gradient décroissant de saccharose. Les embryons sont alors prêts à être transférés dans une receveuse (Guinot, 2005).

III.2. Vitrification :

Elle a été mise au point chez les petits ruminants afin d'essayer de limiter le coût de la transplantation embryonnaire qui représente un facteur limitant chez ces espèces par rapport à la valeur de l'animal (Thibier, 2000). Cette technique est maintenant la plus utilisée chez les petits ruminants. Elle consiste à plonger très rapidement les embryons dans l'azote liquide. Contrairement à la méthode précédente, c'est une technique de « non équilibre ». Elle permet d'éviter au maximum la formation de cristaux de glace au cours du refroidissement par transformation de la phase liquide du cytoplasme cellulaire en phase solide amorphe, ou état « vitreux » (Guinot, 2005).

Ceci est possible en utilisant des concentrations très élevées en cryoprotecteurs (6 à 7,5 M), induisant une très forte viscosité du milieu, et en appliquant une vitesse de refroidissement et réchauffement très rapide. Les embryons sont déposés dans différents bains à concentration croissante en cryoprotecteurs (ex : 1,5, 4 puis 7,5 M avec 5 min dans les deux premiers bains et seulement 30 secondes dans le dernier), afin de limiter les chocs osmotiques liés aux très fortes concentrations en cryoprotecteurs (Guinot, 2005).

Les embryons sont ensuite conditionnés en paillettes, avec des colonnes de dilution contenant des sucres non perméables (saccharose, galactose ...) de part et d'autre de l'embryon. La paillette est alors immédiatement plongée dans l'azote liquide, refroidissement de l'ordre de $2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ lors de vitrification traditionnelle (Guinot, 2005).

On a la possibilité d'utiliser les méthodes de vitrification rapide et ultra rapide (OPS : Open PulledStraw), pour lesquelles la vitesse de refroidissement peut atteindre les $20\ 000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié et à la faible épaisseur des parois de paillettes dans lesquels les embryons montent par capillarité (Guinot, 2005).

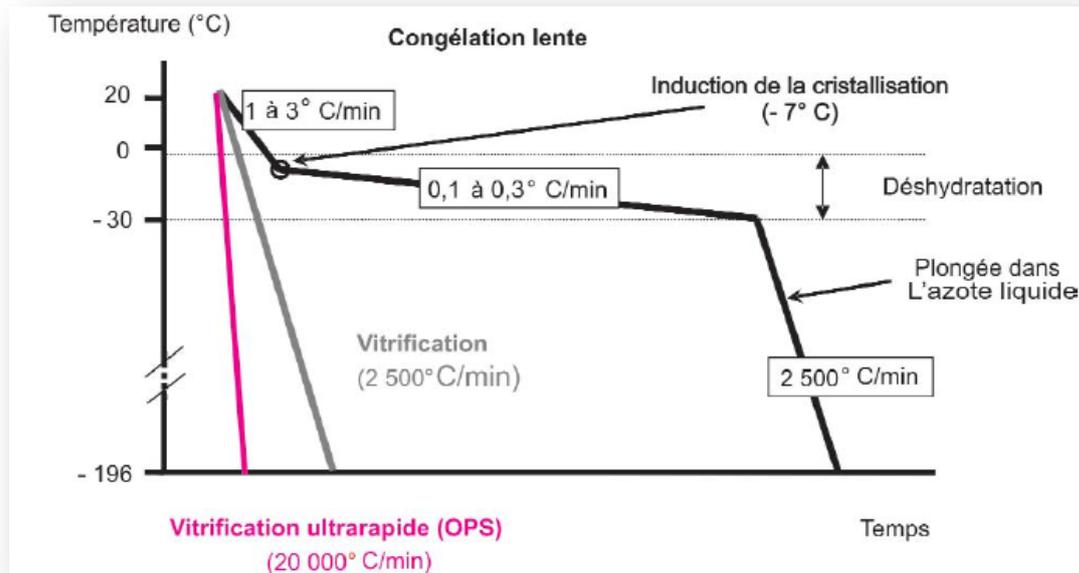


Figure 24: Vitesse de refroidissement des embryons en fonction de la technique de cryoconservation (Guinot, 2005).

Au dégel, comme pour la congélation lente, les paillettes sont placées dans un bain-marie à 25-30°C. Le contenu de la paillette est vidé et les cryoprotecteurs sont éliminés par diffusion passive, comme pour la congélation lente, grâce à la présence de sucres qui augmentent la pression osmotique du milieu extracellulaire. Les embryons sont ensuite rincés et transférés dans une femelle receveuse (Guinot, 2005).

IV. LE SEXAGE :

IV.1. Sexage de la semence :

Le sexage de la semence se base chez les espèces domestiques sur la séparation des spermatozoïdes X ou Y par cytométrie en flux en fonction de leur contenu en ADN. En effet le chromosome X ayant une taille supérieure à celle du chromosome Y, le contenu en ADN des spermatozoïdes X est donc supérieur à celui des spermatozoïdes Y. il est possible de quantifier le contenu en ADN grâce à l'utilisation d'un marqueur fluorescent : le Hoecht 33342. Celui-ci, lorsqu'il est lié à l'ADN et excité par une lumière ultra-violette, émet une fluorescence bleue. L'intensité de fluorescence émise par un spermatozoïde marqué au Hoechst et excité par un faisceau UV est directement proportionnelle à son contenu en ADN (Druart et Ribeiro Bento DOS Santos, 2004).

La cytométrie en flux permet d'analyser individuellement plusieurs milliers de cellules par seconde. Ainsi, la quantité de fluorescence émise par chaque spermatozoïde traversant le faisceau laser est mesurée et permet d'identifier les spermatozoïdes X et Y. Du fait de la forme asymétrique des spermatozoïdes, leur orientation lors de passage au travers du faisceau laser conditionne la qualité de la mesure de l'intensité de fluorescence. Seuls les spermatozoïdes correctement orientés pourront être triés. C'est pourquoi une buse d'injection, conçue pour orienter correctement les gamètes, permet de trier 70% des spermatozoïdes contre 25% avec une buse conventionnelle (Druart et Ribeiro Bento DOS Santos, 2004).

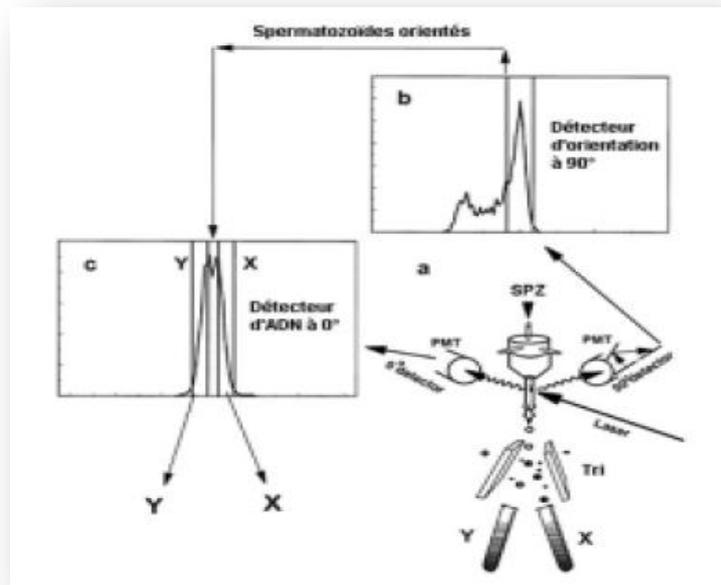


Figure 25: méthode de sexage des spermatozoïdes par cytométrie en flux selon le contenu en ADN.

- A. Les spermatozoïdes sont introduits sous pression dans la buse d'orientation des spermatozoïdes.*
- B. Après excitation par un laser UV, la fluorescence des spermatozoïdes est mesurée par un photomultiplicateur (PMA) placé à 90° par rapport au laser. La population de spermatozoïdes la plus fluorescente correspond aux spermatozoïdes bien orientés par rapport au laser.*
- C. La fluorescence des spermatozoïdes bien orientés identifiés par le PMT à 90° (b) est simultanément mesurée par le PMT situé dans l'axe du laser (0°). Les populations de spermatozoïdes X et Y sont alors identifiés et triées par la migration du flux de gouttes chargées vers les électrodes.*

Cette technique s'est révélée être efficace pour trier les spermatozoïdes de la plupart des espèces domestiques. Une pureté de 85-95 % peut être obtenue actuellement à un taux d'environ 15 millions de spermatozoïdes par heure (Druart et Ribeiro Bento DOS Santos, 2004).

IV.2. Sexage des embryons :

Afin de déterminer le sexe d'un embryon, il faut pouvoir détecter des séquences d'ADN spécifiques du mâle ou de la femelle. Pour cela une biopsie de 5 à 10 cellules est réalisée sur un embryon préimplantatoire par aspiration ou microsection. Le sexage de la biopsie est déterminé par extraction de l'ADN de la biopsie, co-amplification d'une séquence spécifique de l'ADN mâle et d'une séquence autosomale par PCR, détection de l'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose et interprétation des résultats : deux bandes pour un mâle (bande correspondant à l'amplification de séquence mâle et de la séquence autosomale), une bande pour une femelle (séquence autosomale). Cette technique de sexage est efficace à 96%, ce qui revient à dire que 96% des embryons biopsiés sont sexés avec précision (Lacze *et al.*, 2008).

La technique est actuellement utilisée pour les embryons bovins de haute valeur génétique, mais le coût dissuasif de produit obtenu dans l'espèce caprine limite l'utilisation de cette technique (Congié, 1999).

V. LE CLONAGE :

Cloner signifie reproduire à l'identique, en plusieurs exemplaires. Le clonage chez les mammifères a d'abord été réalisé par une simple division d'un embryon à un stade précoce de son développement. Ainsi, la production de deux individus génétiquement identiques est facilement réalisable après bissection symétrique et transfert des 2 demi-embryons chez une receveuse synchronisée. Actuellement, cette technique est utilisée pour répondre aux demandes en expérimentation animale nécessitant des jumeaux monozygotiques (Cognié et Baril, 2002).

Aujourd'hui, la technique utilisée pour produire des animaux clonés est le « transfert nucléaire ». Cette technique consiste en la fusion de la cellule donneuse de noyau avec un ovocyte mûr et préalablement énucléé par micromanipulation (Vignon *et al.*, 2008).

Il existe 3 origines possibles pour les cellules donneuses de noyau,

- La cellule embryonnaire (préimplantatoire),
- La cellule fœtale,
- La cellule adulte ou somatique (Colleau *et al.*, 1998).

A l'heure actuelle la technique de clonage somatique est utilisée pour la multiplication de chèvres transgéniques produisant une protéine d'intérêt dans leur lait (Congié et Baril, 2002).

VI. LA TRANSGENESE :

La transgénèse consiste à ajouter, remplacer ou inactiver un gène particulier. Cette technique permet des progrès considérables dans la connaissance du fonctionnement des gènes et des mécanismes qui gouvernent les fonctions biologiques. Ses applications potentielles pour produire des médicaments, des vaccins, des protéines alimentaires ou en amélioration génétique sont très vastes, mais encore limitées en raison de son coût et de la difficulté de sa mise en œuvre (Houdebine, 1998).

Actuellement, chez la chèvre, seule la transgénèse par addition de gènes est au point. Il est possible d'incorporer une séquence génétique d'intérêt dans le matériel génétique existant d'un embryon. Cette manipulation permettra l'expression de ce gène d'intérêt qui s'exprimera phénotypiquement par la production d'une protéine voulue.

La technique de transfert de gènes la plus utilisée est la micro-injection directe du gène étranger au stade 2 pronoyaux des embryons (Houdebine, 1998). De plus, l'obtention de chèvres transgéniques peut également se faire par clonage de cellules rendues transgéniques : la chèvre obtenue est alors totalement transgénique, à la différence des animaux obtenus après micro-injection qui ne sont que mosaïques. On peut donc être certain que le gène d'intérêt sera présent dans la mamelle des chèvres transgéniques obtenues par clonage, alors que ce n'est qu'une probabilité après micro-injection. La production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique dans le lait de chèvre est aujourd'hui une réalité. Elle peut se faire grâce à l'incorporation d'un gène hybride contenant un promoteur d'une protéine du lait et la région codant pour la protéine voulue (Baldassarre et Kratzas, 2004).

CHAPITRE III :

**ESSAI DE TRANSFERT
EMBRYONNAIRE CHEZ LA
CHEVRE**

INTRODUCTION :

Tout au long de notre travail, nous nous sommes proposés de traiter les biotechnologies liées à la reproduction chez les caprins, pour ce faire, nous avons repris les rappels anatomo-physiologiques majeurs nécessaire à connaître pour une compréhension optimale des techniques décrites.

Durant la réalisation de notre travail, nous avons eu l'opportunité de prendre part à une partie d'un projet de recherche doctorale qui avait pour thématique l'application de l'une des biotechnologies de la reproduction chez les caprins, à savoir, le transfert embryonnaire.

Le projet s'est tenu au niveau de l'institut technique des élevages (ITElv) de Baba-Ali sur une période s'étalant du 23 avril 2013 au 18 mai 2013 et a comporté 2 phases distinctes mais d'égale importance, la préparation des animaux et la procédure de transfert proprement dite.

I. PREPARATION DES ANIMAUX :

Au total, 20 chèvres pubères et en bonne santé ont été présélectionnées en vue de leur introduction dans le programme de transfert. Etant restées au contact des boucs durant une longue période, nous n'étions pas sûrs quant à leur état gestationnel, c'est pourquoi nous avons procédé à un examen échographique systématique pour toutes les candidates.

Dix des vingt chèvres présélectionnées ont été retenues pour l'essai, 8 se sont vues préparées afin de servir de receveuses d'embryons, ces derniers étant produit par les 2 donneuses préalablement superovulées.

I.1.Synchronisation des chaleurs :

Le protocole utilisé pour la synchronisation des chaleurs des chèvres est un protocole court à base de progestagènes. Il consistait en la mise en place d'éponges vaginales imprégnées de 40mg d'Acetate de Fluorogeston (FGA), comme décrit par le fabricant (**Figure 26**):

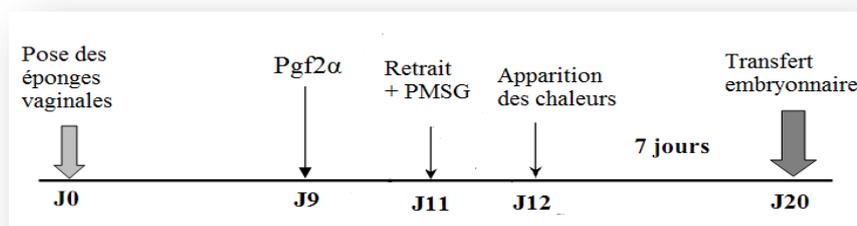


Figure 26: Protocole de synchronisation des chaleurs des chèvres.

-J₀ : *Pose des éponges vaginales* : L'introduction de l'éponge est faite à l'aide d'un applicateur adapté pour petits ruminants (mandrin et poussoir), ce dernier est préalablement désinfecté entre chaque utilisation en le plongeant dans une solution antiseptique de Permanganates de Potassium.

Après contention de l'animal, la vulve est nettoyée avec de l'eau et désinfectée à l'aide d'une solution antiseptique. L'éponge placée dans l'applicateur est introduite après lubrification de ce dernier tout en écartant les lèvres vulvaires afin de faciliter son introduction. Le poussoir est maintenu en place tandis que le mandrin est délicatement retiré de 2 à 3 cm afin de permettre la mise en place de l'éponge sans risquer de léser la muqueuse vaginale (photos 01, 02 et 03).



Photo 01 : Contention de la chèvre en vue d'introduire l'éponge vaginale.
(cliché personnel)



Photo 02 : Nettoyage et désinfection de la région vulvaire avant l'introduction de l'éponge.
(Cliché personnel)



Photo 03 : Introduction de l'éponge vaginale. (Cliché personnel)

-J₉ : Injection de la Pgf2 α (Estrumat ®) : Une injection en IM à raison de 0,5 ml a été réalisée pour chacune des chèvres (receveuses et donneuses).

-J₁₁ : Retrait des éponges et injection de la PMSG (Folligon ®) : Pour les receveuses, le retrait a été associé à une injection de 2,5 ml (500 UI) de PMSG et a été réalisé 12h avant les donneuses, pour ces dernières l'injection n'a été pas indispensable vu qu'elles avaient reçu un traitement de superovulation.



Photo 04 : Retrait des éponges pour les receveuses. (Cliché personnel)



Photo 05 : Retrait des éponges pour les donneuses. (Cliché personnel)

I.2. Superovulation des donneuses :

La mise en place d'un chantier de transfert embryonnaire ne peut se faire sur une prolificité naturelle des femelles qui, au mieux, peuvent ovuler de 2 ou 3 ovocytes au maximum. C'est pour cela que tout les protocoles ayant attrait au TE comprennent une superovulation préalable des donneuses afin d'optimiser les chances de pouvoir récolter un nombre suffisant d'embryons transférables dans les receveuses.

Durant l'essai auquel nous avons pris part, les femelles donneuses ont subis un traitement de superovulation basé sur des injections répétées, à 12h d'intervalle durant les 3 derniers jours précédant les chaleurs (**Figure 27**), de Stimufol ® (ULg FMV PhR, Sart-Tilman, Belgique), un extrait hypophysaire associant deux fractions de FSH et de LH d'origine porcine. Il faut savoir que les extraits hypophysaires se sont révélés plus efficaces que les gonadotropines chorioniques représentées par l'eCG (Wildt *et al.*, 1975 ; Elsdén *et al.*, 1978 ; Monniaux *et al.* 1983 ; Svitojus *et al.*, 1995).

La dose totale injectée pour chaque donneuse été de 50 UI (=500 µl de FSH pure : ajouter 12,5 ml de solution de reconstitution) pour se faire, cette dernière a été fractionnée en six doses décroissantes qu'on avait injecté en IM: (**Tableau 03**)

Tableau 03: Doses de pFSH injectées pour les donneuses durant les 3 derniers jours de traitement progestatif.

	Matin : 10 h	Soir : 22 h
9 ^{ème} jour	1 ml	1 ml
10 ^{ème} jour	0,5 ml	0,5 ml
11 ^{ème} jour	0,5 ml	0,5 ml

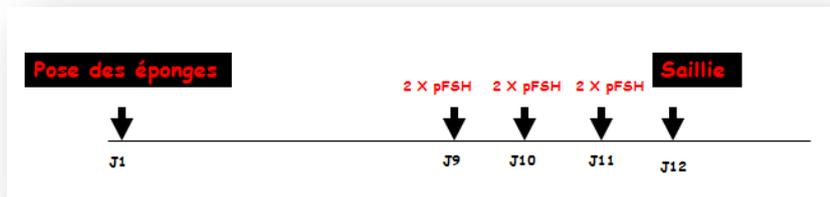


Figure 27: Protocole de superovulation à base de la pFSH.



Photo 06: Injection en IM du Stimufol® (cliché personnel)

1.3. Saillie des donneuses :

Au 12^{ème} jour et après venue des donneuses en chaleur, leur saillie a été assurée par les 2 boucs présents au niveau de l'ITELv, une lutte en main contrôlée a donc été réalisée. Les chèvres étaient présentées individuellement aux boucs, une fois le coup de rein, signe éminent d'une éjaculation, constaté, la chèvre est retirée du bouc.

Afin d'assurer un taux de fécondabilité maximum, nous avons représenté les chèvres aux boucs et avons constaté le 2^{ème} coup de rein.



Photo 07 : Saillie des donneuses. (cliché personnel)

II. COLLECTE ET TRANSFERT DES EMBRYONS :

II.1. Collecte des donneuses :

La récolte des embryons se fait 07 jours après la saillie des donneuses, ceci correspond à l'entrée dans la cavité utérine des embryons qui sont au stade blastocyste (stade à l'issue duquel les embryons deviennent transférables).

La collecte des donneuses, dans le présent travail, a été faite selon la méthode dite « chirurgicale »

II.1.1. Etape préliminaire :

Pour la récolte des embryons nous avons utilisé un milieu PBS enrichi de sérum de veau fœtal à 10%, pour la reconstitution de ce dernier une seringue graduée de 50 ml a été utilisée pour aspirer 45 ml de PBS qui sont versés dans un flacon dans lequel 5 ml de sérum de veau fœtal ont

préalablement été déposés, le tout a ensuite été homogénéisé par un mélange et conservé dans un bain Marie porté à 37°C.



Photo 08: Reconstitution du milieu de récolte. (cliché personnel)



Photo 09 : Bain Marie. (cliché personnel)

II.1.2. Temps opératoires :

II.1.2.1. Préparation de l'opéré :

Les chèvres ont été mises à la diète hydrique le soir de la veille du jour de collecte. Après tranquillisation avec une injection IM d'Acepromazine (0,2 mg/Kg), la donneuse a été installée en décubitus dorsal sur la table opératoire à plan inclinable.

Une fois rasées en région abdominale ventrale juste crânialement à la mamelle, le site opératoire a été nettoyé et désinfecté avec une solution alcoolique puis aspergé d'une solution iodée. C'est à ce moment la que la dose adéquate d'anesthésie générale (Kétamine 2 mg/kg en IV) ainsi qu'une anesthésie traçante à base de Xylocaïne ® ont été administrées.



Photo 10 : Installation de la chèvre sur le chariot et rasage de la région abdominale. (cliché personnel)

II.1.2.2. Temps opératoires proprement dits :

Une incision de 4 à 5 cm au niveau de la ligne blanche est effectuée à une travée de main de la mamelle, la peau, les plans musculaires sous-jacents et le péritoine sont incisés, c'est par la suite qu'une recherche manuelle des cornes est faite afin de pouvoir les extérioriser et ainsi procéder au comptage des corps jaunes présents sur les ovaires.



Photo 11 : Extériorisation des ovaires et comptage des corps jaunes.

(cliché personnel)

La corne ipsilatérale de l'ovaire porteur du plus grand nombre de corps jaunes est ponctionnée à l'aide d'une sonde cannelée juste à sa base d'où est introduite la sonde de Folley (sonde à 2 voies). Le ballonnet de cette dernière est gonflé au moyen à une seringue rempli d'air.



Photo 12 : Ponction de la base de la corne utérine.

(cliché personnel)

Une 2^{ème} ponction au niveau de la jonction uterotubaire est effectuée au moyen d'une aiguille épicroânienne reliée à un cathéter sur lequel une seringue remplie de 50 ml du PBS enrichi

est montée. La corne est ainsi rincée en injectant le contenu de la seringue, la totalité du liquide injecté (contenant les embryons) est ensuite récupéré dans un récipient en verre à la faveur de son passage par la sonde de Folley. Une fois les cornes collectées, une suture par un point simple de la ponction ayant permit l'insertion de la sonde de Folley est effectuée avec un fil tressé gainé résorbable (Vicryl® décimale 2).



Photo 13 : Ponction de la jonction utéro-tubaire.

(cliché personnel)



Photo 14 : Lavage de la corne utérine.

(cliché personnel)

L'utérus est soigneusement remis dans la cavité pelvienne avant la suture de la paroi abdominale par un surjet deushing avec du Vicryl® décimale 3, une solution d'antibiotique est administrée *in-situ*. La peau est ensuite suturée par des points simples avec le même fil et un antibiotique spray (Terramycine ®) est appliqué.



Photo 15 : Suture de la peau par des points simples.

(cliché personnel)

II.1.2.3. Soins postopératoires :

Une fois la collecte chirurgicale terminée, les donneuses sont mises au calme et une injection de Pgf2 α en IM est pratiquée afin d'éviter toute éventuelle gestation car tout les embryons n'ont pu être collectés. Associé à ça une antibiothérapie préventive à base de pénicilline est instaurée.

II.2 Recherche, évaluation et tri des embryons :

Le milieu de récolte récupéré est laissé à décanté, les 8/10 du volume sont siphonnés, la quantité restante est ensuite versée dans des boites de Petri et passée sous loupe binoculaire (Nikon ®) au grossissement x 60 la recherche des embryons peut ainsi commencer.

Chaque embryon trouvé est évalué puis porté dans une paillette à l'aide d'un cathéter de type Tomcat connecté à une seringue et déposé dans une cupule contenant du PBS enrichi à 4% de SVF et déposé sur une plaque chauffante à 37°C.



Photo 16 : Recherche d'embryons.
(cliché personnel)



Photo 17: Montage d'embryons sur paillettes.
(cliché personnel)

II.3 Transfert des embryons dans les receveuses :

Tout comme pour les donneuses, le transfert des embryons dans les receveuses est effectué chirurgicalement.

La préparation et la contention des animaux est exactement la même que pour la collecte : diète hydrique la veille du transfert, tranquillisation à base d'Acépromazine ®, rasage, nettoyage, mise en place sur la table opératoire à plan inclinable ainsi que l'anesthésie générale et

locorégionale. Une fois la chèvre receveuse installée, tête inclinée vers le bas, une incision de 4 à 5 cm est réalisée au niveau de la ligne blanche, crânialement à la mamelle. L'opérateur procède alors à l'extériorisation des cornes utérines.

Après l'examen des ovaires, une ponction de la paroi utérine sur la corne ipsilatérale de l'ovaire porteur du corps jaunes est réalisée avec une sonde cannelée, afin de pouvoir y insérer l'extrémité de la paillète contenant les embryons, cette dernière est montée dans un pistolet de transfert pour petit ruminants.



Photo 18 : Transfert des embryons sur une receveuse.

(cliché personnel)

Une fois les embryons déposés, la corne utérine est remise à sa position physiologique, puis la paroi abdominale est suturée par un surjet de cushing et la peau par des points simples à l'aide d'un fil Vicryl® décimale 3. A la suite de ça, une couverture d'antibiotique à titre préventif est instaurée.

CONCLUSION

CONCLUSION :

L'espèce caprine présente quelques spécificités anatomiques et physiologiques concernant la fonction de reproduction. En effet le système reproducteur est en étroite relation avec les facteurs environnementaux, alimentaires, génétiques et sanitaires dont il faut tenir compte pour la conduite de la reproduction d'un troupeau.

Des progrès significatifs ont été réalisés pour la maîtrise de la reproduction caprine en ferme et dans les centres d'IA. Ce progrès concerne, actuellement, le domaine de la manipulation des gamètes *in vitro* à des fins de modifications génétiques pour des objectifs économiques ou thérapeutiques bien précis.

La transplantation embryonnaire, une biotechnologie de seconde génération, est peu pratiquée chez les petits ruminants par rapport à l'IA étant donné son coût élevé par rapport à la valeur économique de l'animal. Elle est, cependant, utile dans le cadre des échanges commerciaux nationaux ou internationaux.

La production d'embryons *in vitro* après prélèvements répétés des ovocytes sur la même femelle, en vue d'augmenter la descendance d'élites, devrait permettre dans un futur proche, l'amélioration des schémas de sélection et l'obtention à moindre coût de gènes d'intérêt. Il s'avère, donc, nécessaire d'améliorer encore ces techniques en poursuivant les recherches pour mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la maturation ovocytaire, dans la capacitation des spermatozoïdes et dans l'aptitude à la congélation des embryons obtenus *in vitro*.

En Algérie, les techniques de biotechnologies de la reproduction chez l'espèce caprine sont peu développées et ne sont réalisées que dans le cadre de la recherche. Pourtant, dans les pays développés, elles ont permis d'augmenter rapidement l'effectif des animaux de rente ayant un potentiel génétique très recherché en plus de l'amélioration génétique d'un troupeau. De plus, les produits caprins sont très recherchés comme source de protéines animales de noble valeur biologique, pour l'industrie fromagère et pour les besoins des personnes ayant des problèmes de digestion et soucieuses de régime hypocalorique et hypocholestérolémique. La reproduction artificielle permet de répondre aux besoins spécifiques des populations.

Le développement de la filière caprine en Algérie nécessite une organisation et des structures d'élevage très élaborées ainsi que l'application des différentes techniques de reproduction artificielle. Cela passera, forcément, par l'implication de l'Etat, des éleveurs, des opérateurs économiques, des associations de la filière caprine et des vétérinaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amoah E.A.,** Gelay S., (1997), *Biotechnological advances in goat reproduction*. Journal Animal Science, 75, 578-586.
- Bakhach J.,** Casoli V., Guimberteau J.C., (2007), *La cryopréservation de tissus composites: principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise*. Ann. Chir. Plas. Est. 52, 531-547.
- Baldassare H.,** Karatzas C.N., (2004), *Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats*. Animal Reproduction Science, 82-83, 255-66.
- Baril G.,** (1995), *Etat actuel des méthodes utilisées pour la transplantation embryonnaire chez la chèvre*. Rencontre Recherche Ruminants, 2, 413-416.
- Baril G.,** Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P., Vallet J.C., (1993), *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*. Etude FAO production et santé animales. 193 p.
- Baril G.,** Saumade J., (2000), *Hormonal treatments to control time of ovulation and fertility on goats*. Presented at the 7. International conference on Goats, Institut de l'Élevage et l'Institut National de Recherche Agronomique, Tours (FRA). Pp. 400-405.
- Barone R.,** (2001), *Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 4 Splanchnologie II*. Vigot, Paris.
- Bonnes G.,** Desclaude J., Drogoul C., *et al*, (2005), *Reproduction des animaux d'élevage*. 2^{ème} édition, Dijon.
- Brice G.,** Leboeuf B., Perret G., (2002), *Reproduction ovine et caprine sans hormones : utopie ou perspective réaliste ?*. Rencontre Recherche Ruminants, 9, 135-141.
- Cadiou,** (1969), *Diagnostic de gestation chez la brebis et la chèvre*. Thèse vétérinaire, Alfort.
- Camp J.C.,** Wildt D.E., Howard P.K., Stuart L.D., Chadraborty P.K., (1983), *Ovarien activity during normal and abnormal length oestrus cycles in goat*. Biology of Reproduction, 28, 673-681.
- Chemineau P.,** Gauthier D., Poirier J.C., Saumade J., (1982), *Plasma levels of LH, FSH, Prolactin, Oestradiol 17-Beta and Progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat*. Theriogenology, 17, 313-323.

- Chemineau P.**, (1983), *Effect on oestrus and ovulation of exposing creol goats to the male at three times of the year*. J. Reprod. Fert., 67, 65-72.
- Chemineau P.**, (1989), *L'effet bouc : mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus*. INRA Productions Animales, 2, 97-104.
- Chemineau P.**, et al, (1991), *La maîtrise de la reproduction des mammifères domestiques*. In : Thibault et Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Ellipses INRA, Paris, 928 p.
- Chemineau P.**, Malpaux B., Guerin Y., Maurice F., Daveau A., Pelletier J., (1992), *Lumière et mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins*. Annales de Zootechnie, 41, 247-261.
- Chemineau P.**, Delgadillo J.A., (1994), *Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins*. INRA Productions Animales. 7, 315-326.
- Chemineau P.**, Malpaux B., Pelletier J., Leboeuf B., Delgadillo J.A., Deletang F., Pobel T., Brice G., (1996), *Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins*. INRA Productions Animales, 9,45-60.
- Chemineau P.**, Baril G., Leboeuf B., Maurel M.C., Roy F., Pellicer-Rubio M., Malpaux B., Cognie Y, (1999), *Implication des progrès récents en physiologie de la reproduction pour la conduite de la reproduction dans l'espèce caprine*. INRA Production Animales, 12(2), 135-146.
- Chemineau P.**, Pellicer-Rubio M.T., Lassoued N., Khaldi G., Monniaux D., (2006), *Male induced short oestrus and ovarian cycles in sheep and goats : a working hypothesis*. Reprod. Nutr. Dev. 46, 417-429.
- Congié Y.**, (1999), *State of the ART in sheep-goat embryo transfert*. Theriogenology, 51, 105-116.
- Cognié Y.**, Poulin N., Lovatelli Y., Mermillo P., (2004), *State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryo in small ruminants*. Reprod. Fert. Dev, 16, 437-445.
- Colin M.**, (2004), *Reproduction des animaux domestiques*. Edition point vétérinaire, Paris, 207 p.

- Colleau J.J.**, Heyman Y, Renard J.P., (1998), *Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection*. INRA Productions Animales, 15, 199-207.
- Decuadro-Hensen G.**, (2004), *La réfrigération et la congélation du sperme : expériences chez l'animal*. Gynécologie Fertilité et Obstétrique, 32, 887-893.
- Douteau F.**, (1981), *Les diagnostic de gestation chez la chèvre laitière par ultrasons et effet Doppler. Son rôle dans la conduite d'élevage*. Thèse vétérinaire, Toulouse.
- Driancourt M.A.**, et al., (1991), *Folliculogénèse et ovulation*, In : Thibault et Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Ellipses INRA, Paris, 928 p.
- Drion P.V.**, Ectors F.J., Hanzen C., Houtain P., Lonergan P., Beckers J.F., (1996), *Régulation de la croissance folliculaire et lutéale*. Point vétérinaire, 28, 49-56.
- Druart X.**, Ribeiro Bento DOS Santos C., (2004), *Le sexage des spermatozoïdes: état des lieux et perspectives*. Rencontre Recherche Ruminants, 11, 369-372.
- Elsden R.P.**, Nelson L.D., Seidel G.E Jr., (1978), *Superovulating cows with follicles stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin*, Theriogenology, 9, 17-26.
- Fabre-nys C.**, (2000), *Le comportement sexuel des caprins : contrôle hormonal et facteurs sociaux – production animales*. INRA Productions Animales, 38, 240-246.
- Fatet A.**, Pellicer-Rubio M.T., Leboeuf B., (2011), *Reproductive cycle of goats*. Animal Reproduction Science, 124, 211-219.
- Gahery P.C.**, (2012), *La reproduction des caprins, Maîtrise et mise en œuvre dans les élevages réalisation d'un recueil sur support DVD*. Thèse vétérinaire Nante, 246 p.
- Gootwine E.**, Brash I., Bor A., Dekel I., Friedler A., Heller M., Zaharoni U., Zenu A., Shani M, (1997), *Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program*. Theriogenology, 48, 485-499.
- Gressier B.**, (1999), *Etude de l'influence du rapport FSH/LH dans le cadre de la superovulation chez la chèvre*, Thèse vétérinaire, Nante, Vol 85.
- Guinot F.**, (2005), *Cryoconservation des embryons des espèces domestiques*. INRA Productions Animales, 18, 27-35.

- Houdebine LM.**, (1998), *La transgénèse animale et ses applications*. INRA Productions Animales, 11, 81-94.
- Lacaze S.**, Humblot P., Ponsart C., (2008), *Sexage et transfert direct d'embryons bovins biopsies et congelés en ferme dans un programme commercial*. Rencontre Recherche Ruminants, 15, 387-390.
- Leboeuf B.**, Manfredi E., Boué P., Piacère A., Brice G., Baril G., Broqua C., Humblot P., Terqui M., (1998), *L'insémination artificielle et l'amélioration génétique chez la chèvre laitière en France*. INRA Productions Animales, 11 (3), 171-181.
- Leboeuf B.**, Restall B., Salamon., (2003), *Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle*. INRA Productions Animales, 16, 91-99.
- Leboeuf B.**, Dlgadillo J.A., Manfredi E., Piacère A., Clement V., Martin P., Pellicer-Rubio M.T., Boué P., De Cremoux R., (2008), *Place de ma maîtrise de la reproduction dans les schémas de sélection en chèvre laitières*. INRA Productions Animales, 21 (5), 391 402.
- Linzell J.L.**, Peaker M., (1974), *Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat*. J Physiol, 243, 129-151.
- Maher G.**, (2012), *Comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et d'insémination artificielle chez la chèvre*. Mémoire Université Laval, Québec, 115 p.
- Maizel C.**, (2006), *Production et transfert d'embryons in vivo chez la chèvre de race Boer*. Thèse vétérinaire, Alfort, 137 p.
- Monniaux D.**, Chupin D., Saumande J., (1983), *Superovulation responses in cattle*, Theriogenology, 19, 55-81.
- Ouin S.**, (1997), *Influence de la reproduction dessaisonnée des caprins sur les résultats techniques et économiques des élevages*. INRA Production Animales, 10 (4), 317-326.
- Paramio M.T.**, (2010), *In vivo and in vitro embryo production in goats*. Small Ruminant Research, 89, 144-148.
- Ponsart C.**, Gérardet O., Caplin S., (2004), *L'insémination : historique, état des lieux chez l'animal*. Gynécologie Obstétrique et Fertilité, 32, 880-884.
- Route A.**, (2007), *Mise au point de technique de fécondation in vitro chez le Makhor (Capra Falconeri)*. Thèse vétérinaire LyonI, 103 p.

- Shelton M.**, (1978), *Reproduction and breeding of goats*. Journal of Dairy Science, 61, 200-211.
- Soltner D.**, (2001), *La reproduction des animaux d'élevages*. Zootechnie générale, Tomme 1.
- Svitojus S.**, Vaskas H., Uchouckiene D., (1992), *Superovulation of cows using fsh, follicotropin, follitropine and folligon*, 8th Scientific Meeting AETE, Lyon 11-12 Septembre.
- Thibault C.**, Levasseur M-C., (2001), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Edition Ellipses INRA, Paris, 928 p.
- Vignon X.**, Heyman Y., Chavatte-Palmer P., Renard J.P., (2008), *Biotechnologies de la reproduction : le clonage des animaux d'élevage*. INRA Production Animales, 21 (1), 33-44.
- Viguié C.**, (1995), *Régulation de la sécrétion pulsatile de LHRH par la photopériode et la mélatonine chez la brebis : mise en évidence et caractérisation d'une étape dopaminergique*. Thèse de Docteur de l'université de Montpellier II, 152p.
- Wildt D.E.**, Woody H.D., Dukelow W.R., (1975), *Induction of multiple ovulation in the cow with single injections of fsh and hcg*, Journal of Reproduction and Fertility, 44, 583-586.
- Zarrouk A.**, Souilem O., Drion P.V., Beckers J.F., (2001), *Caractéristiques de la reproduction de l'espèce caprine*. Ann. Méd. Vét., 145, 98-105.

Résumé :

Ce travail se propose de retracer de manière succincte la physiologie de la reproduction chez l'espèce caprine et son adaptation aux biotechnologies liées à la reproduction. Il reprend successivement, un bref rappel de la physiologie de la reproduction caprine, avant de décrire les principales biotechnologies de la reproduction chez cette espèce. Enfin, la dernière partie comporte l'essai de transfert embryonnaire auquel nous avons participé.

Le contrôle de la reproduction caprine est intéressant pour des raisons techniques (synchronisation des mises bas, ajustements aux disponibilités fourragères ou aux contraintes économiques), et pour des raisons génétiques (identification et diffusion des génotypes améliorateurs).

Enfin, Il est important de souligner qu'en Algérie, les différentes techniques de reproduction assistées chez l'espèce caprine, à l'image du transfert embryonnaire, ne sont encore qu'au stade expérimental.

Mots clé : caprins, biotechnologies de la reproduction, transfert embryonnaire.

Abstract :

This work proposes to recall briefly the reproduction physiology of goats and its adaptation to biotechnologies related to the reproduction. Our work begins successively with a short recall of the physiology of the caprin reproduction, before describing principal biotechnologies of the reproduction of this specie. Finally, the last part comprises the embryo transfer procedure in which we took part.

The control of the caprin reproduction is interesting for technical reasons (heat synchronization, adjustments with the fodder availabilities or the economic constraints), and for genetic reasons (identification and diffusion of the ameliorative genotypes).

Lastly, It is important to note that in Algeria, the various techniques of assisted reproduction of the caprin species, such as embryo transfer, are yet only at the experimental stage.

Key words: goats, reproductive biotechnologies, embryo transfer.

ملخص :

يقترح هذا العمل بطريقة موجزة وصف فيزيولوجيا الاستنساخ عند المعز و تكيفها مع التكنولوجيات الحيوية المتعلقة بالاستنساخ عند المعز. يحتوي بالتوالي, على ذكر وجيز لفزيولوجيا الاستنساخ عند المعز, قبل وصف التكنولوجيات الحيوية الرئيسية الحيوية المتعلقة بالاستنساخ, و الجزء الأخير يحوي مراحل النقل الجيني الذي شركنا فيه.

السيطرة على استنساخ المعز جد مهم لأسباب تقنية (تزامن الولادات, تعديلات لموسم العلف) و لأسباب وراثية (تحديد و نشر التراكب الوراثية المحسنة).

أخيرا, من المهم أن نذكر أن في الجزائر, مختلف التقنيات المتعلقة بالاستنساخ عند المعز, مثل نقل الأجنة, لا تزال في مرحلة تجريبية.

كلمات مفتاح: المعز, التكنولوجيات الحيوية المتعلقة بالاستنساخ, نقل الأجنة.